

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

**O extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)
modula a resistência ao estresse oxidativo no
organismo modelo *Caenorhabditis elegans*
através de mecanismos diretos e indiretos.**

Larissa de Freitas Bonomo

Ouro Preto

2014

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

**O extrato aquoso de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)
modula a resistência ao estresse oxidativo no
organismo modelo *Caenorhabditis elegans*
através de mecanismos diretos e indiretos.**

Larissa de Freitas Bonomo

Orientadora

Riva de Paula Oliveira

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto

2014

B719e Bonomo, Larissa de Freitas.

O extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modula a resistência ao estresse oxidativo no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* através de mecanismos diretos e indiretos [manuscrito] / Larissa de Freitas Bonomo - 2014.

138f.: il., color; tab.

Orientador: Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular.

1. Açaí - Teses. 2. Stress (Fisiologia) - Teses. 3. Reação de oxidação - reação - Teses. I. Oliveira, Riva de Paula. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.152.1:613.26

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”

Thomas Edison.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Maria da Conceição de Souza Freitas
e Élio Bonomo pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora **Riva de Paula Oliveira**, pela oportunidade de aprendizado que me foi oferecida, pela presença nos momentos de insegurança e desânimo, pelo auxílio durante as dificuldades experimentais. E acima de tudo, por acreditar no meu trabalho e competência.

Aos Professores **Maria Lúcia Pedrosa** e **Marcelo Eustáquio Silva**, pelo auxílio e colaboração. Mais do que colaboradores são amigos queridos que me impulsionaram a seguir a carreira científica.

Ao professor **Eric Boulanger** e toda sua equipe pela colaboração, receptividade e pelo aprendizado adquirido durante o estágio acadêmico Brasil/França promovido pelo **programa ARCUS**.

Ao **programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da UFOP**.

Ao apoio financeiro da **CAPES, FAPEMIG** e **UFOP**.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Bioquímica e demais laboratórios, em especial à **Franciny Paiva, Valquíria Santos, David Nunes, Patrícia Boasquivis, Igor de Paula, Washington Caneschi, Talita Magalhães, Isabella Gomes, Álvaro Torres, Wagney Mendes e Renata Resende**, o meu agradecimento especial porque sem a ajuda de todos vocês este trabalho não teria sido possível.

À **Daniela Batista**, pela dedicação e disponibilidade sempre.

Aos **colegas da pós-graduação**, pela agradável convivência.

Aos **meus pais e ao meu irmão**, pelo apoio incondicional. Vocês são minha vida, meu exemplo e meu maior orgulho.

À **vovó Zélia**, pelas orações.

A todos os **meus familiares**, por sempre acreditarem em mim.

Ao **Heberth de Paula, Maísa Silva e Joyce Aguiar** grandes amigos. Meus exemplos profissionais a seguir.

Ao **Bruno da Cruz Pádua** por ser mais do que um colega da pós-graduação. Amigo para todas as ocasiões, companheiro nas alegrias e superações.

Aos meus amigos queridos da **Banda Podre**. Não arriscaria escrever o nome de todos porque não poderia me esquecer de nenhum. Agradeço imensamente pela amizade eterna e por serem sempre presentes em minha vida.

À **República Nascente** pelo carinho. Minha segunda casa.

Às **meninas lindas da República Vende-se** por todos os momentos juntas e pela amizade enorme que temos.

Às lindezas da **Home Lindeza (Bi, Cacau, Shiara, Gabi e Luara)**, ter morado com vocês durante boa parte do doutorado foi fundamental. Amizade sincera e companheirismo pra vida toda.

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) surgiu recentemente como uma promissora fonte de antioxidantes naturais. Apesar de seu valor como alimento funcional, estudos sobre os efeitos do açaí *in vivo* são ainda limitados. Neste trabalho, utilizamos o modelo *Caenorhabditis elegans* para avaliar as propriedades antioxidantes do açaí *in vivo* e para desvendar seu mecanismo de ação. A suplementação com 100 mg/mL do extrato aquoso de açaí (EAA) por 48 horas aumentou tanto a resistência ao estresse oxidativo quanto a resistência ao estresse osmótico independentemente de qualquer efeito na reprodução e no desenvolvimento dos animais. O tratamento com EAA inibiu o crescimento bacteriano, mas esta propriedade antimicrobiana não influenciou a resistência ao estresse oxidativo. O aumento da resistência ao estresse oxidativo mediado pelo EAA apresentou correlação com a redução da produção de ERO, prevenção da redução de grupos sulfidrilas (SH) e da ativação de *gcs-1* observadas em condições de estresse oxidativo. Nossos estudos mecanísticos demonstraram que o EAA promove resistência ao estresse oxidativo, agindo de maneira dependente de DAF-16 e da via de sinalização ativada em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1. Finalmente, o EAA aumentou a agregação de proteínas com expansões poliglutamínicas e diminuiu a atividade do proteassoma. Os resultados obtidos sugerem que os compostos naturais presentes no EAA podem melhorar a capacidade antioxidante de um organismo, sob condições de estresse, por mecanismos diretos e indiretos.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) has recently emerged as a promising source of natural antioxidants. Despite its value as a functional food, studies regarding the effects of açaí *in vivo* are limited. In this study, we use the *Caenorhabditis elegans* model to evaluate the *in vivo* antioxidant properties of açaí on an organismal level and to examine its mechanism of action. Supplementation with açaí aqueous extract (AAE) increased both oxidative and osmotic stress resistance independently of any effect on reproduction and development. AAE suppressed bacterial growth, but this antimicrobial property did not influence stress resistance. AAE-increased stress resistance was correlated with reduced ROS production, the prevention of sulfhydryl (SH) level reduction and *gcs-1* activation under oxidative stress conditions. Our mechanistic studies indicated that AAE promotes oxidative stress resistance by acting through DAF-16 and the osmotic stress response pathway OSR-1/UNC-43/SEK-1. Finally, AAE increased polyglutamine protein aggregation and decreased proteasome activity. These findings suggest that natural compounds available in AAE can improve the antioxidant status of a whole organism under certain conditions by direct and indirect mechanisms.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Estresse oxidativo e doenças.....	4
2.2 Principais vias e fatores de transcrição ativados em resposta ao estresse em mamíferos.....	6
2.2.1 MAPKs.....	6
2.2.2 Nrf-2.....	8
2.2.3 Proteínas FOXO.....	9
2.2.4 Proteína quinase II dependente de Ca ²⁺ /Calmodulina (CaMKII).....	11
2.3 Ação de compostos antioxidantes naturais.....	14
2.4 O açaí.....	17
2.4.1 Propriedades antioxidantes.....	17
2.4.2 Propriedades anti-inflamatórias.....	20
2.4.3 Propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas.....	21
2.4.4 Benefícios do açaí para a saúde humana.....	22
2.5 O <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	23
2.5.1 <i>C. elegans</i> como um organismo modelo para triagem de compostos com propriedades biológicas.....	23
2.6 Vias de sinalização celular envolvidas na resposta ao estresse em <i>C. elegans</i>	26
2.7 Justificativa.....	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Cepas e linhagens.....	33
4.2 Crescimento e manutenção do <i>C. elegans</i>	33
4.3 Sincronização cronológica do <i>C. elegans</i>	33
4.4 Cultura de células endoteliais da veia do cordão umbilical (HUVEC).....	35
4.5 Preparo do extrato aquoso de açaí e das placas NGM.....	35
4.6 Quantificação de antocianinas.....	36
4.7 Ensaio da atividade removedora do radical DPPH.....	37
4.8 Análise do comprimento corporal.....	37
4.9 Análise da progênie.....	38
4.10 Ensaio de longevidade.....	38
4.11 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo.....	39
4.12 Ensaio de resistência ao estresse térmico.....	39
4.13 Ensaio de resistência ao estresse osmótico.....	39
4.14 Curva de crescimento bacteriano.....	40
4.15 Quantificação de espécies reativas de oxigênio.....	40

4.16	Quantificação dos níveis de sulfidrilas totais (SH)	41
4.16.1	Dosagem de proteínas totais	41
4.17	Análise da expressão de genes repórteres	42
4.18	Análise da expressão gênica	43
4.18.1	Extração de RNA	43
4.18.2	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	44
4.18.3	PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	44
4.18.4	Curvas padrão para determinação da eficiência dos iniciadores....	45
4.18.5	Escolha do gene de referência endógena	47
4.19	Quantificação da agregação de proteínas poliglutamínicas (PoliQ).....	47
4.20	Quantificação da atividade do proteassoma	47
4.21	Análise estatística	48
5.	RESULTADOS	49
5.1	Composição fitoquímica do EAA.....	49
5.2	Avaliação da capacidade antioxidante do EAA <i>in vitro</i>	49
5.3	Análise do desenvolvimento corporal e da progênie de <i>C. elegans</i> tratado com EAA	52
5.4	Análise da sobrevivência do <i>C. elegans</i> tratado com EAA sob condições de estresse.....	52
5.5	Análise da sobrevivência do <i>C. elegans</i> tratado com EAA sob condições normais	56
5.6	Avaliação do efeito do EAA sobre o crescimento bacteriano	58
5.7	Avaliação do efeito do EAA sobre o <i>status</i> redox em <i>C. elegans</i> e HUVEC.....	58
5.8	Avaliação dos mecanismos subjacentes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo mediada pelo EAA.....	Error! Bookmark not defined.
5.8.1	Avaliação do envolvimento das vias de sinalização DAF-16/FOXO e JNK-1.....	Error! Bookmark not defined.
5.8.2	Avaliação do envolvimento da via de sinalização da p38 MAPK	65
5.8.3	Avaliação do envolvimento da via de sinalização em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1	65
5.8.4	Análise da translocação nuclear de DAF-16::GFP em <i>C. elegans</i> tratado com EAA.....	70
5.8.5	Efeito do EAA na expressão gênica de <i>daf-16</i> e seus genes alvo <i>sod-3</i> , <i>ctl-1</i> e <i>gst-7</i>	70
5.9	Efeito do EAA na homeostase proteica.....	74
5.9.1	Análise da expressão de <i>osr-1</i> e <i>gpdh::GFP</i> em <i>C. elegans</i> tratado com EAA.....	74
5.9.2	Efeito do EAA na agregação de proteínas poliglutamínicas	74
5.9.3	Efeito do EAA na atividade proteolítica do proteassoma	77
6.	DISCUSSÃO	80
6.1	Avaliação da toxicidade do EAA	80
6.2	Avaliação da sobrevivência do <i>C. elegans</i> tratado com EAA sob condições de estresse	80
6.3	Análise dos mecanismos diretos e indiretos envolvidos na resistência ao estresse mediada pelo EAA.....	82
6.3.1	Mecanismo de ação direto do EAA.....	82
6.3.2	Mecanismo de ação indireto do EAA	85
6.4	Análise da sobrevivência do <i>C. elegans</i> tratado com EAA sob condições normais	87

6.5 Avaliação do efeito do EAA na homeostase proteica.....	88
6.6 Modelo proposto de atuação do EAA.....	89
7. CONCLUSÕES	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9. ANEXO.....	108
9.1 ANEXO 1.....	108
9.2 ANEXO 2.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos biológicos das ERO.....	4
Figura 2: Cascatas de sinalização das MAPK.....	7
Figura 3: Modelo de ativação de Nrf-2 mediada por estresse oxidativo...10	
Figura 4: Modelo de regulação de FOXO pela via da insulina e por estresse oxidativo.....	12
Figura 5: Regulação da ativação da Proteína quinase II dependente de Ca ²⁺ /Calmodulina (CaMKII).....	13
Figura 6: Modelo de ativação de SKN-1 durante estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	27
Figura 7: Modelo de regulação de DAF-16 pela via de sinalização da insulina e durante condições de estresse em <i>C. elegans</i>	29
Figura 8: Avaliação do comprimento corporal do <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	53
Figura 9: Avaliação da progênie do <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	54
Figura 10: Efeito do tratamento com extrato aquoso de açai (EAA) sob condições de estresse.....	55
Figura 11: Análise da sobrevivência do <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA) sob condições normais.....	57
Figura 12: Efeito do extrato aquoso de açai (EAA) no crescimento bacteriano e na resistência ao estresse oxidativo de <i>C. elegans</i> tipo selvagem crescido em bactéria morta.....	59
Figura 13: Avaliação da produção de ERO em <i>C. elegans</i> e HUVEC.....	60
Figura 14: Avaliação do efeito do extrato aquoso de açai (EAA) nos níveis de SH totais em <i>C. elegans</i>	62
Figura 15: Avaliação do efeito do extrato aquoso de açai (EAA) na expressão de <i>gcs-1::GFP</i> e <i>gst-4::GFP</i>	64
Figura 16: Análise do envolvimento da via DAF-16/FOXO e JNK na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açai (EAA).....	66

Figura 17: Análise do envolvimento da via da p38 MAPK na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açai (EAA).....	68
Figura 18: Análise do envolvimento da via de sinalização em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1 na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açai (EAA)....	69
Figura 19: Análise da localização subcelular de DAF-16::GFP em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	71
Figura 20: Análise da expressão de RNAm de DAF-16 e seus genes alvo induzíveis por estresse <i>sod-3</i> , <i>ctl-1</i> e <i>gst-7</i> em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	72
Figura 21: Avaliação da expressão de <i>sod-3::GFP</i> em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	73
Figura 22: Análise da expressão de RNAm de OSR-1 em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	75
Figura 23: Avaliação da expressão de <i>gpdh::GFP</i> em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	76
Figura 24: Análise da agregação poliglutamínica em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	78
Figura 25: Análise da atividade proteassomal em <i>C. elegans</i> tratado com extrato aquoso de açai (EAA).....	79
Figura 26: Modelo hipotético do mecanismo de ação do extrato aquoso de açai (EAA) em <i>C. elegans</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de <i>C. elegans</i> utilizadas no trabalho.....	34
Tabela 2: Lista de iniciadores utilizados na qPCR.....	46
Tabela 3: Determinação das antocianinas presentes no extrato aquoso de açáí (EAA).....	50
Tabela 4: Atividade antioxidante do extrato aquoso de açáí (EAA) <i>in vitro</i> medida pelo ensaio do DPPH.....	51
Tabela 5: Efeito do extrato aquoso de açáí (EAA) na resistência ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i> selvagem e mutantes.....	67
Tabela A: Valores de Ct para os genes de referência endógena analisados.....	108

ABREVIATURAS

AKT - Proteína quinase B

ARE – Elemento de resposta ao estresse

ASK-1 - Quinase regulada por sinal apoptótico

CaMKII – Proteína quinase 2 dependente de Ca^{+2} /Calmodulina

CAT – Catalase

CBE- Extrato de “Cranberry”

DAF-16 – Ortólogo de FOXO em *C. elegans*

DPPH – Radical Difenilpicrilhidrazil

ERK- Quinase ativada por sinal extracelular

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH - Glutaciona

GSK3 β - Quinase 3 β regulada por glicocorticóide

GST – Glutaciona-S-transferase

H₂DCFDA - 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

JNK – Quinase c-Jun N terminal

Keap – Proteína proteassomal independente de ubiquitina

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MEK - MAP/ERK quinase

NF κ B – Fator nuclear κ B

Nrf – fator nuclear eritróide

NSY-1 - MAP3K ortóloga da ASK-1 de mamíferos

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PKC – Proteína quinase C

PMK-1 - MAPK ortóloga à p38 de humanos

SAP – Proteína ativada por estresse

SEK-1 - MAP2K da via da p38 em *C.elegans*

SKN-1 – Ortólogo de Nrf em *C. elegans*

SOD – Superóxido dismutase

γ -GCS – Gama glutamil cisteína sintetase

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é consequência da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) e/ou da redução nas defesas antioxidantes do organismo. O aumento dos níveis intracelulares de ERO ativa vias de sinalização específicas que podem influenciar vários processos celulares relacionados ao envelhecimento e desenvolvimento de doenças como o câncer e doenças neurodegenerativas (COOKE *et al.*, 2003).

A melhora das defesas antioxidantes através de suplementação dietética pode ser uma estratégia para reduzir os níveis de estresse oxidativo e o processo de envelhecimento. Antioxidantes naturais podem exercer seus efeitos de maneira direta ou indireta (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008). Antioxidantes diretos, tais como vitaminas E e C, atuam na neutralização de moléculas de ERO. Já os antioxidantes indiretos induzem ou ativam vias de sinalização envolvidas na resposta ao estresse, como as enzimas de detoxificação de fase 2. Em mamíferos, estas enzimas estão sob regulação transcricional da via de sinalização Keap/Nrf/ARE. Plantas e vegetais ricos em compostos polifenólicos são capazes de ativar este sistema antioxidante através das proteínas Nrf, podendo, desta forma, apresentar efeitos quimioterápicos benéficos para a saúde humana (SPORN; LIBY, 2005).

Tradicionalmente, o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é usado como planta medicinal e como alimento básico em muitas partes do Brasil. Nos últimos anos, a polpa de açaí ganhou atenção internacional como alimento funcional devido aos seus benefícios nutricionais e promessa terapêutica. O extrato seco de açaí é composto por aproximadamente 13% de proteínas, 48% de lipídeos, 1,5% de açúcares totais e vários outros nutrientes, como lignanas, fibras e polifenóis (SCHAUSS *et al.*, 2006b). Os principais polifenóis encontrados no açaí são as antocianinas, proantocianidinas (especificamente cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo) e outros flavonóides (SCHAUSS *et al.*, 2006b; KANG *et al.*, 2011). As propriedades farmacológicas gerais do açaí estão relacionados com a sua capacidade antiproliferativa, anti-inflamatória, antioxidante e cardioprotetora (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011).

A Polpa de açaí e suas frações polifenólicas mostram alta atividade antioxidante com base em vários ensaios *in vitro*, principalmente contra o radical difenilpicrilhidrazil (DPPH), superóxido, radical hidroxila e ácido

hipocloroso (GIRONES-VILAPLANA *et al.*, 2012; RUFINO *et al.*, 2011; HOGAN *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2008; HONZEL *et al.*, 2008; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Os ensaios *in vitro* baseados em cultura de células também demonstraram que a polpa de açaí pode reduzir a produção de ERO em eritrócitos humanos e células polimorfonucleares (PMN) expostas ao estresse oxidativo (JENSEN *et al.*, 2008; HONZEL *et al.*, 2008). O pré-tratamento de células de tecido cerebral com açaí, reduziu os danos induzidos por H₂O₂ em lípidos e proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) para níveis basais (SPADA *et al.*, 2009).

Apesar de suas propriedades antioxidantes *in vitro*, os estudos sobre os efeitos do açaí *in vivo* são limitados (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). A suplementação dietética de açaí em ratos reduz a produção de ERO por neutrófilos, aumenta os níveis de glutathiona (GSH), reduz os danos às proteínas e ativa a expressão do gene da glutathiona peroxidase (GPx) e gama-glutamilcisteína-sintetase-1 (γ -GCS) no fígado (GUERRA *et al.*, 2011). Em humanos, um estudo com voluntários que ingeriram uma mistura de suco de açaí, mostraram aumento significativo na capacidade antioxidante do soro e redução da peroxidação lipídica (JENSEN *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2008). Em adultos com excesso de peso, o açaí melhorou marcadores de risco para a doença metabólica (UDANI *et al.*, 2011). A alta capacidade de remoção de radicais peroxil e hidroxil da polpa de açaí, sugere que o açaí tem propriedades pró-longevidade. Em *Drosophila melanogaster*, a suplementação dietética com açaí aumentou o tempo de vida das moscas fêmeas alimentadas com uma dieta rica em gordura e também sob condições de estresse oxidativo induzido pelo silenciamento do gene da superóxido dismutase-1 (SOD1) (SUN *et al.*, 2010). Em outra espécie de mosca da fruta, *Anastrepha ludens*, a suplementação dietética de açaí promoveu o aumento da sobrevivência de moscas alimentadas com alto teor de gordura e açúcar (LIEDO *et al.*, 2012).

Em adição ao modelo *Drosophila* e outras espécies de moscas da fruta, intervenções genéticas e farmacológicas de resistência ao estresse e mecanismos de sobrevivência têm sido bem elucidados no nematóide *Caenorhabditis elegans*. Uma série de genes e vias foram relacionados à modulação da sobrevivência em *C. elegans*. Estas vias altamente conservadas, incluem a via de sinalização do receptor semelhante à insulina/IGF-1, a qual

depende do fator de transcrição DAF-16/FOXO. Quando a via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1 encontra-se reduzida, a proteína DAF-16 transloca-se para o núcleo, onde por sua vez induz a expressão de genes que aumentam a longevidade e promovem a resistência a vários tipos de estresse (MURPHY, 2006). SKN-1/Nrf é outro fator de transcrição regulado pela via de sinalização insulina/IGF-1 (TULLET *et al.*, 2008). SKN-1 contribui para o aumento da resistência ao estresse e da longevidade resultante da redução da sinalização da insulina/IGF-1 independentemente de DAF-16 (TULLET *et al.*, 2008). Usando esse modelo, vários estudos têm demonstrado os efeitos benéficos de produtos naturais na promoção da resistência ao estresse e longevidade, incluindo extratos de Ginkgo biloba (WU *et al.*, 2002), mirtilo (WILSON *et al.*, 2006), canela (YU *et al.*, 2010) e cranberry (GUHA *et al.*, 2012). No presente estudo, utilizamos o modelo *C. elegans* para avaliar *in vivo* as propriedades antioxidantes do açaí e seus mecanismos de ação subjacentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo e doenças

O oxigênio é essencial para muitos organismos vivos para a produção da energia utilizada como combustível durante os processos biológicos. No entanto, o metabolismo do oxigênio gera radicais livres, que quando em desequilíbrio com a capacidade antioxidante do organismo, podem promover estresse oxidativo, induzindo danos à biomoléculas, como DNA, proteínas, lipídios de membrana e carboidratos (HARMAN, 1998).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) apresentam tanto papel benéfico quanto maléfico no organismo. As ERO e ERN podem ser geradas por enzimas, como as isoformas da óxido nítrico sintase e da NAPH oxidase, ou ainda pela cadeia transportadora de elétrons. A superprodução de ERO, decorrente da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou da estimulação excessiva da NAPH oxidase, resulta em estresse oxidativo. Em contraste, os efeitos benéficos de ERO/ERN, como do radical superóxido e do óxido nítrico, ocorrem em menores concentrações e são responsáveis por respostas celulares fisiológicas na defesa a agentes infecciosos, na manutenção do tonus vascular, no controle da ventilação pulmonar, na produção de eritropoetina, na ativação de diversas vias de sinalização celulares, na indução da resposta mitogênica e na indução da senescência celular e apoptose. (Revisado por VALKO *et al.*, 2007) (Figura 1).

Um tema comum que fundamenta a etiologia de diversas doenças degenerativas é o estresse gerado pela produção de radicais livres (VENKATARAMAN; KHURANA; TAI, 2013). As ERO são também responsáveis pelas implicações patofisiológicas de diversas doenças humanas como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, isquemia/reperfusão, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), artrite reumatóide e envelhecimento (GILCA *et al.*, 2007; UTTARA *et al.*, 2009; KRÖTZ; SOHN; POHL, 2004;).

As células de mamíferos são frequentemente expostas à uma variedade de agentes estressores, como raios ultravioleta, radiação ionizante, genotoxinas, estresse térmico e estresse oxidativo. Em resposta às

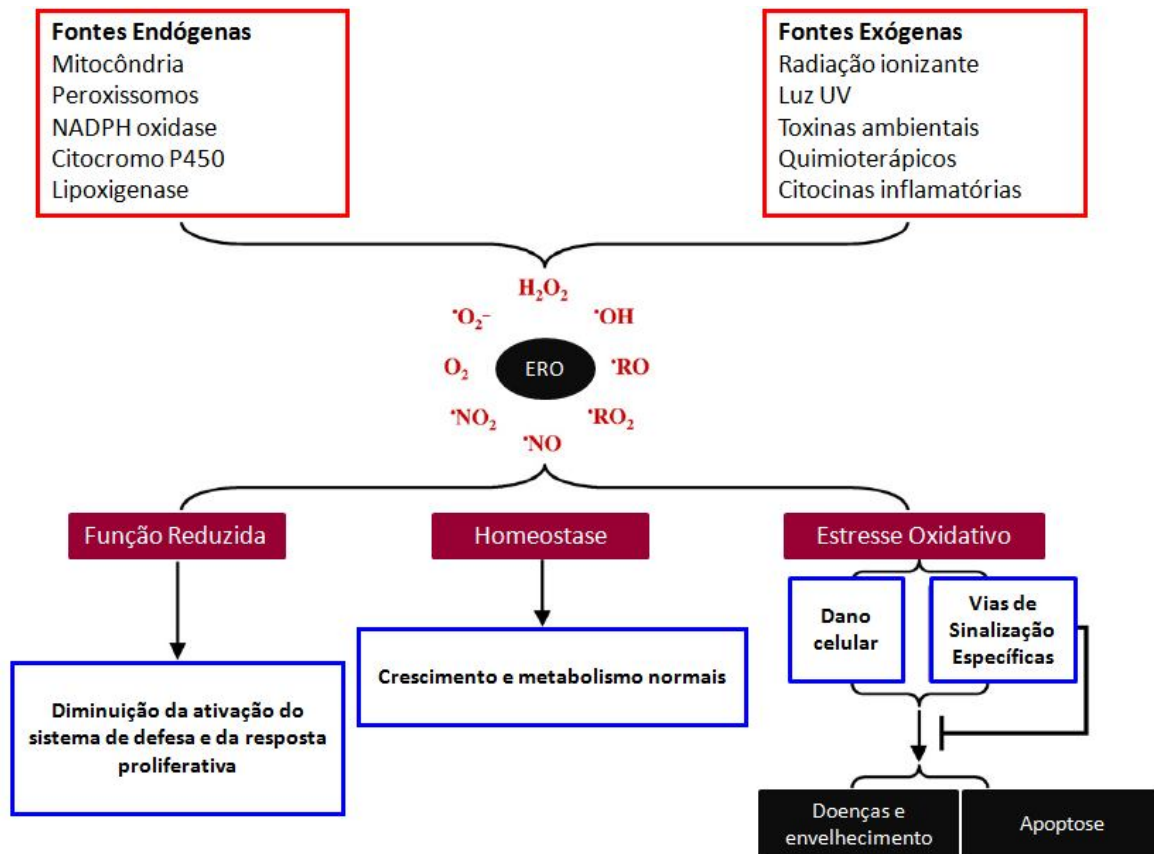


Figura 1: Efeitos biológicos das ERO. A produção de ERO é proveniente do metabolismo normal e de processos patológicos endógenos ou é estimulada por agentes tóxicos exógenos. As ERO, quando em concentrações fisiológicas, são requeridas para a função normal do organismo, enquanto a produção excessiva de ERO promove estresse oxidativo e contribui para o envelhecimento e desenvolvimento de doenças.

Fonte: adaptado de Ma, 2010.

diversas condições de estresse, os organismos eucariotos multicelulares desenvolveram algumas estratégias para tentar reparar os danos celulares causados. No entanto, se o dano for muito severo para ser reparado, as células danificadas sofrem apoptose. Esta decisão crucial entre a sobrevivência e a morte é, pelo menos em parte, mediada pelas vias de sinalização ativadas por estresse MAP quinases (Revisado por TAKEKAWA *et al.*, 2011).

Além das MAP quinases outras importantes vias de sinalização e fatores de transcrição estão envolvidos na resposta ao estresse em mamíferos, dentre elas estão Nrf-2, FOXO, e a proteína quinase II dependente de Ca^{+2} /Calmodulina.

2.2 Principais vias e fatores de transcrição ativados em resposta ao estresse em mamíferos

2.2.1 MAPKs

Muitos sinais responsivos ao estresse oxidativo ativam vias de sinalização de quinases que regulam a transcrição gênica. Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) compreendem um grande número de quinases serina/treonina envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose. As MAPKs incluem três subfamílias estruturalmente divergentes: as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), as quinases c-Jun N-terminais (JNK) e as MAP quinases p38. Cada subgrupo de MAPKs é ativado através de uma cascata de de fosforilação sequencial, começando com a ativação de quinases MAPK (MAP3Ks). As MAP3Ks fosforilam e ativam as MAPK subjacentes (MAP2Ks), que por sua vez estimulam as MAPKs através de dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina (BROWN; SACKS, 2009; BOUTROS; CHEVET; METRAKOS, 2008) (Figura 2).

Estudos têm demonstrado que as ERO podem induzir ou mediar a ativação das vias MAPK em diferentes tipos celulares e que a prevenção do acúmulo de ERO por antioxidantes bloqueia a ativação de MAPK após estímulo celular (MCCUBREY; LAHAIR; FRANKLIN, 2006; TORRES; FORMAN, 2003), indicando o envolvimento das ERO na ativação da MAPK. Além disso, a exposição direta de células ao H_2O_2 ativa a via de sinalização da MAPK. (RUFFELS; GRIFFIN; DICKENSON, 2004; DABROWSKI *et al.*, 2000). Os

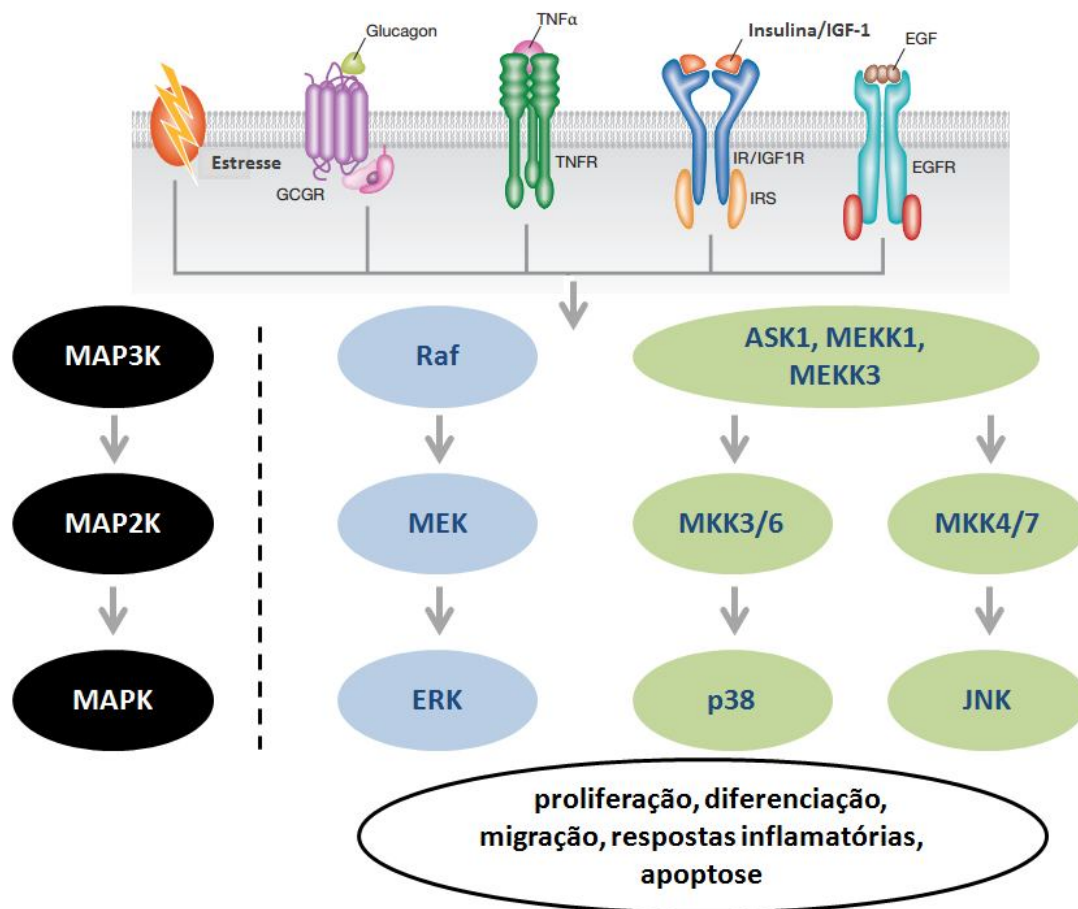


Figura 2: Cascatas de sinalização das MAPK. Existem três sub-famílias de MAPKs, que são as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), quinases c- Jun N- terminais (JNK) e a p38. A via de sinalização das MAPK medeia a resposta celular aos diferentes estímulos extra e intracelulares através de múltiplos receptores. MAP3Ks fosforilam as MAP2K, as quais, por sua vez, fosforilam as MAPKs. MAPKs ativadas fosforilam várias proteínas (como fatores de transcrição específicos), resultando em diversas respostas celulares, como proliferação, diferenciação, resposta inflamatória e apoptose. MAPK- proteína quinase ativada por mitógenos; ERK- quinase regulada por sinal extracelular; MEK- MAP/ERK quinase; Raf- quinase tipo Raf; p-38- quinase p38; MKK3/6- MAP/ERK quinase 3/6; MKK4/7- MAP/ERK quinase 4/7; JNK- quinase c- Jun N- terminal; ASK1- quinase 1 regulada por sinal de apoptose; MEKK1- MAP/ERK quinase quinase 1; MEKK3- MAP/ERK quinase quinase 3.
 Fonte: Adaptado de Son *et al.*, 2011; Gehart *et al.*, 2010..

mecanismos pelos quais as ERO podem ativar MAPKs, no entanto, não são bem definidos. ERO podem alterar a estrutura e função de proteínas modificando resíduos de aminoácidos críticos. A modificação oxidativa de proteínas de sinalização por ERO pode ser um dos mecanismos plausíveis para a ativação das vias MAPK.

Muitos fatores de crescimento e receptores de citocinas têm motivos ricos em cisteína, que podem ser alvo do estresse oxidativo e, se oxidados, ativam vias de sinalização MAPK. Meng *et al.* (2007) demonstraram que o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-I) induz a fosforilação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) e de ERK em células musculares lisas. O IGF-I estimula a produção de ERO e o tratamento com antioxidantes inibe a produção de ERO mediada por IGF-1, bem como a ativação do receptor de EGF e da via ERK, indicando que o IGF-1 ativa a via de sinalização ERK através da ativação do EGF mediada por ERO.

As ERO também podem ativar a via MAPK através da modificação oxidativa de quinases intracelulares, como as MAP3Ks, que estão envolvidas na cascata de sinalização MAPK (NAGAI *et al.*, 2007). Finalmente, outro mecanismo potencial para ativação da via MAPK por ERO envolve a inativação de fosfatases de MAPK que mantêm a via em um estado inativo. Kamata *et al.* (2005) demonstraram que o acúmulo intracelular de H₂O₂ inativa fosfatases da MAPK pela oxidação de seu resíduo de cisteína catalítico, o que leva a ativação continuada da via JNK.

2.2.2 Nrf-2

Em vertebrados, a maior defesa contra o estresse oxidativo é orquestrada pelos fatores de transcrição Nrf1/2 (XU, LI; KONG, 2005; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2004; HAYES; MCMAHON, 2001). Nrf2 (fator nuclear eritróide 2), um membro dos fatores de transcrição zíper de leucina, é essencial para a indução coordenada de genes que codificam enzimas citoprotetoras ou de resposta ao estresse e proteínas relacionadas, tais como a NAD(P)H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx), heme oxigenase-1 (HO-1), catalase e tioredoxina (Revisado por MA, 2008).

Nas células em repouso, Nrf2 localiza-se no citoplasma, formando um complexo inativo com o repressor Keap-1, que está ancorado à actina do citoesqueleto. Sob condições de estresse oxidativo ou eletrofílico, Nrf2 é fosforilado e transloca-se para o núcleo. Após a migração para o núcleo, Nrf2 sofre uma combinação heterodimérica com outros fatores de transcrição, como as pequenas proteínas MAFs e liga-se à sequência de ativação reguladora 5', denominada elemento de resposta antioxidante (ARE) ou elemento de resposta à eletrófilo (EpRE), localizada na região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes/detoxificantes (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; SURH; KUNDU; NA, 2008; TULLET *et al.*, 2008; ZHANG, 2006).

Já foi descrito que Nrf2 pode ser ativado por diferentes vias de sinalização. As vias das proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) e proteína quinase C (PKC) facilitam a translocação nuclear e a ativação transcricional de genes alvos de Nrf2. Por outro lado, a glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β) regula negativamente a sinalização de Nrf2 através da fosforilação dos resíduos de tirosina ou serina (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008) (Figura 3).

2.2.3 Proteínas FOXO

Outro fator de transcrição conhecido por seu papel nas respostas celulares, incluindo metabolismo de glicose, ciclo celular, detoxificação de ERO, reparo do DNA e apoptose (KITAMURA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2005; HRIBAL *et al.*, 2003; NAKAE *et al.*, 2003), pertence à família das proteínas FOXO. A atividade das proteínas FOXO é regulada por modificação pós-transcricional, incluindo a fosforilação, acetilação e mono/poliubiquitinação, resultando na alteração da localização subcelular, estabilidade proteica, ligação ao DNA e atividade transcricional (Revisado por SALIH; BRUNET, 2008). Mamíferos apresentam quatro isoformas da família do fator de transcrição FOXO, FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6.

Três destas isoformas, FOXO1, FOXO3 e FOXO4 são reguladas pela fosforilação dependente de AKT em três sítios específicos em resposta à estimulação pela insulina e fatores de crescimento. A fosforilação dos fatores FOXO pela AKT promove a ligação de FOXO às proteínas 14-3-3 no citosol,

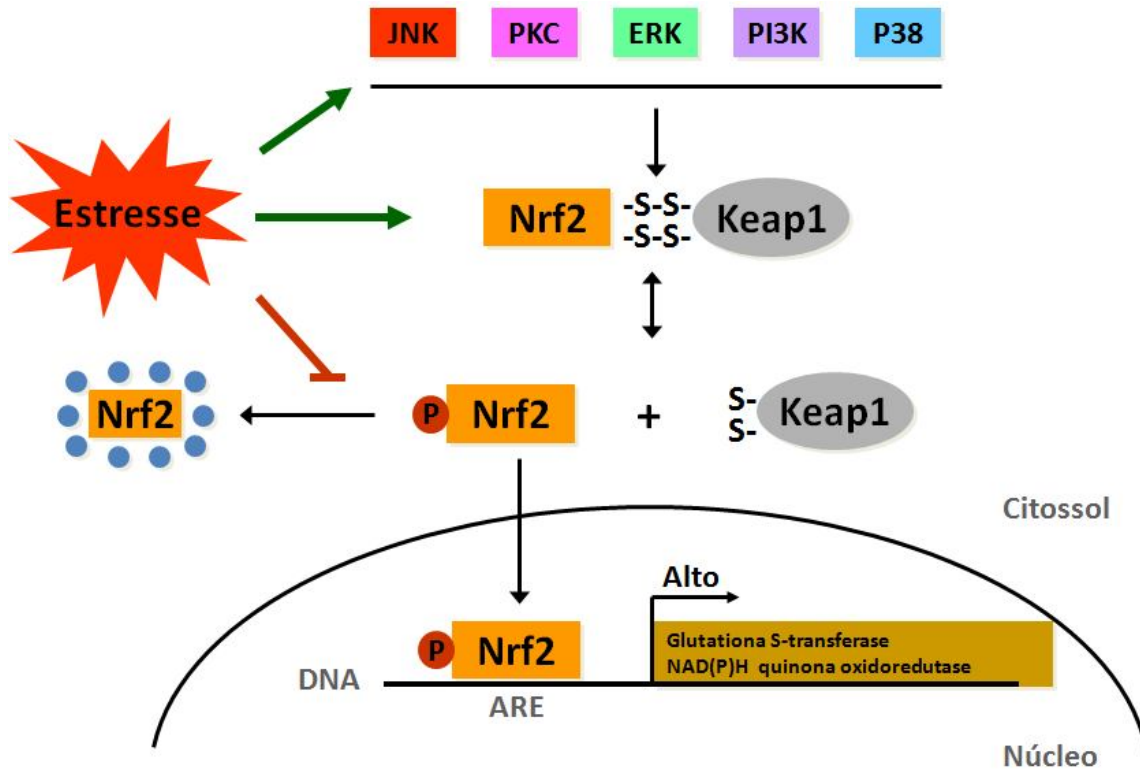


Figura 3: Modelo de ativação de Nrf-2 mediada por estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode agir diretamente no complexo Nrf-2-Keap-1, ou alternativamente ativar as quinases PI3K, p38, ERK, PKC e JNK, causando a liberação de Nrf-2 do seu estado inibitório. O fator de transcrição Nrf-2 ativado, transloca-se para o núcleo, onde este liga-se ao elemento responsivo ao estresse (ARE) na região promotora de genes alvo, tais como genes antioxidantes ou de detoxificação de fase 2. JNK- quinase c- Jun N-terminal; PKC- proteína quinase C; ERK- quinase regulada por sinal extracelular; p38- quinase p38; PI3K- fosfatidilinositol-3 quinase; Keap- proteína proteassomal independente de ubiquitina; Nrf-2- fator nuclear eritóide 2.

Fonte: Adaptado de Son; Camandola; Mattson, 2008.

inibindo a translocação de FOXO para o núcleo, e conseqüentemente a sua função transcricional. A insulina/IGF-1 e os fatores de crescimento inibem FOXO através de PI3K/AKT. Em contrapartida, em resposta ao estresse, a via JNK fosforila diretamente FOXO ativando a sua localização nuclear (Revisado por YEN; NARASIMHAN; TISSENBAUM, 2011) (Figura 4). Além da via PI3K/AKT e JNK, os fatores FOXO são diretamente regulados pela desacetilase SIRT1 (VAN DER HORST *et al.*, 2004; BRUNET *et al.*, 2004). O aumento da atividade transcricional de FOXO aumenta a expressão gênica de genes de detoxificação, como *cat* e *sod-2* e, portanto, aumenta a detoxificação de ERO (KOPS *et al.*, 2002).

2.2.4 Proteína quinase II dependente de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKII)

A Proteína quinase II dependente de Ca²⁺/Calmodulina é uma quinase serina/treonina multifuncional, sendo que a atividade enzimática desta proteína depende do seu estado estrutural. Esta quinase é uma proteína multimérica que consiste de doze subunidades. Cada subunidade contém três domínios distintos: um domínio de associação que direciona a conformação da holoenzima; um domínio regulatório que controla a ativação da enzima; e, um domínio catalítico que interage com o substrato e exerce a função quinase (revisado por SONG; 2013).

No estado inativo, os domínios catalítico e regulatório da CaMKII encontram-se associados. Esta estrutura conformacional impede a ligação do substrato ao domínio catalítico, resultando na autoinibição da atividade enzimática. Quando a concentração intracelular de cálcio aumenta, ocorre também um aumento da ligação de cálcio/calmodulina no domínio regulatório da CaMKII o que favorece a dissociação dos domínios catalítico e regulatório, levando a uma mudança conformacional que expõe o domínio catalítico para interação com o substrato, induzindo a atividade quinase da enzima. Esta ativação de CaMKII por Ca²⁺/CaM é transiente e reversível, uma vez que a calmodulina torna-se imediatamente descalcificada quando a concentração intracelular de cálcio retorna ao nível basal. A descalcificação da calmodulina causa uma dissociação da calmodulina da CaMKII, reestabelecendo o seu estado conformacional inativo (RELLOS *et al.*, 2010) (Figura 5).

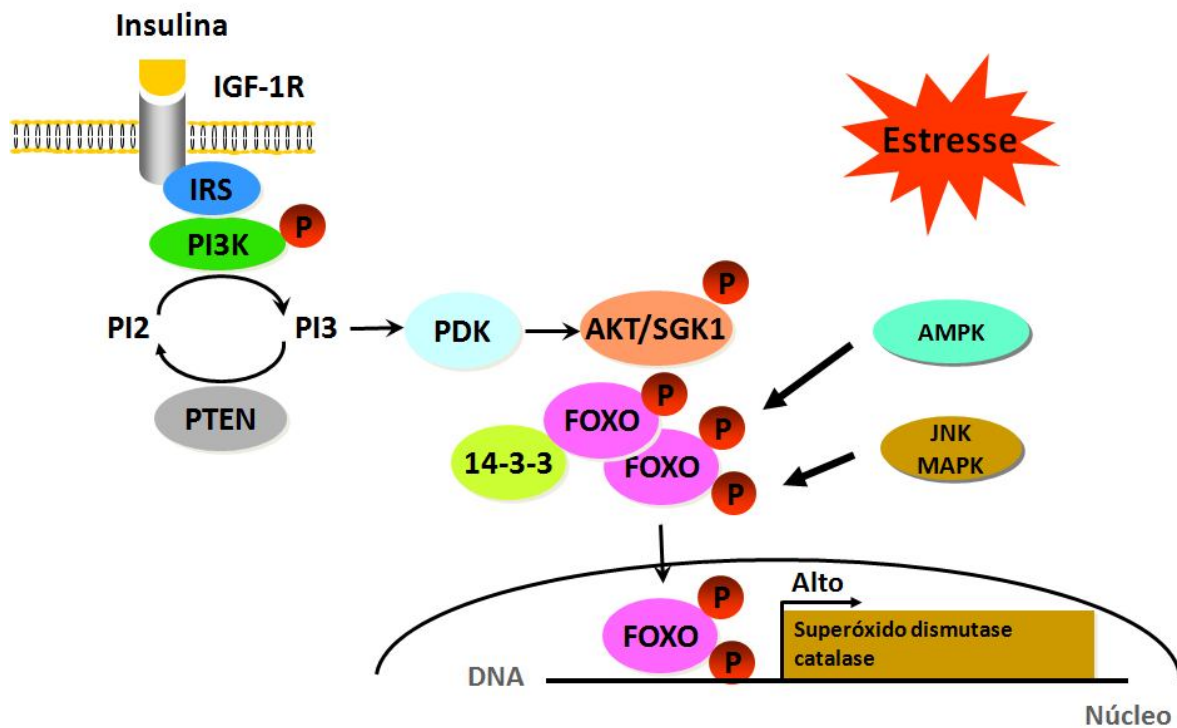


Figura 4: Modelo de regulação de FOXO pela via da insulina e por estresse oxidativo. A via de sinalização da insulina, quando ativada, fosforila FOXO em um sítio específico que favorece a sua ligação a uma proteína citosólica, impedindo a sua translocação para o núcleo. O estresse oxidativo ativa vias de sinalização que fosforilam FOXO em outros sítios específicos, desfavorecendo a interação com a proteína citosólica e ativando a translocação nuclear. No núcleo, FOXO liga-se à região promotora de genes alvo envolvidos na detoxificação de fase 2 e na resposta antioxidante. IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina; IRS- substrato do receptor de insulina; PI3K- fosfatidilinositol-3 quinase; PI2- fosfatidilinositol-2; PI3- fosfatidilinositol-3; PTEN- proteína fosfatase e tensina homóloga; PDK- proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo; AKT- proteína quinase B; SGK1- quinase 1 regulada por glicocorticoide; AMPK- quinase dependente de AMP; JNK- quinase c- Jun N-terminal; MAPK- proteína quinase ativada por mitógenos; FOXO- proteínas *forkhead box*.

Fonte: Yen; Narasimhan; Tissenbaum, 2011.

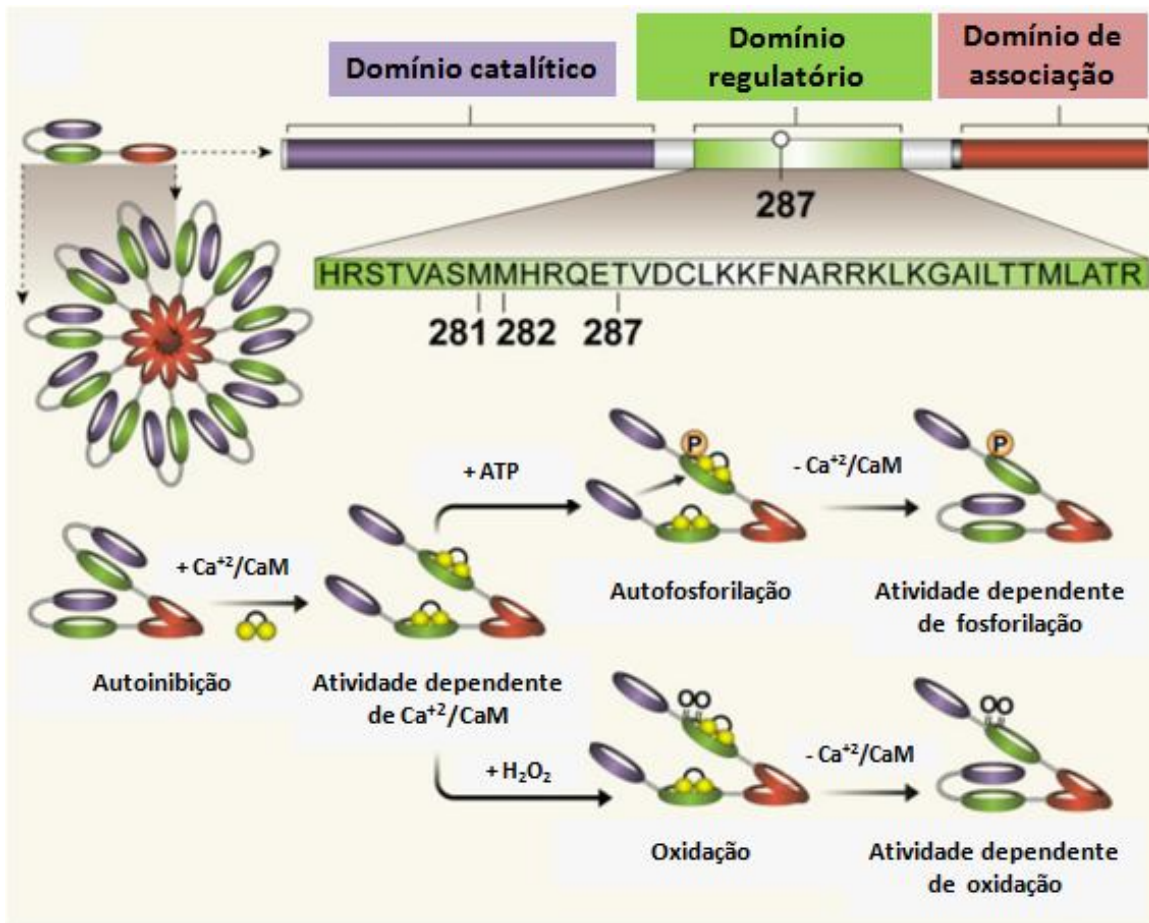


Figura 5: Regulação da ativação da Proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII). Tanto a oxidação quanto a autofosforilação podem converter a CaMKII em uma enzima independente de Ca^{2+} /CaM através de modificações em resíduos de aminoácidos específicos no domínio regulatório da CaMKII.

Fonte: Adaptado de Erickson *et al.*, 2011.

Recentemente foi demonstrado que a CaMKII pode ser ativada pelo *status* redox celular. Este fato pode ser exemplificado pela ação do sistema renina angiotensina aldosterona, que está associado à oxidação e aos processos inflamatórios no coração. Um aumento dos níveis de ERO causa a modificação oxidativa em um par de metioninas nos resíduos 281 e 282 no domínio regulatório da enzima CaMKII, bloqueando a reassociação entre os domínios catalítico e regulatório e, conseqüentemente, preservando a sua atividade catalítica (ERICKSON *et al.*, 2008). Os autores sugeriram que o estresse oxidativo é o principal fator para ativação de CaMKII induzida por angiotensina II com a conseqüente indução dos danos cardíacos.

2.3 Ação de compostos antioxidantes naturais

Antioxidantes são substâncias vitais porque podem proteger o organismo dos danos causados pelo estresse oxidativo. Eles podem exercer seus efeitos removendo radicais livres presentes nos sistemas biológicos, atuando desta forma de maneira direta, como também podem ativar vias de sinalização celular em resposta ao estresse agindo, neste caso, de maneira indireta (RATNAM *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que compostos antioxidantes apresentam propriedades anti-inflamatórias, antiateroscleróticas, antitumorais, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antibacterianas e antivirais em maior ou menor extensão (SALA *et al.*, 2002; OWEN *et al.*, 2000; MITSCHER *et al.*, 1996). Muitos antioxidantes sintéticos, tais como o hidroxianisol butilado (BHA) são muito efetivos. No entanto, eles possuem efeitos adversos e são tóxicos para humanos (LABRADOR *et al.*, 2007). Desta forma, compostos, especialmente aqueles provenientes de fontes naturais capazes de proteger contra o dano mediado por ERO, podem ter aplicações potenciais na prevenção de doenças humanas.

Evidências epidemiológicas demonstram que dietas ricas em frutas e vegetais promovem a saúde e atenuam, ou retardam o começo de doenças cardiovasculares por apresentarem substâncias antioxidantes, as quais podem ajudar na prevenção ao dano oxidativo (AKINMOLADUN; OBUOTOR; FAROMBI, 2010; HOLT *et al.*, 2009). Esses efeitos benéficos de frutas e vegetais têm sido largamente conferidos aos polifenóis (flavonóides e taninos),

uma vez que a ingestão de alimentos ricos em polifenóis está associada, em modelos experimentais humanos e animais, com diminuição em: i) dislipidemias e aterosclerose; ii) disfunção endotelial e hipertensão; iii) ativação da placa aterosclerótica e trombose; iv) processos inflamatórios associados com a indução e perpetuação da doença cardiovascular (BERTELLI; DAS, 2009).

Terpenóides e flavonóides apresentam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (MU *et al.*, 2007), saponinas e taninos apresentam propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (LAI *et al.*, 2010) e além destas, possuem consideráveis propriedades anticancerígenas (SUR *et al.*, 2001). Plantas que contêm alcalóides têm sido utilizadas por humanos há séculos com fins terapêuticos. Os alcalóides são conhecidos por suas atividades antimaláricas, antimicrobianas e citotóxicas (OLOYEDE *et al.*, 2010). Compostos com atividade citotóxica são potencialmente interessantes por si só ou por levarem ao desenvolvimento de novos fármacos promissores no tratamento do câncer, bem como fármacos que combatam parasitas e infecções virais. Extratos de plantas que contenham estes compostos podem servir como uma fonte potencial de substâncias bioativas na prevenção de desordens causadas pela geração de radicais livres.

O conhecimento recente sobre os mecanismos pelos quais compostos dietéticos fenólicos apresentam um papel na prevenção de patologias degenerativas foi revisado por Crozier *et al.*, (2009). Em particular, as complexas interações entre estas moléculas dietéticas e seus alvos moleculares ativam vias de sinalização em resposta celular, entre elas a via de sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B), a proteína ativadora 1 (AP-1), enzimas de detoxificação de fase 2 e Nrf, além da via de sinalização das MAPKs (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

As vias de sinalização celular ativadas por compostos naturais dietéticos são numerosas e diferentes para compostos diferentes. Além disso, o mesmo composto pode ativar diferentes vias de sinalização dependendo do tipo celular. Múltiplos receptores de fatores de crescimento [receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR)] são ativados na

superfície celular durante a gênese tumoral. A ativação destes receptores conseqüentemente ativa uma cascata de outras vias de sinalização celular. Dentre essas vias, as vias Ras-MAPK (como ERK e JNK), a via da quinase Janus- tradutores de sinal e ativadores da transcrição (JAK-STAT), PI3K/AKT e NF-κB são importantes e são alvos de agentes quimiopreventivos naturais (Revisado por AMIN *et al.*, 2009).

Alguns agentes naturais inibem receptores na superfície celular tanto pela desfosforilação quanto por induzir a degradação destes, o que então modula vias de sinalização importantes para proliferação, angiogênese e apoptose. Existem ainda compostos naturais que geram espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, ativam membros da família p53 e induzem uma parada no ciclo celular, o que conseqüentemente também favorece a apoptose. As principais vias de sinalização inibidas por compostos naturais são AKT, ERK, o fator de transcrição NF-κB e a via das proteínas ativadas por estresse/quinases ativadas por mitógenos (SAP/MAPK) (Revisado por AMIN *et al.*, 2009).

Vários compostos naturais como o resveratrol, tangeretina e ligustilide inibem a via de sinalização SAP/MAPK *in vitro*. Além disso, uma nova geração de pequenas moléculas inibidoras de SAP/MAPK que demonstram especificidade por JNK, ERK e pelas isoformas da quinase p38 têm sido promissoras em estudos animais e poderiam eventualmente provar a eficácia destes compostos no tratamento de doenças humanas (Revisado por MALEMUD, 2007).

Polifenóis do cacau (flavonóides e procianidinas) podem exibir atividade antioxidante e anti-inflamatória, assim como atividade antiaterogênica. Vários alvos moleculares (como NF-κB, óxido nítrico sintase induzível- iNOS e a enzima conversora de angiotensina) têm sido recentemente identificados em experimentos com cultura de células *in vitro* e em estudos em modelos animais *in vivo*, juntamente com triagens em humanos, provando que a presença de flavonóides e procianidinas podem, em parte, explicar os efeitos cardiovasculares benéficos do cacau, mesmo em pó, como chocolate, ou provindo de diferentes bebidas ricas em flavonóides (RIMBACH *et al.*, 2009).

Recentemente, o açaí tem sido considerado como uma nova “super fruta”. A composição fitoquímica do açaí, principalmente os constituintes

polifenólicos, incluindo as antocianinas e proantocianidinas, tais como as cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, e outros flavonóides (SCHAUSS *et al.*, 2006b) lhe conferem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (POULOSE *et al.*, 2012; HOGAN *et al.*, 2010). Este fato tem despertado o interesse comercial de indústrias alimentícias na fabricação de produtos formulados com a fruta (FOODBIZ, 2009; ENGELS, 2010). Vários estudos têm demonstrado o alto potencial antioxidante do açaí e também seu possível papel como alimento funcional e/ou suplemento alimentar (RIBEIRO *et al.*, 2010; SCHRECKINGER *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2008; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008; COÏSSON *et al.*, 2005).

2.4 O açaí

A espécie *Euterpe oleracea Mart.* é uma palmeira nativa da América do Sul e está presente em abundância na região Amazônica. Esta espécie encontra-se entre as espécies de palmeira mais importantes economicamente na região. Os frutos são popularmente conhecidos como açaí, os quais apresentam em sua constituição proteínas, lipídeos e açúcares totais. São também ricos em compostos fenólicos, ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, fitoesteróis, fibras, ligninas, além de fosfato, magnésio, cálcio, fósforo, sódio e vitaminas E e B₁ (SCHAUSS *et al.*, 2006b).

Atualmente, tem sido considerado um dos principais produtos do estuário amazônico exportado para outras regiões do mundo. O crescimento do mercado internacional do açaí é atribuído à indústria de bebidas e produtos correlatos (MENEZES *et al.*, 2008), onde muita atenção tem sido dada à sua capacidade antioxidante e aos seus benefícios associados à saúde.

2.4.1 Propriedades antioxidantes

O açaí apresenta alta capacidade antioxidante *in vitro*, especialmente contra radical peroxil e ânions superóxido (SPADA *et al.* 2008; SCHAUSS *et al.*, 2006a), tendo menor capacidade contra radicais peroxinitrito e hidroxila (LICHTENTHALER *et al.*, 2005). Existe uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante do açaí e sua composição de antocianinas e compostos fenólicos totais (SANTOS *et al.*, 2008). Spada *et al.* (2008) demonstraram que a polpa do açaí possui atividade antioxidante *in vitro* contra

o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e com atividade removedora de ERO semelhante à da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Jensen *et al.* (2008) analisaram o efeito antioxidante da bebida MonaVie, cujo principal componente é o açaí. Esta bebida além de conter altos níveis de cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo, também diminui a produção de ERO em células polimornucleares incubadas com H₂O₂.

A capacidade antioxidante do açaí também foi avaliada em tecidos isolados do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos. Tecidos tratados somente com açaí não apresentaram alteração dos parâmetros avaliados em relação aos tecidos não tratados (SPADA *et al.*, 2009). No entanto, o pré-tratamento com açaí reduziu o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em lipídios e proteínas e a atividade das enzimas SOD e CAT a níveis basais em todos os tecidos avaliados. Além disso, neutrófilos de ratos suplementados com 2% de açaí na dieta apresentaram redução da produção de ERO em relação a neutrófilos de animais controle (GUERRA *et al.*, 2011).

A cianidina e os seus glicosídeos relacionados têm sido indicados como candidatos promissores a compostos dietéticos com potencial papel benéfico na saúde humana. Eles representam a maior classe de compostos hidrossolúveis presentes em plantas, sendo também as principais antocianinas encontradas na polpa de açaí, onde eles são responsáveis pela coloração (vermelha, laranja e azul) das frutas e flores. Além disso, por serem compostos naturais presentes em vários alimentos, tais como vegetais, frutas e vinhos vermelhos são amplamente ingeridos na dieta.

Acquaviva *et al.* (2003) demonstraram que a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo tiveram efeito protetor sobre o DNA, apresentaram atividade sequestradora de radicais livres de maneira dose dependente e inibiram significativamente a atividade da xantina oxidase. A cianidina-3-glicosídeo, a qual tem sido identificada como a principal antocianina do suco de amora, demonstrou em *in vitro* capacidade removedora de peroxinitrito e exerceu proteção contra o dano vascular induzido por peroxinitrito testado em células endoteliais da veia umbilical de humanos (SERRAINO *et al.*, 2003).

Duthie *et al.* (2005) investigaram as consequências da deficiência de vitamina E sobre o dano oxidativo ao DNA e a lipídios e o efeito citoprotetor de níveis nutricionalmente relevantes de cianidina-3-glicosídeo (100 mg/Kg; 12

semanas) tanto *in vivo*, utilizando ratos como modelo animal, quanto *in vitro* utilizando colonócitos humanos. Os autores observaram que a cianidina-3-glicosídeo protege contra o dano oxidativo ao DNA *in vitro*, no entanto, a mesma não diminui a lipoperoxidação nem o dano ao DNA em ratos.

Um estudo recente demonstrou que a antocianina cianidina-3-glicosídeo, uma das principais antocianinas presentes no açaí, inibe a citotoxicidade induzida pela acrilamida, diminui a produção de ERO e previne a depleção de glutatona, além de diminuir a atividade das enzimas glutatona peroxidase e glutatona-S-transferase em células de câncer de mama MDA-MB-231. Os autores concluíram que a cianidina-3-glicosídeo exerce um papel protetor contra o estresse oxidativo induzido pela acrilamida (SONG *et al.*, 2013)

O tratamento com extrato de açaí também exerce efeitos benéficos contra o estresse induzido por dietas hiperlipídicas (DE SOUZA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram que a suplementação da dieta com a polpa de açaí melhora biomarcadores de estresse oxidativo e o perfil lipídico no soro de ratos hipercolesterolêmicos (DE SOUZA *et al.*, 2010) e que aumenta a longevidade de moscas alimentadas com dieta rica em gordura através da ativação transcricional de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, como a glutatona-S-transferase (SUN *et al.*, 2010). Esse efeito pró-longevidade também parece estar associado à diminuição da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pepck), enzima chave do controle da gliconeogênese e gliceroneogênese e modulada pelo fator de transcrição FOXO. Em um outro estudo, o tratamento com a polpa de açaí promoveu o envelhecimento saudável e reduziu o dano oxidativo em moscas deficientes para SOD-1 (LASLO *et al.*, 2013).

Além disso, estudos têm demonstrado que o açaí promove a melhora nos marcadores de risco para a síndrome metabólica. Os elevados níveis de colesterol total e colesterol não HDL, bem como o índice aterogênico de ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, foram reduzidos após suplementação da dieta com polpa de açaí (DE SOUZA *et al.*, 2010). A administração a longo prazo do extrato da semente de açaí preveniu o aparecimento das características fenotípicas e bioquímicas induzidas pela síndrome metabólica em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica

em gordura (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). O suco de açaí apresentou efeito protetor contra aterosclerose em camundongos hiperlipidêmicos, deficientes para apolipoproteína E e alimentados com dieta rica em gordura (XIE *et al.*, 2011) e melhorou significativamente o perfil lipídico e a aterosclerose em ratos alimentados com dieta rica em colesterol (FEIO *et al.*, 2012). Recentemente, de Souza *et al.*, (2012) demonstraram que o efeito hipocolesterolêmico do açaí em ratos é mediado pelo aumento da expressão de genes que codificam para proteína ligadora de ATP, para os transportadores 5 e 8 da subfamília G e para o receptor da lipoproteína de baixa densidade.

2.4.2 Propriedades anti-inflamatórias

Além de apresentar propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, o açaí também apresenta propriedade anti-inflamatória como demonstrado pela sua habilidade em inibir a atividade das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 em cultura de células (SCHAUSS *et al.* 2006a).

Um estudo demonstrou que o extrato de açaí protege células endoteliais da veia do cordão umbilical humano contra o estresse oxidativo e a inflamação mediados por glicose através da redução da expressão de interleucina-6 e 8 (IL-6 e IL-8). Além disso, o tratamento com açaí inibiu a expressão de moléculas de adesão e a ativação do fator NF- κ B após indução de inflamação por lipopolissacarídeo (NORATTO *et al.*, 2011). Estudos recentes têm demonstrado que alguns flavonóides são moduladores da produção de citocinas pró-inflamatórias. Xie *et al.* (2011) demonstraram que a Velutina, uma flavona isolada da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) reduziu a produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-6 em macrófagos periféricos RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongo. Além disto, este composto também demonstrou forte efeito inibitório na ativação do fator nuclear NF- κ B e no bloqueio da degradação do inibidor deste mesmo fator, bem como inibiu a fosforilação das quinases p38 e JNK (XIE *et al.*, 2011). Estas quinases participam de importantes vias de sinalização envolvidas na produção de TNF- α e IL-6. Desta forma, este trabalho contribuiu para a descoberta de um composto com alta capacidade anti-inflamatória presente na polpa de açaí.

Extratos da polpa de açaí, particularmente os extratos metanólicos, etanólicos e as frações acetato de etila, também exerceram um papel protetor

em células microgлияis do cérebro de camundongos. Essa proteção foi acompanhada por uma redução de COX-2, p38 MAPK, TNF- α e NF- κ B de maneira dose-dependente (POULOSE *et al.*, 2012).

A presença do extrato de açaí em cigarros teve um efeito protetor contra o enfisema em camundongos. 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 aos animais tratados somente com fumaça de cigarro. Os autores também observaram uma redução da atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima marcadora do influxo de neutrófilos e dano pulmonar (DE MOURA *et al.*, 2011).

2.4.3 Propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas

Além dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, várias pesquisas apontam que o açaí também possui efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos. 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; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Ding *et al.* (2006) demonstraram que a cianidina 3-glicosídeo possui propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas. Em cultura de células, a cianidina-3-glicosídeo reduz a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por radiação ultravioleta enquanto, *in vivo*, o tratamento com esta antocianina diminui o número de tumores de pele malignos e benignos induzidos por tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (DING *et al.*, 2006).

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 95,2% sobre a proliferação celular (PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT *et al.* 2010; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008). Hogan *et al.* (2010) mostraram que um extrato enriquecido em antocianinas, obtido a partir da polpa de açaí, mas não de mirtilo, morango, framboesa e outros, apresentou grande capacidade antiproliferativa em células de glioma cerebral C6. A análise da fragmentação do DNA indica que este efeito pode ser devido à indução da apoptose nas células C6 após tratamento com o 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.

2.4.4 Benefícios do açaí para a saúde humana

Apesar de ainda escassos, estudos clínicos têm sido realizados para avaliar os efeitos do consumo do açaí em humanos (UDANI *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2008; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008). Jensen *et al.* (2008) realizaram um ensaio randomizado, duplo-cego, com doze indivíduos saudáveis, no qual o consumo de 120 mL da bebida contendo açaí em sua composição aumentou a capacidade antioxidante e inibiu a peroxidação lipídica no plasma dos indivíduos testados após intervalo de duas horas do consumo.

Outro estudo clínico realizado em doze indivíduos saudáveis demonstrou que o consumo de uma única dose de açaí (7mL/Kg de peso) aumentou a capacidade antioxidante do plasma em até 2,3 e 3 vezes para o suco e polpa de açaí, respectivamente. As antocianinas foram quantificadas no plasma durante um período de 0 a 12 horas após o 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).

Um estudo piloto realizado com 10 adultos com sobrepeso mostrou 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 os níveis insulina. Além disso, os autores observaram uma redução do colesterol total, bem como da fração não HDL e da relação colesterol total/colesterol HDL (UDANI *et al.*,2011). Com o objetivo de avaliar as propriedades anti-inflamatórias do açaí, um estudo piloto foi realizado com quatorze pacientes com problemas de dores e locomoção. Os autores verificaram se o consumo de MonaVie estaria associado ao alívio da dor nestes indivíduos (JENSEN *et al.*, 2011). Neste estudo, os autores observaram que além de melhorar significativamente a dor e a execução das atividades diárias, o consumo deste suco, também melhorou o *status* antioxidante do soro, reduziu a peroxidação lipídica e a proteína C reativa que é um marcador inflamatório.

Estudos epidemiológicos são essenciais para avaliação dos benefícios de compostos naturais para a saúde humana. No entanto, previamente aos estudos clínicos, para identificar um composto natural com propriedades biológicas de interesse, é necessário investigar as suas propriedades tanto *in vitro*, como avaliar as suas funções *in vivo*. Neste trabalho o *C. elegans* foi utilizado como organismo modelo para a caracterização das propriedades antioxidantes e dos possíveis mecanismos subjacentes do açai *in vivo*.

2.5 O *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

O *Caenorhabditis. elegans* é um nematodo terrestre de vida livre componente da família Rhabditidae que durante as últimas três décadas se tornou um organismo modelo para o estudo de comportamento, fisiologia e genética animal. Entre as várias características notáveis do *C. elegans* estão: a abundância de recursos genômicos, incluindo o genoma completamente sequenciado (*C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM*, 1998), um banco de dados de bioinformática facilmente acessível (CHEN *et al.*, 2005), microarranjos de DNA (REINKE, 2002), um consórcio de construção de mutantes “knock-out” (<http://celeganskoconsortium.omrf.org>), e a capacidade para análise de perda de função por silenciamento gênico através de RNAi de maneira rápida e em larga escala (SUGIMOTO, 2004). Estes recursos, associados ao fato de que cerca de 60-80% de genes homólogos aos humanos foram identificados no *C. elegans* (KALETTA; HENGARTER, 2006), têm ajudado a compreender vários processos biológicos comuns a todos os animais, como o metabolismo xenobiótico e o envelhecimento.

2.5.1 *C. elegans* como um organismo modelo para triagem de compostos com propriedades biológicas

O *C. elegans*, por ser um organismo multicelular com sistemas fisiológicos conservados e por apresentar um tempo de vida curto, tem sido amplamente utilizado nos estudos de longevidade e toxicidade (BRENNER, 1974; CORSI, 2006). Nesses estudos o *C. elegans* é um organismo modelo vantajoso de se utilizar como biossensor, uma vez que ele dispõe de um sistema sensorial e de resposta contra compostos xenobióticos que facilita: 1) Detectar e avaliar compostos tóxicos; 2) Descobrir compostos que reduzem ou

neutralizam compostos tóxicos; 3) Descobrir compostos que melhoram a saúde ou aumentam a longevidade (HASEGAWA *et al.*, 2010).

É um excelente modelo para triagem rápida de compostos naturais ou sintéticos com propriedades biológicas. Ele apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de forma sistêmica. 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 ao fato de que no caso do *C. elegans*, o requerimento de animais não é limitante, uma vez que eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato onde podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias. Estas vantagens permitiram o desenvolvimento de estratégias de alta demanda (“high throughput”) para identificação de compostos que alteram a longevidade do *C. elegans* (FITZGERALD *et al.*, 2009).

Do ponto de vista toxicológico o *C. elegans* é sensível a uma ampla gama de substâncias, incluindo metais pesados, fosfatos orgânicos e pesticidas (SCHOUDEST *et al.*, 2009; LEUNG *et al.*, 2008). Vários estudos já demonstraram que o *C. elegans* é utilizado como modelo para o teste rápido da toxicidade de amostras de solo e água, bem como de compostos farmacêuticos e fitoquímicos (SCHOUDEST *et al.*, 2009). Os parâmetros mais relevantes para a triagem toxicológica são a mortalidade (DENG; VAN MEEL, 2004), a longevidade, o comportamento/movimento, a alimentação, o crescimento e a reprodução (ANDERSON; BOYD; WILLIAMS, 2001). Para os ensaios de mortalidade ou comportamento/movimento, normalmente utiliza-se uma incubação curta de 24 ou 48 horas (SCHOUDEST *et al.*, 2009). Mudanças no comportamento bem caracterizadas também podem ser avaliadas, pois o *C. elegans* se move tipicamente de maneira sinusóide em placas com ágar enquanto se alimentam de bactéria. Desta forma, a análise de compostos que alteram tanto o movimento sinusóide quanto o batimento faríngeo dos animais podem ser avaliados (HELMCKE *et al.*, 2009).

Os ensaios para avaliar toxicidade também podem ser realizados em animais transgênicos. Cepas transgênicas contendo o gene repórter sob o controle transcricional do promotor do gene “heat shock” *hsp-16* foram

amplamente utilizadas para medir a resposta ao estresse associado à toxicidade de metais pesados, compostos farmacêuticos e amostras ambientais (ROH; LEE; CHOI, 2006; DENG; VAN MEEL, 2004; DAVID *et al.*, 2003; MUTWAKIL *et al.*, 1997). Animais transgênicos contendo a região promotora do gene *gst-4* (glutathione-S-transferase 4) fundido ao gene *gfp* têm sido utilizados como biossensor da acrilamida, uma substância neurotóxica presente em alimentos (HASEGAWA *et al.*, 2007; HASEGAWA *et al.*, 2008) e como biossensor de estresse oxidativo (HASEGAWA *et al.*, 2010).

Ainda dentro do contexto das análises de toxicidade, o *C. elegans* também tem sido usado como modelo biológico para a triagem de novos compostos com atividades de interesse médico, tais como atividade antifúngica (OKOLI *et al.*, 2009; TAMPAKAKIS; OKOLI; MYLONAKIS, 2008; BREGER *et al.*, 2007; EASTON; GUVEN; DE POMERAI, 2001), antihelmíntica e nematocida (WATERMAN *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2009; SAMOYLENKO *et al.*, 2008). Dentre algumas publicações mais recentes, foram identificados 12 novos compostos que prolongam a sobrevivência do *C. elegans* infectado com *Candida albicans* (OKOLI *et al.*, 2009).

No extremo oposto aos estudos de toxicidade, vários pesquisadores utilizaram o *C. elegans* como biossensor para descobrir compostos sintéticos e naturais que aumentam a longevidade. Entre eles podemos citar a metformina, biguanidina usada para tratamento de diabetes tipo 2 (ONKEN; DRISCOLL, 2010), os anticonvulsantes etosuximida, trimetadiona e ácido valpróico (EVASON *et al.*, 2008; EVASON *et al.*, 2005), o antidepressivo 3,3-dietil-2-pirrolidona (PETRASCHECK; YE; BUCK, 2007), vitamina E (ADACHI; ISHII, 2000), extratos de mirtilo, “blueberry”, ricos em polifenóis (WILSON *et al.*, 2006), extrato de *Ginkgo biloba*, rico em glicosídeos e terpenóides (KAMPKÖTTER *et al.*, 2007b), a quercetina, flavonóide abundante em plantas comestíveis (PIETSCH *et al.*, 2009), o resveratrol, polifenol abundante nas cascas de uva (BASS *et al.*, 2007) e os isotiocianatos, sulforafano e alil isotiocianato (HASEGAWA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.6 Vias de sinalização celular envolvidas na resposta ao estresse em *C. elegans*

Assim como em mamíferos, o *C. elegans* possui tanto o sistema de detoxificação de fase 1 (citocromo p450) quanto o de fase 2 (MENZEL *et al.*, 2005; AN; BLACKWELL., 2003). No *C. elegans*, a resistência ao estresse oxidativo é controlada, em parte, por dois principais fatores de transcrição: SKN-1/Nrf e DAF-16/FOXO que ativam a expressão dos genes de detoxificação de fase 2.

SKN-1 é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP) que atua de maneira análoga às proteínas Nrf de mamíferos durante estresse oxidativo e xenobiótico ativando os genes antioxidantes de Fase 2 (AN; BLACKWELL, 2003; WALKER *et al.*, 2000). Na ausência de estresse, SKN-1 é fosforilado pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3) prevenindo seu acúmulo no núcleo (AN *et al.*, 2005). Em condições de estresse, SKN-1 acumula no núcleo das células intestinais e ativa a transcrição da gama glutamil cisteína sintetase 1 (GCS-1) (AN; BLACKWELL, 2003). Durante o estresse oxidativo induzido por paraquat, azida sódica, arsenito de sódio ou calor, a ativação de SKN-1 requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente à via de sinalização da p38 MAPK. SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1 é necessária para ativar a translocação de SKN-1 no núcleo e ativar a expressão de GCS-1 (INOUE *et al.*, 2005) (Figura 6).

Foi também demonstrado que a via de sinalização da insulina inibe diretamente o fator de transcrição SKN-1. A redução da atividade da via de sinalização da insulina causa um acúmulo constitutivo de SKN-1 no núcleo das células intestinais na ausência de estresse, e ativa genes alvos de detoxificação de fase 2. Estes eventos não requerem DAF-16. AKT1/2 e SGK-1 fosforilam SKN-1 em múltiplos sítios, sendo que uma mutação em um sítio de fosforilação por AKT resulta na presença constitutiva de SKN-1 no núcleo das células intestinais. Mutações em *skn-1* suprimem os fenótipos de resistência ao estresse oxidativo e a longevidade associados com a redução da atividade da via de sinalização da insulina em mutantes *daf-2*. Além disso, o envelhecimento é atrasado quando SKN-1 é super expresso transgenicamente, e quando uma forma mutante de SKN-1 (mutações nos sítios de fosforilação por AKT1/2) que se localiza constitutivamente no núcleo das células intestinais aumenta a

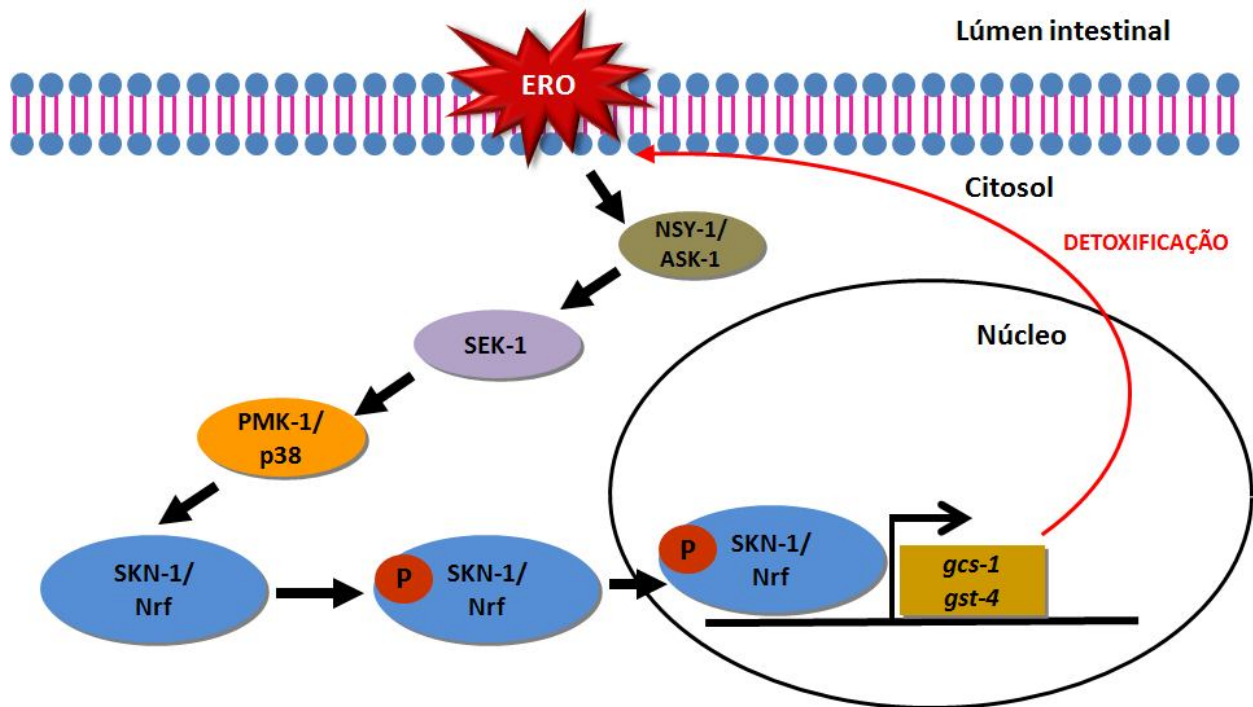


Figura 6: Modelo de ativação de SKN-1 durante estresse oxidativo em *C. elegans*. Espécies reativas de oxigênio (ERO) ativam a via de sinalização da p38 MAPK que em *C. elegans* é representada pela casacata de quinases NSY-1/ASK-1, SEK-1, PMK-1/p38 e SKN-1/Nrf. Quando ativado, o fator de transcrição SKN-1/Nrf, transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de genes antioxidantes e de detoxificação de fase 2, como *gcs-1* e *gst-4*. NSY-1- MAP3K ortóloga da ASK-1 de mamíferos; ASK-1- quinase regulada por sinal apoptótico; SEK-1- MAP2K da via da p38 em *C.elegans*; PMK-1- MAPK ortóloga à p38 de humanos; SKN-1- fator de transcrição ortólogo de Nrf 2 de mamíferos; *gcs-1*- gene da gama glutamil cisteína sintetase 1; *gst-4*- gene da glutiona-S-transferase 4.

Fonte: Adaptado de Hoeven *et al.*, 2011

sobrevivência dos animais na ausência de *daf-16* (TULLET *et al.*, 2008). Os autores concluíram que a via de sinalização da insulina inibe diretamente SKN-1 em paralelo com a de DAF-16, e isto, contribui para os fenótipos de resistência ao estresse e longevidade associados à redução da via de sinalização da insulina, e que SKN-1 apresenta um importante efeito pró-longevidade.

Análises utilizando o transgênico *SKN-1::GFP* têm resultados iniciais promissores para a sua aplicação no campo toxicológico (HELMCKE *et al.*, 2009). Os mutantes com perda de função para *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25-30%, o que é consistente com as associações feitas entre estresse oxidativo e longevidade (INOUE *et al.*, 2005; AN; BLACKWELL, 2003).

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 (LEE *et al.*, 2003). Esta via é iniciada pelo receptor DAF-2, o homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) em mamíferos. Além de inibir o fator de transcrição SKN-1, a via de sinalização da insulina também inibe DAF-16/FOXO em *C. elegans*. Quando DAF-2 é ativado, fosforila a quinase AGE-1/PI3K, gerando PIP3, que por sua vez recruta as quinases 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/FOXO, sequestrando-o no citoplasma, e então prevenindo a ativação ou repressão de seus genes alvos no núcleo. Inibidores desta cascata incluem DAF-18, a fosfatase fosfoinositol 3, PTEN, que antagoniza AGE-1 pela desfosforilação de PIP3, e PPTR-1, uma subunidade reguladora da PP2A que desfosforila AKT-1 (Revisado por LANDIS; MURPHY, 2010) (Figura 7).

A via DAF-2 /IGF1R regula a expressão de genes que codificam para várias enzimas de detoxificação, tais como superóxido dismutase (*sod-3*), catalases (*ctl-1* e *ctl-2*) e glutational-S-transferase (*gst-4*) (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

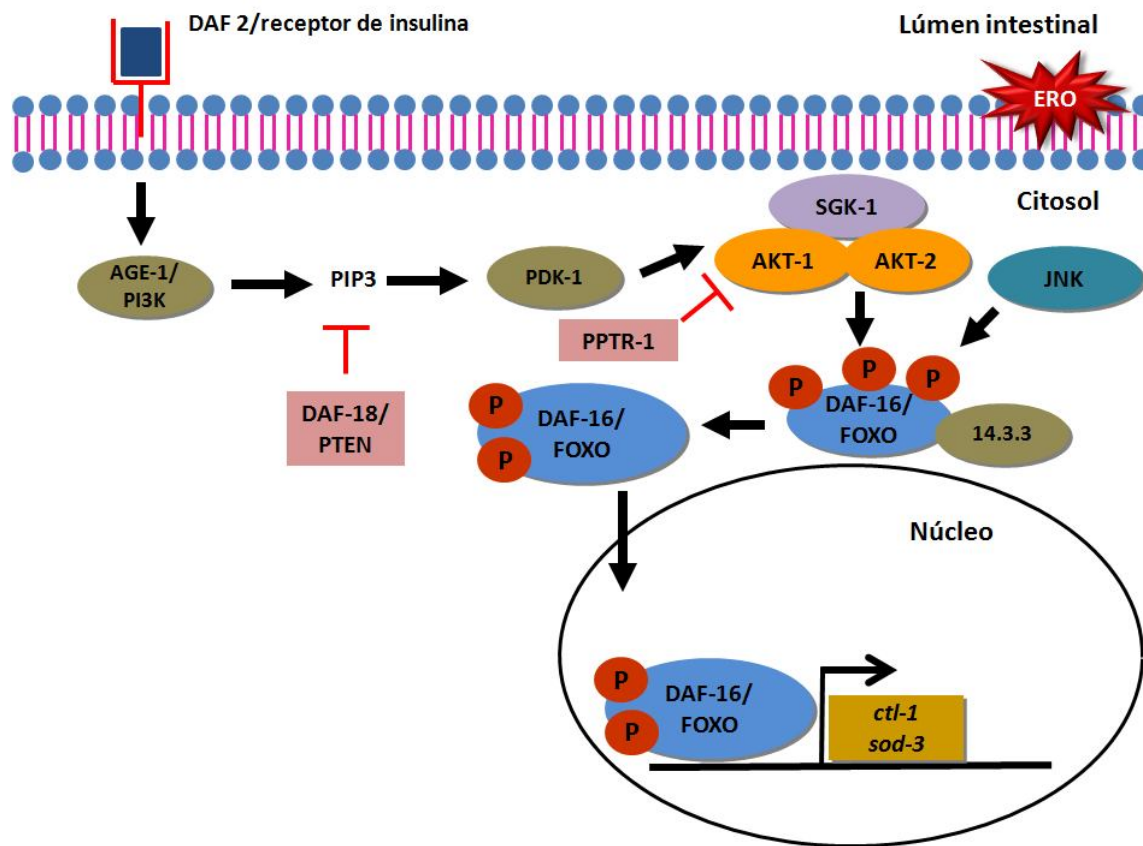


Figura 7: Modelo de regulação de DAF-16 pela via de sinalização da insulina e durante condições de estresse em *C. elegans*. A ativação da via de sinalização da insulina favorece a fosforilação de DAF-16 por AGE-1/PI3K, impedindo a sua internalização no núcleo. Em resposta ao estresse oxidativo, JNK ativa DAF-16 por fosforilação. A ativação de DAF-16, promove a ativação transcricional de genes antioxidantes e de detoxificação de fase 2, como *ct1-1* e *sod-3*. AGE-1/PI3K- quinase ortóloga à quinase fosfatidilinositol-3 de mamíferos; PI3K- quinase fosfatidilinositol-3; PIP3- fosfatidilinositol 3 fosfato; DAF-18/PTEN- proteína fosfatase e tensina homóloga; PPTR-1- subunidade regulatória de PP2A que desfosforila AKT-1; PDK-1- proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo; SGK1- quinase 1 regulada por glicocorticoide; AKT- proteína quinase B; JNK- quinase c- Jun N-terminal; DAF-16/FOXO- proteínas *forkhead box*; *ct1-1*- gene da catalase 1; *sod-3*- gene da superóxido dismutase 3.

Fonte: Adaptado de Landis; Murphy, 2010.

oxidativo e do radical livre no processo de envelhecimento (HONDA; HONDA, 1999; VANFLETEREN; DE VREESE, 1995; LARSEN, 1993). DAF-16/FOXO também é regulada diretamente por JNK. (Figura 7). JNK fosforila DAF-16 *in vitro*, e estudos bioquímicos e genéticos sugerem que JNK funcione paralelamente à via de sinalização da insulina para regular DAF-16, porém de forma oposta, uma vez que a fosforilação de DAF-16 por JNK promove a localização nuclear deste fator de transcrição e a subsequente ativação de seus genes alvos de detoxificação de fase 2 (revisado por LANDIS; MURPHY, 2010).

Outra proteína envolvida na resistência ao estresse osmótico e na longevidade em *C. elegans* é a UNC-43, ortóloga da CaMKII de mamíferos (GUHA *et al.*, 2012; PIETSCH *et al.*, 2009; SOLOMON, *et al.* 2004). A homeostase osmótica é requerida para a sobrevivência. Todas as células estão sujeitas a sofrerem alterações em sua osmolaridade devido à alterações no fluxo intracelular de solutos e/ou na osmolaridade extracelular. A maioria das células de mamíferos são protegidas de perturbações na osmolaridade extracelular pela função renal, a qual regula fortemente a concentração de íons sanguíneos. Em *C. elegans*, a proteína OSR-1 regula a sobrevivência dos animais em ambientes hiperosmóticos. OSR-1 se liga à SEK-1/MAPKK através de UNC-43/CaMKII para promover resistência ao estresse osmótico crônico (SOLOMON *et al.*, 2004).

2.7 Justificativa

Nas últimas décadas tem-se observado um crescente uso de plantas medicinais no mercado mundial, principalmente devido à valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis, aos evidentes efeitos adversos de medicamentos sintéticos, à descoberta de novos princípios ativos em plantas, à comprovação científica de fitoterápicos e ao preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder aquisitivo. Este fato associado ao fato de que o Brasil é o país com a maior biodiversidade genética vegetal do planeta, faz com que a flora brasileira seja alvo de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, na tentativa de descoberta de novos medicamentos para o arsenal terapêutico.

O açaí é uma fruta originária da América Central e do Sul. No Brasil, cresce nas várzeas da floresta Amazônica, sendo tradicionalmente usado como uma planta medicinal e como um alimento básico. Nos últimos anos, a polpa de açaí ganhou a atenção internacional como alimento funcional devido aos seus benefícios nutricionais e à promessa terapêutica. Os principais polifenóis encontrados no açaí são as antocianinas, proantocianidinas (especialmente cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo) e outros flavonóides que são correlacionados às suas propriedades farmacológicas descritas, como capacidade antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante.

O aumento das defesas antioxidantes através de suplementação dietética pode ser uma excelente estratégia para reduzir os níveis de estresse oxidativo e o processo de envelhecimento. Para um composto natural ou sintético ser considerado uma substância antioxidante é necessário investigar as suas propriedades antioxidantes *in vitro* assim como avaliar as suas funções *in vivo*.

Dentro deste aspecto, o *C. elegans* foi utilizado como modelo biológico e genético para identificação das propriedades antioxidantes do açaí, uma vez que a utilização do *C. elegans* apresenta grandes vantagens em relação à cultura de célula, pois ele é um organismo multicelular que permite que a ação dos antioxidantes seja avaliada de forma sistêmica.

O conhecimento das vias de sinalização envolvidas na resposta contra o estresse em *C. elegans*, em adição à sua facilidade de manipulação, têm estabelecido este organismo como um excelente modelo de estudo para examinar geneticamente os efeitos de diversos compostos com propriedades antioxidantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade antioxidante do extrato aquoso de açaí (EAA) e seus mecanismos subjacentes no modelo biológico e genético *Caenorhabditis elegans*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante do EAA *in vitro*;
- Avaliar os efeitos do EAA através de ensaios biológicos, ensaios de resistência ao estresse e ensaios bioquímicos;
- Avaliar os efeitos do EAA através de ensaios genéticos, na indução da expressão de genes repórteres e na ativação da expressão gênica;
- Avaliar as vias de sinalização envolvidas na resposta biológica proporcionada pelo tratamento com EAA através de ensaios de resistência ao estresse oxidativo com animais tipo selvagem e mutantes de deleção;
- Avaliar os efeitos do EAA na homeostase proteica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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. As seguintes cepas foram utilizados neste estudo: Bristol N2 (tipo selvagem; WT); LD1171, *Is003(gcs-1::GFP)*; CL2166, *dvls19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)]*; CF1553, *mul84[pAD76(sod-3::GFP)]*; VP198, *kbls5[gpdh-1::GFP + rol-6(su1006)]*; TJ 356, *zls356[pGP30(DAF-16::GFP) + pRF4 (rol-6)]*; BA17, *fem-1(hc17)*; EU1, *skn-1(zu67)IV/nT1*; CF1038, *daf-16(mu86)*; AU3, *nasy-1(ag3)*; KU4, *sek-1(km4)*; VC8, *jnk-1(gk7)*; AM1, *osr-1(rm1)*, e MT2605, *unc-43 (n498n1186)* (Tabela 1).

4.2 Crescimento e manutenção do *C. elegans*

As cepas foram mantidas congeladas até o momento de uso. O congelamento é feito transferindo-se 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 colocadas em tubos de 1,5 mL e armazenadas em 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 incubadas a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento normal do ciclo de vida do animal. A manutenção das cepas foi feita semanalmente transferindo-se animais em diferentes estágios para novas placas. Esse procedimento é necessário para que ocorra uma renovação do fornecimento de alimento uma vez que a medida que os animais se alimentam e geram novas proles a camada de bactéria se torna escassa.

4.3 Sincronização cronológica do *C. elegans*

A sincronização das cepas que apresentam fenótipo selvagem foi feita através da lise alcalina. O método de lise alcalina, baseia-se no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% hipoclorito de sódio,

Tabela 1: Cepas de *C. elegans* utilizadas no trabalho.

Cepa	Genótipo	Descrição Geral
N2		Tipo selvagem.
LD1171	<i>ls003(gcs-1::GFP)</i>	Transgênico integrado carregando um plasmídeo contendo uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>gcs-1</i> com o gene que codifica para GFP. Baixos níveis de GFP são expressos em condições basais. Fenótipo rolante.
CL2166	<i>dvl19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)]</i>	Transgênico integrado carregando um plasmídeo contendo uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>gst-4</i> com o gene que codifica para GFP. Expressão induzível por estresse oxidativo. Fenótipo selvagem.
CF1553	<i>mul84[pAD76(sod-3::GFP)]</i>	Transgênico integrado carregando um plasmídeo contendo uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>sod-3</i> com o gene que codifica para GFP. Expressão na cabeça, cauda e ao redor da vulva. Fenótipo selvagem.
VP198	<i>kbls5[gpdh-1::GFP + rol-6(su1006)]</i>	Transgênico integrado carregando um plasmídeo contendo uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>gpdh-1</i> com o gene que codifica para GFP. Expressão no intestino e hipoderme durante estresse hipertônico. Rolante.
TJ356	<i>zls356[pGP30(DAF16::GFP)+pRF4(rol-6)]</i>	Transgênico integrado carregando um plasmídeo contendo uma fusão traducional da sequência genômica do promotor e do gene que codifica para DAF-16 com o gene que codifica para GFP. Codifica a isoforma DAF-16a2 que é expressa na maioria das células do corpo do <i>C. elegans</i> , com exceção das células da faringe. Rolante.
BA17	<i>fem-1(hc17)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>fem-1</i> . São mutantes condicionais sensíveis à temperatura.
EU 1	<i>skn-1(zu67)IV/nT1</i>	Mutante de deleção para o gene <i>skn-1</i> .
CF1038	<i>daf-16(mu86)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>daf-16</i> .
AU3	<i>nsy-1(ag3)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>nsy-1</i> .
KU 4	<i>sek-1(km4)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>sek-1</i> .
VC8	<i>jnk-1(gk7)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>jnk-1</i> .
AM1	<i>osr-1(rm1)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>osr-1</i> .
MT2605	<i>unc-43 (n498n1186)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>unc-43</i> .

2,5 mM NaOH). Os embriões resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 durante 12 h na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então semeados em placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48 h a 20°C, tempo necessário para que chegassem ao estágio larval L4. A sincronização para cepas que não apresentavam fenótipo selvagem foi feita através de ovoposição. Neste caso, cerca de 30 animais grávidos foram mantidos por 6 horas em placas NGM semeadas com *E. coli* e ao término do período, foram retirados das placas, permanecendo somente os ovos. Após um período de 4-8 h, a maioria dos ovos já havia eclodido e liberado as larvas L1. Todas as cepas mutantes utilizadas neste trabalho apresentam fenótipo selvagem, com exceção da cepa EU1 que apresenta deficiência na locomoção e para qual também foi realizada a sincronização por ovoposição.

4.4 Cultura de células endoteliais da veia do cordão umbilical de humanos (HUVEC)

HUVECs foram isoladas das veias de cordões umbilicais obtidos da maternidade Jeanne de Flandres (Hospital Universitário de Lille, França) de acordo com Boulanger *et al* (2007). As células foram cultivadas em M199 (2,5 ug/mL Fungizona, 100 U/mL penicilina, 100 ug/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina e 150 mM Hepes) suplementado com 20% de SFB (soro fetal bovino). mantidas em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

4.5 Preparo do extrato aquoso de açaí e das placas NGM

Para todos os procedimentos experimentais, o açaí liofilizado proveniente da Liotécnica Alimentos LTDA (Embu, SP, Brazil) foi diluído em solução S basal (0,1 M NaCl, 50 mM tampão fosfato, pH 6) e esterilizado por filtração, para se obter um extrato aquoso de açaí (EAA). Uma colônia de *E. coli* OP50 resistente à estreptomicina foi crescida em meio LB líquido (10 g/L de tripton; 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) até OD (densidade ótica) igual a 1,0. Após o crescimento da bactéria, o inóculo foi centrifugado para obtenção do “pellet”. A solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA foram então misturados com o “pellet” de *E. coli* OP50 na OD 1 e semeados

em placas NGM. Em experimentos realizados com bactéria morta, placas NGM semeadas com *E. coli* OP50, com ou sem 100 mg/mL de EAA, foram tratados com 10 mM de canamicina (CAN) .

4.6 Quantificação de antocianinas

Antocianinas totais foram quantificadas através do método do pH diferencial, tal como descrito por Giusti & Wrolstad (2001). As amostras diluídas foram adicionados ao tampão cloreto de potássio (0,025 M, pH 1,0) e tampão acetato de sódio (4,0 M, pH 4,5). Após incubação no escuro durante 30 min à temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinados, simultaneamente, como máximo de absorção para o espectro da luz visível (510 nm) e a 700 nm (SP-220, Biospectro, PR, Brazil). A diferença de absorbância foi calculada de acordo com a fórmula 1: $A = (A_{\lambda_{\text{máx_vis}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{\text{máx_vis}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$.

A concentração de antocianinas monoméricas foi calculada de acordo com a fórmula 2: $AM = A \times PM \times FD \times 10 / \epsilon \times L$. 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; FD, o fator de diluição da amostra nas soluções tampão; ϵ , a absorvidade molar da cianidina-3-glicosídeo; e L, representa o caminho óptico (1,0 cm). O conteúdo total de antocianina foi expresso em mg de cianidina-3-glicosídeo equivalentes por 100 g de pó de açaí. A absorvidade molar de 26.900 M⁻¹cm⁻¹ e uma massa molecular de 449,2 g/mol foram usadas para cianidina-3-glicosídeo.

A quantificação de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo foi realizada em duplicata, utilizando um método adaptado de Gordon *et al.*(2012). Resumidamente, 0,25 g de amostra foram diluídos em 3 mL de água/metanol/ácido acético (50:49.5:0.5, v/v/v). Após agitação durante 5 min, a amostra foi submetida a ultrasons durante 20 s e centrifugada a 8000 rpm durante 10 min a 10°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento foi extraído duas vezes. Os três sobrenadantes foram reunidos, transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e diluídos com metanol/água/ácido acético. Após filtração através de um filtro de 0,45 micrômetros, cada amostra foi analisada por LC-MS/MS. Análises de espectrometria de massa foram realizadas no espectrômetro de massa Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery MAX

triple-stage quadrupole (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, França) com uma sonda de ionização de “eletrospray” acoplada ao sistema HPLC Accela (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, França). A separação analítica foi realizada numa coluna RP18, 150 × 2,1 milímetros, 3,5 mM, a 20°C. A fase móvel foi composta por 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água (A) e 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila (B) e foi eluída à uma taxa de 0,2 mL/min. O gradiente de HPLC começou com 5% de B durante 20 min, chegando a 30% de B em 40 min e 95% de B em 45 min. Os espectros de massa para a determinação de antocianinas foram obtidos usando o modo de ionização positivo. Análises de MS foram realizadas em modo de monitorização seletiva de reações (MSR). As transições específicas de m/z 449,0 → m/z 287,1 e m/z 595,0 → m/z 287,1 foram utilizadas para a detecção e quantificação de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo, respectivamente. Como nenhum padrão interno estável isotopicamente marcado para antocianinas está disponível comercialmente, a quantificação foi realizada utilizando o método de adição de padrão e expressa como mg/100 g de matéria seca.

4.7 Ensaio da atividade removedora do radical DPPH

A atividade de remoção do radical DPPH pelo EAA foi determinada como descrito por Brand-Willians *et al.* (1995). Em resumo, 100 uL de extrato de açaí (1, 10 e 100 mg/mL) foram adicionados a 3,9 mL de 60 uM de DPPH dissolvidos em 80% de metanol. A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro durante 30 min à temperatura ambiente, em seguida, a absorbância foi determinada a 515 nm (SP-220, Biospectro, PR, Brazil). Uma curva de calibração foi preparada utilizando o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) no intervalo de concentração de 200-800 uM. A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a seguinte equação: % de atividade de remoção = $(1 - \text{Abs Amostra } 515 / \text{Abs Controle } 515) \times 100$. O ensaio de eliminação de radicais DPPH foi realizado duas vezes.

4.8 Análise do comprimento corporal

Para medir o comprimento corporal, animais no primeiro estágio larval (L1) foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA até

alcançarem o terceiro estágio larval (L3) e, em seguida, transferidos para placas NGM com *E. coli* OP50 até o dia seguinte. As imagens foram capturadas (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA) em cerca de 20 animais adultos de 1 dia (A1) por grupo, e o comprimento do corpo foi medido ao longo do eixo dos animais, utilizando o software NIH Image J. O experimento foi realizado três vezes.

4.9 Análise da progênie

Para determinar a quantidade total de progênie gerada, dez animais no quarto estágio larval (L4), previamente tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1, foram transferidos para placas de NGM individuais semeadas com *E. coli* OP50 na presença ou ausência de 100 mg/mL de EAA. Os animais foram transferidos para novas placas a cada 24 h, durante cinco dias, até o final do período reprodutivo. A progênie F1 de cada verme foi contada depois de aproximadamente 48 h. O número total de progênie de cada placa foi calculado e dividido pelo número total de animais (REISNER *et al.*, 2011). O experimento foi realizado três vezes.

4.10 Ensaio de longevidade

O ensaio de longevidade foi realizado utilizando-se a cepa estéril *fem-1(hc17)*, para evitar o crescimento excessivo da prole durante o tempo de vida. Portanto, as larvas L1 foram transferidas para 25°C, temperatura não permissiva para a fertilidade dos animais mutantes *fem-1 (hc17)*. A Longevidade foi contada todos os dias após os hermafroditas terem concluído a muda larval final, a partir do primeiro dia de vida adulta (definido como $t = 0$) até à morte. Foram analisados cerca de 90 hermafroditas tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA divididos em três placas NGM de 30 animais cada. Os animais foram classificados como mortos quando não apresentaram movimento espontâneo ou resposta após estímulo com uma alça de platina. Vermes mortos que apresentaram progênie internamente, uma gônada extrudida ou dessecação causada por permanência fora do ágar foram excluídos dos dados (WILSON *et al.*, 2006). O ensaio de longevidade foi conduzido três vezes.

4.11 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Para avaliar a resistência ao estresse oxidativo, animais N2 tipo selvagem e animais mutantes *skn-1(zu67)*, *daf-16(mu86)*, *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)*, *jnk-1(gk7)*, *osr-1(rm1)* e *unc-43(n498n1186)* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4 e, em seguida, expostos a 7,5 mM de tert-butil-hidroperóxido (t-BOOH) em meio M9. Para realizar o ensaio de resistência ao estresse oxidativo em bactéria morta, placas NGM semeadas com *E. coli* OP50, com ou sem 100 mg/mL de EAA, foram tratadas com 10 mM de canamicina (CAN). A sobrevivência foi medida após 3, 6, 9 e 12 h sob condição de estresse oxidativo. Foram analisados cinco poços, cada um com cerca de dez vermes para cada grupo experimental. Os animais foram desafiados com uma alça de platina e definidos como mortos quando não apresentaram batimento faríngeo ou movimento (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O ensaio de resistência ao estresse oxidativo foi realizado três vezes.

4.12 Ensaio de resistência ao estresse térmico

O ensaio de termotolerância foi realizado em hermafroditas adultos de 5 dias (A5). Os animais foram tratados a 20°C com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até A5, em seguida, foram transferidos para placas NGM medindo 3 cm semeadas tal como indicado acima e, então incubados a 35°C durante 12 h. A sobrevivência foi monitorada após 6, 9 e 12 h e a fração de animais vivos foi calculada quanto ao número de animais que responderam ao toque em relação ao número original de animais sobre a placa. Foram analisadas três placas por grupo, cada uma contendo cerca de 30 animais. Os animais que morreram por dessecação nas bordas da placa foram excluídos da contagem (WILSON *et al.*, 2006). O ensaio de resistência ao estresse térmico foi realizado três vezes.

4.13 Ensaio de resistência ao estresse osmótico

Para quantificar a porcentagem de vermes que apresentavam mobilidade sob condições de estresse osmótico agudo, os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 68 h desde L1 e, em seguida, transferidos para novas placas contendo 500 mM de NaCl. A porcentagem de vermes que se movimentaram para fora de um círculo

de 7 mm foi monitorizada após 15, 30 e 60 min. Foram analisadas três placas por grupo, cada uma contendo dez animais. O ensaio de resistência ao estresse osmótico foi realizado três vezes.

4.14 Curva de crescimento bacteriano

O crescimento da cepa *E. coli* OP50 foi avaliado ao longo de 4 h, na presença ou ausência de 100 mg/mL de EAA. Todas as leituras de OD a 600 nm foram normalizadas para a leitura da OD do grupo controle no tempo zero. O crescimento bacteriano foi medido em três experimentos individuais .

4.15 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A produção de ERO foi medida em *C. elegans* e HUVEC utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA). A Produção de ERO em *C. elegans* foi realizada como descrito por Shi *et al.*(2012). Animais L1 sincronizados foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h. Vermes L4 foram incubados em 1 mL de PBS (1x) (137 mM NaCl, 10 mM Tampão Fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7,4) contendo 1 mM de H₂O₂ durante 2 h. Subsequentemente, os vermes foram lavados duas vezes e incubados em 0,5 mL de PBS contendo 50 uM de H₂DCFDA durante 1 h. Trinta animais de cada grupo em triplicata técnica foram então transferidos para os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 200 uL de PBS. A quantificação da fluorescência foi realizada em leitor de microplacas multilabel VICTOR X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA), utilizando excitação a 485 nm e emissão a 535 nm.

A produção de ERO em HUVEC foi realizada como descrito por Montiel-Dávalos *et al.* (2010). As células foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de 1×10^{-5} células por poço. As células confluentes foram pré-tratadas ou não com 2,5 mg/ml de EAA por 16 h, e em seguida, incubadas durante 30 min com 10 uM de H₂DCFDA a 37°C no escuro. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS (1x) e depois tratadas ou não com 0,25 mM de H₂O₂ durante 1 h. As células foram lavadas uma vez em PBS e coletadas. A fluorescência foi detectada em citômetro de fluxo, usando excitação a 488 nm e emissão a 525 nm. Em ambos os experimentos, *C. elegans* e HUVEC, a

fluorescência do grupo controle foi usada para normalizar os valores dos outros grupos. Os experimentos foram repetidos pelo menos quatro vezes.

4.16 Quantificação dos níveis de sulfidrilas totais (SH)

Para medir os níveis de SH totais, cerca de 5.000 animais foram tratados com solução de controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4 e, em seguida, incubados ou não com 5 mM de tert-butil-peróxido (t-BOOH) durante 1 h. Os animais foram lavados com tampão M9 e sonicados em tubos de microcentrifugação de 2 mL. O homogenato resultante foi centrifugado, e o sobrenadante foi recolhido, descartando os restos celulares e vermes intactos. O teor total de proteína foi determinado de acordo com o método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão e descrito na subseção seguinte. Os grupos sulfidrilas totais foram quantificados utilizando o reagente de Ellman conforme Sedlak & Lindsay (1968). Este método baseia-se na reação de grupos tíois com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzóico (DTNB) formando o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que é medido espectrofotometricamente a 412 nm. Para cada 120 µL de amostra, foram adicionados 720 µL de metanol, 150 µL de Tris-HCl, pH 8,2, 50 µL de DTNB. Esta mistura foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 min à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lidas em 412 nm, a 25°C. A concentração de sulfidrilas totais foi determinada através da equação da reta da curva padrão de cisteína. Todas as concentrações foram obtidas em µmol/mg de proteína. A quantificação de grupos sulfidrilas foi realizada duas vezes.

4.16.1 Dosagem de proteínas totais

O método de Lowry para quantificação de proteínas combina a reação de íons de cobre com as ligações peptídicas nas proteínas em condições alcalinas, levando à oxidação de resíduos de proteínas aromáticas. O método de Lowry é melhor utilizado com concentrações de proteína de 0,01-1,0 mg/mL e baseia-se na reação de Cu^+ , produzido pela oxidação das ligações peptídicas, com o reagente de Folin-Ciocalteu. O mecanismo da reação envolve a redução do reagente de Folin e oxidação de resíduos aromáticos (especialmente triptofano e tirosina). A concentração do reagente Folin

reduzido é medida por absorvância a 660 nm. Em consequência, a concentração total de proteína na amostra pode ser deduzida a partir da concentração de triptofano e resíduos de tirosina, que reduzem o reagente Folin. Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 100 µL de amostra ou quantidades específicas do padrão de albumina. No branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foram pipetados 100 µL de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1 mL do reagente C (1 mL do reagente A em 50 mL do reagente B) em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foram adicionados em cada tubo, 100 µL do reagente D (1 mL de Folin-Ciocalteu em 1 mL de água destilada). O volume foi misturado e incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm. A concentração de proteínas totais foi determinada pela equação da curva padrão de albumina.

Os reagentes A e B estão descritos a seguir. Reagente A: 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. Reagente B: 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada.

4.17 Análise da expressão de genes repórteres

Animais transgênicos contendo genes repórteres foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h a partir de L1, seguido pela exposição ou não à condição de estresse oxidativo. A condição de estresse utilizada foi 7,5 mM de t-BOOH por 1 h para a análise de expressão dos transgênicos *gcs-1::GFP* e *gst-4::GFP* e 10 mM t-BOOH por 1 h para *sod-3::GFP*. Para analisar a localização subcelular de DAF-16::GFP, vermes transgênicos sincronizados em L1 foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA por 48 h, seguido ou não pelo tratamento com 7,5 mM de t-BOOH durante 1 h. Vinte animais de cada grupo foram colocados em lâminas de microscopia contendo uma fina camada de 1% de agarose, imobilizados com 0,5 mM de azida sódica e cobertos com uma lamínula. As fotomicrografias foram capturadas em microscópio de fluorescência (Axio Imager Z2, Zeiss, Nova Iorque, EUA), e os sinais de fluorescência GFP foram medidos utilizando o software NIH Image J. Para DAF-16::GFP, os padrões de

expressão foram classificados como citosólico, intermediário ou nuclear. O experimento foi conduzido três vezes.

4.18 Análise da expressão gênica

4.18.1 Extração de RNA

O RNA total dos vermes foi isolado utilizando BRAZOL (LCG Biotecnologia, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo descrito por Chomczynski & Sacch (2006) adaptado para o modelo *C. elegans*. Cerca de 2500 larvas L1 sincronizadas foram cultivadas em placas contendo *E. coli* OP50 ressuspensa em solução basal ou 100 mg/mL de EAA até atingirem a fase larval L4. Em seguida, as placas foram lavadas utilizando água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), substância que inativa as RNases presentes. Os animais recolhidos foram então lavados até que o excesso de bactéria fosse removido. Em seguida, o reagente BRAZOL foi adicionado de acordo com as especificações do fabricante. O BRAZOL é um reagente que lisa a parede celular do *C. elegans* e mantém a integridade dos seus ácidos nucleicos, para posterior precipitação. Como o *C. elegans* possui uma cutícula resistente, após adição do BRAZOL, os microtubos foram submetidos à homogeneização em vortex por 30 s, a fim de auxiliar no rompimento dessa cutícula. Os microtubos foram então deixados à temperatura ambiente por 10 min, seguida por uma etapa de centrifugação durante 20 min a 16000 x g, a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos livres de RNases, aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio UV/HPLC espectroscópico, seguido de homogeneização por 15 s em vortex.

Após a homogeneização, os microtubos foram deixados por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram então centrifugados na mesma condição acima citada, onde verificamos a formação de duas camadas, uma cristalina e outra azulada e espessa. A camada superior cristalina foi transferida para novos microtubos livres de RNases. Aos tubos contendo a camada cristalina, foi adicionado um volume igual de isopropanol, e estes foram deixados à temperatura ambiente por 10 min para precipitação do RNA.

Os microtubos foram então centrifugados por 10 min a 13000 x g a 4°C, para formação do “pellet” de RNA. O sobrenadante foi retirado e o “pellet” lavado com 350 µL de Etanol 70% (em água DEPC). Os microtubos foram

centrifugados a 16000 x g por 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi removido. Depois que as amostras de RNA estavam secas, foram adicionados 24 µL de água DEPC e o pellet foi ressuspensionado. Para completa dissolução do RNA, as amostras foram submetidas a 60°C por 10 min. Finalmente, a concentração do RNA foi quantificada após leitura da densidade óptica no espectrofotômetro NanoVue Plus (General Electric). A razão 260/280 fornece uma indicação da pureza do RNA, uma vez que a presença de DNA ou fenol residual alteram esta razão. Desta forma, a razão 260/280 foi utilizada, principalmente, devido ao fato de que a medida de expressão gênica analisada neste trabalho foi determinada de forma qualitativa e não quantitativa (BUSTIN *et al.*, 2009). Todas as amostras de RNA utilizadas apresentaram razão 260/280 ≥ 1,80. Em seguida, o RNA foi armazenado a -80°C.

4.18.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado utilizando o sistema High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para a síntese de cDNA por este método, 1500 ng de RNA foram pipetados em um microtubo de 0,2 mL, juntamente com 2,0 µL de 10X RTBuffer, 0,8 µL de 25XdNTPMix, 2,0 µL de Random Primers e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa. O volume da reação foi completado para 20 µL com H₂O DEPC. Esta solução foi submetida à reação de RT-PCR em termociclador MG96+ (Biocycler). Os passos de síntese consistiram de uma etapa a 25°C por 10 min, outra de 37°C por 120 min, e finalmente 85°C por 5 min. O cDNA foi diluído para a concentração de 25 ng/µL com H₂O DEPC, e armazenado em freezer a -20°C até a realização das placas de qPCR.

4.18.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada no sistema da Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), utilizando Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). A amplificação das amostras por qPCR foi realizada em placas de polipropileno para 96 reações (Axygen Scientific) seladas com tampas para microplacas (Axygen Scientific) e em triplicata técnica, utilizando-se 2,0 µL de cDNA (50ng), 4,3 µL de H₂O MiliQ, 7,5 µL de SYBR[®] Green (Applied Biosystems), e 1,2 µL (10 µM) do primer específico,

sendo 15 uL o volume final da reação. As etapas de amplificação foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min; etapa seguinte de 40 ciclos a 95°C por 1 s e, finalmente, etapa de anelamento e extensão a 60°C por 1 min. O protocolo de dissociação foi realizado alternando a temperatura entre 95°C (15 s), 60°C (1 min), 95°C (30 s) e 60°C (15 s). Este protocolo é essencial para obtenção da curva de dissociação, onde podemos observar a especificidade dos iniciadores. Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados para a expressão de *ama-1*, que codifica a subunidade maior da RNA polimerase II. A análise dos níveis de expressão dos genes foi feita por meio do método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os grupos tratados com 100 mg/mL de EEA foram então normalizados em relação aos grupos não tratados cuja expressão foi determinada como 1. As sequências dos iniciadores para *ama-1*, *daf-16*, *gst-7*, *ctl-1*, *sod-3* e *osr-1* estão listadas na Tabela 2. A expressão gênica foi analisada em três experimentos individuais.

4.18.4 Curvas padrão para determinação da eficiência dos iniciadores

As curvas padrão foram elaboradas em triplicata, a partir de diluições seriadas do cDNA (50 ng, 5 ng, 0,5 ng e 0,05 ng) de animais tipo selvagem N2 crescidos sob condições normais. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito na subseção 4.18.3. Foram utilizados pelo menos quatro pontos para a construção das curvas padrão e determinação da eficiência de cada iniciador. Todos os iniciadores apresentaram eficiência entre 95-100%. Somente foram consideradas curvas padrão satisfatórias aquelas com *slope* (diferença nos valores de Ct entre as diferentes diluições) entre 3,1 e 3,9, sendo 3,3 o valor ideal.

Tabela 2: Lista de iniciadores utilizados na qPCR.

Gene	Sequência	Referência
<i>daf-16</i>	F-TCAGGGATAAGGGAGATTCC R-CAGATTGTGACGGATCGAGTT	Wilson <i>et al.</i> , 2006
<i>sod-3</i>	F-AGCATCATGCCACCTACGTGA R-CACCACCATTGAATTCAGCG	Sangha <i>et al.</i> , 2012
<i>ctl-1</i>	F-AATGGATACGGAGCGCATAC R-TCCTGTTTCAGCACCATCTTG	Vigneshkumar <i>et al.</i> , 2011
<i>gst-7</i>	F-GACAGCTTCCACTCCTTGAA R-GCACACTTTCCATTGATTCC	Tullet <i>et al.</i> , 2008
<i>osr-1</i>	F-AGCATCATGCCACCTACGTGA R-CACCACCATTGAATTCAGCG	Xue <i>et al.</i> , 2011
<i>ama-1</i>	F-CCTACGATGTATCGAGGCAAA R-CCTCCCTCCGGTGTATAATG	Hoogewijs <i>et al.</i> , 2008
<i>act-1</i>	F-GCTGGACGTGATCTTACTGATTACC R-GTAGCAGAGCTTCTCCTTGATGTC	Hoogewijs <i>et al.</i> , 2008
<i>gpd-2</i>	F-CTCCATCGACTACATGGTCTACTTG R-AGCTGGGTCTCTTGAGTTGTAGAC	Hoogewijs <i>et al.</i> , 2008
<i>csq-1</i>	F-AACTGAGGTTCTGACCGAGAAG R-TACTGGTCAAGCTCTGAGTCGTC	Hoogewijs <i>et al.</i> , 2008

4.18.5 Escolha do gene de referência endógena

O protocolo para a realização da qPCR dos genes de referência endógena foi o mesmo descrito na subseção 4.18.3. O Ct de amplificação de cada gene candidato foi comparado em todas as condições. O gene escolhido para a referência endógena foi o que apresentou pequenas variações ($\pm 0,8$) no Ct de amplificação em todas as condições analisadas. Os genes de referência endógena, já descritos na literatura para *C. elegans*, testados neste estudo foram *csq-1* (codifica uma proteína sequestradora de cálcio), *ama-1* (codifica a subunidade maior da RNA polimerase II), *act-1* (codifica uma isoforma da proteína actina) e *gpd-2* (codifica uma isoforma da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). De acordo com o Ct de amplificação nos diferentes grupos analisados, o gene de referência escolhido foi o *ama-1* (Tabela 1A, Anexo 1).

4.19 Quantificação da agregação de proteínas poliglutâmicas (PoliQ)

Animais transgênicos portadores do gene repórter *vha-6::Q44::YFP* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1. As fotografias de animais adultos de um, quatro, oito e doze dias de idade foram obtidas em microscópio de fluorescência (Axio Imager Z2, Zeiss, Nova Iorque, EUA), e o número de agregados foi contabilizado utilizando o software NIH Image J. O experimento foi realizado três vezes.

4.20 Quantificação da atividade do proteassoma

O ensaio da atividade do proteassoma 26S *in vitro* foi realizado como descrito por Kisselev & Goldberg (2005). Aproximadamente 5.000 animais tipo selvagem N2 foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h desde L1. Vermes no estágio larval L4 foram então colhidos e sonicados. Os lisados foram centrifugados a 20.000 x g durante 20 min a 4°C. A determinação da concentração proteica presente no extrato bruto foi realizada utilizando o princípio do ácido bicinconínico (BCA), segundo as recomendações do fabricante (QuantiPro™ BCA Assay Kit-SIGMA ALDRICH). O princípio do método BCA baseia-se na formação de um complexo proteína-Cu²⁺, sob condições alcalinas, seguido da redução de Cu²⁺ a Cu¹⁺. A quantidade da redução é proporcional à quantidade de proteínas presentes. O

BCA forma um complexo roxo-azulado com o Cu^{1+} , fornecendo então a base para o monitoramento da redução de Cu^{2+} pelas proteínas.

Para a medição da atividade quimiotripsina do proteassoma, o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-7-amida (SLLVT-MCA). (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado tanto na presença quanto na ausência de 20 μM de MG-132, um inibidor de proteassoma. A atividade enzimática foi monitorada no leitor de microplacas VICTOR X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) a cada 15 min durante 1 h a 37°C , e os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 380 e 460 nm, respectivamente. A atividade do proteassoma foi calculada como a diferença entre a atividade total e a atividade remanescente na presença de 20 μM de MG-132. A quantificação da atividade do proteassoma foi realizada três vezes.

4.21 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (San Diego, CA). Os resultados foram representados como a média \pm EPM (erro padrão da média). Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para a verificação da normalidade. Para dados com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de Student para comparar pares de grupos, enquanto que uma análise de variância univariada (one-way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparar três ou mais grupos. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para comparação de três ou mais grupos. Todas as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Composição fitoquímica do EAA

Inicialmente, nós caracterizamos a composição de antocianinas no EAA. O EAA apresentou $31,0 \pm 2,4$ mg/100 g de antocianinas totais medidas pelo método do pH diferencial. Nós também quantificamos as duas principais antocianinas presentes na polpa de açaí, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo, por LC-MS/MS. A análise de LC-MS/MS demonstrou que o EAA apresenta $8,8 \pm 0,9$ mg/100 g de cianidina-3-O-glicosídeo e $8,7 \pm 0,9$ mg/100 g de cianidina-3-O-rutinosídeo (Tabela 3). Estudos recentes mostram que os compostos polifenólicos do açaí estão associados à sua capacidade antioxidante *in vitro* (SONG *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2011; NORATTO *et al.*, 2011). Então, nosso próximo passo foi avaliar a capacidade antioxidante do EAA.

5.2 Avaliação da capacidade antioxidante do EAA *in vitro*

Nós determinamos a capacidade antioxidante do EAA nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/mL pelo método do DPPH, que consiste em avaliar a capacidade antioxidante de um composto através da medida da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O EAA apresentou capacidade antioxidante *in vitro* de maneira dependente da dose (Tabela 4). A concentração de 100 mg/mL de EAA, a concentração mais elevada testada, apresentou 79,61% de inibição do radical DPPH, inibição similar a que foi observada para a concentração de 800 μ M de Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilchroman-2-carboxílico) usado como referência padrão, que mostrou 80,90% de inibição. Além disso, a porcentagem de inibição do DPPH por qualquer concentração testada não foi alterada de forma significativa quando os extratos foram misturados com *E. coli* OP50. Desta forma, o EAA foi utilizado na concentração de 100 mg/mL ressuspendido em *E. coli* OP50 viva nos experimentos subsequentes, uma vez que a presença da bactéria não interferiu na capacidade antioxidante do EAA *in vitro*.

Tabela 3: Determinação das antocianinas presentes no extrato aquoso de açaí (EAA).

Compostos	Concentração (mg/100 g)
Antocianinas monoméricas totais ^a	31,0 ± 2,4
Cianidina-3-O-glicosídeo ^b	8,8 ± 0,9
Cianidina-3-O-rutinosídeo ^b	8,7 ± 0,6

Os resultados são expressos como média ± EPM (Erro padrão da média).

^a Antocianinas monoméricas totais medidas pelo método do pH diferencial.

^b Cianidina-3-O-glicosídeo e Cianidina-3-O-rutinosídeo determinadas pela análise de LC-MS/MS.

Tabela 4: Atividade antioxidante do extrato aquoso de açaí (EAA) *in vitro* medida pelo ensaio do DPPH.

EAA (mg/mL)	% de inibição (Média ± EPM)			
	EAA	EAA + OP50	EAA + OP50 + CAN	EAA + CAN
1	5,07 ± 0,75 ^a	4,38 ± 0,98 ^a	- 0,71 ± 0,28 ^b	0,10 ± 0,16 ^b
10	53,30 ± 5,61 ^a	49,53 ± 4,07 ^a	18,55 ± 2,18 ^b	25,68 ± 2,22 ^b
100	79,61 ± 3,33 ^a	77,30 ± 3,49 ^a	73,46 ± 4,54 ^a	78,35 ± 1,78 ^a

DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; OP50, cepa de *E. coli*; CAN, Canamicina.

Letras diferentes indicam diferenças significativas pela análise univariada ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.3 Análise do desenvolvimento corporal e da progênie de *C. elegans* tratado com EAA

Compostos tóxicos normalmente retardam o desenvolvimento, assim como diminuem a progênie do *C. elegans* (HASEGAWA *et al.*, 2004). Para verificar se 100 mg/mL de EAA exibiria alguma toxicidade no modelo *C. elegans*, nós analisamos estes dois parâmetros biológicos. Nós avaliamos o comprimento corporal em animais adultos de 1 dia de idade tratados ou não com 100 mg/mL de EAA desde L1 até L3 e, em seguida, transferidos para placas NGM com *E. coli* OP50. O comprimento corporal do grupo controle ($1020,0 \pm 11,6 \mu\text{m}$) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo tratado com EAA ($994,3 \pm 10,5 \mu\text{m}$) (Figura 8).

Para medir a quantidade total de progênie gerada, os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até o fim do período reprodutivo. Não houve diferença significativa na quantidade total da prole entre o grupo controle ($239,4 \pm 6,1$) e os animais tratados com EAA ($235,6 \pm 7,5$) (Figura 9A). Além disso, não houve diferença no perfil de postura dos ovos entre os dois grupos (Figura 9B). Estes resultados sugerem que 100 mg/mL de EAA não é uma dosagem tóxica para o *C. elegans*, uma vez que não interferiu no desenvolvimento corporal e na progênie dos animais.

5.4 Análise da sobrevivência do *C. elegans* tratado com EAA sob condições de estresse

Nunes, em 2011, demonstrou que o extrato aquoso de açaí aumentou a resistência do *C. elegans* sob condições de estresse oxidativo e não teve efeito protetor sob condições de estresse térmico. Neste trabalho, nós avaliamos os mecanismos subjacentes envolvidos na resposta protetora ao estresse, utilizando mutantes de vias de sinalização específicas, os dados foram analisados como curva de sobrevivência, sendo que as diferenças entre as curvas foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

Para avaliar a resistência ao estresse oxidativo, os animais tipo selvagem foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4 e, em seguida, expostos a 7,5 mM de t-BOOH em meio M9. O tratamento com EAA mostrou aumento da resistência ao estresse oxidativo, quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0002$) (Figura 10A).

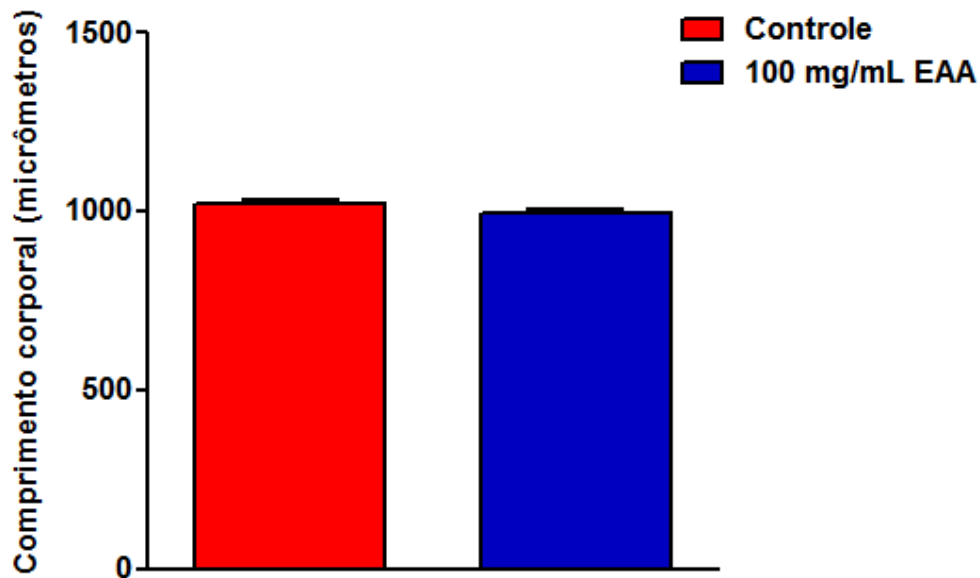


Figura 8: Avaliação do comprimento corporal do *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). Animais no estágio larval L1 foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 36 h, e então foram transferidos para placas NGM com OP50 até o dia seguinte. As imagens foram capturadas em animais adultos de 1 dia de idade, e o comprimento corporal foi medido ao longo do eixo do animal usando o software NIH Image J. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste *t* de Student.

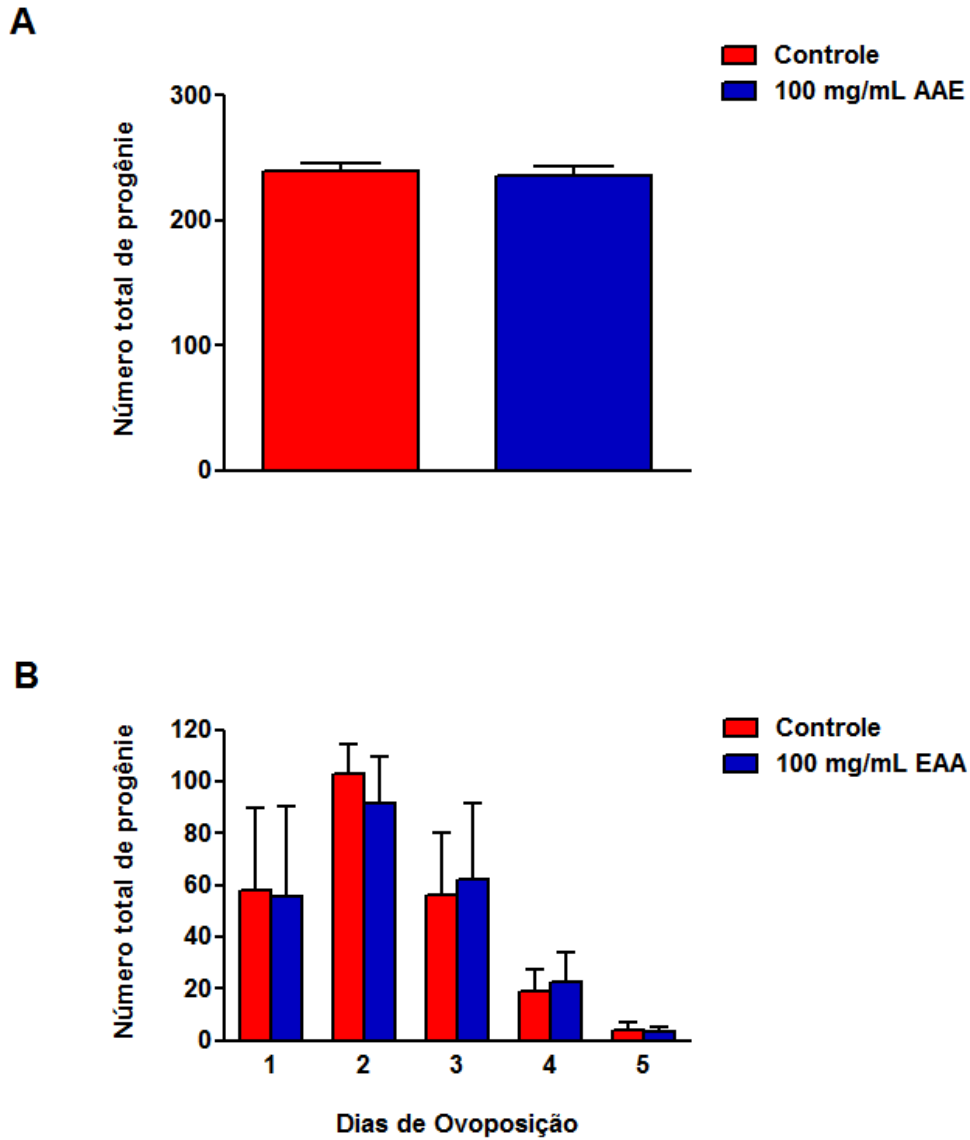


Figura 9: Avaliação da progênie do *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). O perfil da progênie foi avaliado em animais tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA. Os animais foram transferidos individualmente para placas NGM e movidos para novas placas diariamente durante todo o período reprodutivo. Os resultados foram representados como média \pm EPM para cada dia de ovoposição (**A**) e para a quantidade total final da progênie (**B**). Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste *t* de Student.

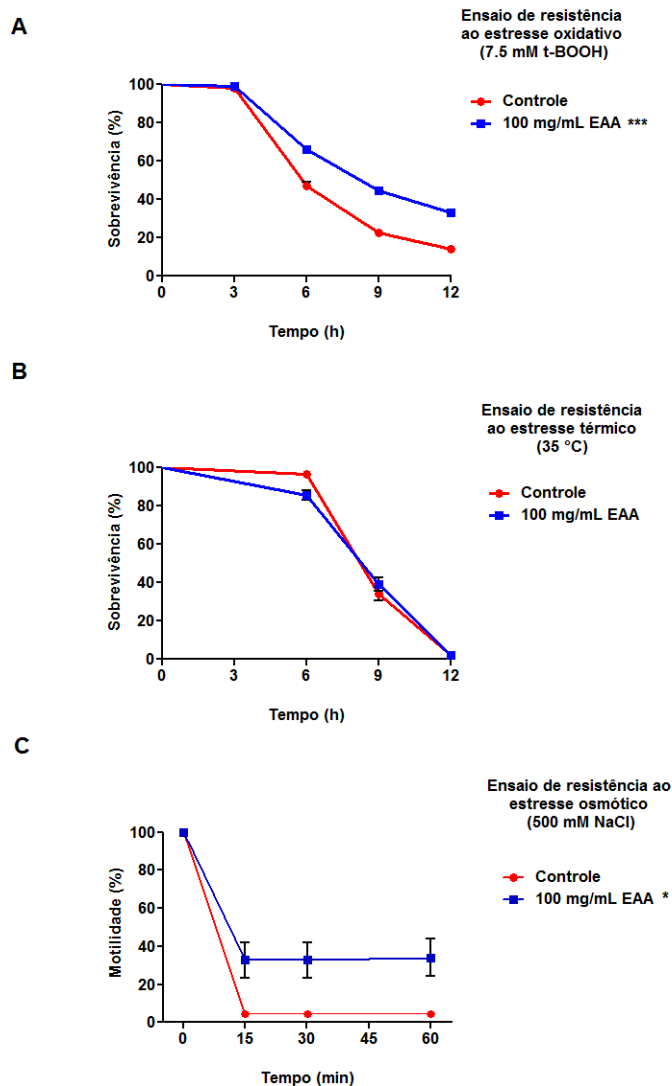


Figura 10: Efeito do tratamento com extrato aquoso de açaí (EAA) sob condições de estresse. A) Os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4, e então submetidos a 7,5 mM de t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 6, 9 e 12 h. *** $p < 0,001$ pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). **B)** Os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL desde L1. Após cinco dias a 20°C, os animais foram incubados a 35°C e a sobrevivência foi monitorada após 6, 9 e 12 h. Não houve diferença estatística entre as curvas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). **C)** Os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA por 68 h desde L1, e então transferidos para novas placas NGM contendo 500 mM de NaCl. A porcentagem de animais que se encontravam exteriormente a um círculo de 7 mm foi monitorada após 15, 30 e 60 min. * $p < 0,05$ pelo teste t de Student.

Para avaliar o efeito do EAA na resistência ao estresse térmico, animais adultos de 5 dias de idade previamente tratados com EAA desde L1, foram submetidos a 35°C durante 12 h. Animais tipo selvagem, tratados com 100 mg/mL de EAA não apresentaram maior resistência ao estresse térmico quando comparados aos animais controle ($p = 0,7388$) (Figura 10B). Por fim, analisamos a motilidade sob condições de estresse osmótico agudo em 500 mM de NaCl. Para o ensaio de motilidade, animais tipo selvagem no estágio larval L1 foram tratados com 100 mg/mL de EAA durante 68 h e, em seguida, transferidos para placas NGM com 500 mM de NaCl. O tratamento com EAA aumentou significativamente a motilidade dos animais sob condição de estresse osmótico (Figura 10C). Após 1 h, 48,31% dos animais tratados com 100 mg/mL de EAA apresentaram motilidade em comparação aos 27,70% do grupo controle ($p < 0,05$). Nossos resultados mostram que o tratamento com 100 mg/mL de EAA aumenta a resistência ao estresse oxidativo e hiperosmótico, mas não tem efeito protetor sob condições de estresse térmico.

5.5 Análise da sobrevivência do *C. elegans* tratado com EAA sob condições normais

O tratamento com EAA apresenta um papel protetor contra o estresse oxidativo e osmótico. Para avaliar se este efeito protetor ocorre também sob condições normais, nós analisamos o efeito do EAA na longevidade do *C. elegans*. Para monitorar a longevidade sob condições normais, animais mutantes *fem-1(hc17)* crescidos a 25°C foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/ml de EAA durante 48 h desde o estágio larval L1. O tratamento com EAA não teve efeito sobre o perfil de sobrevivência do *C. elegans* em condições normais de cultivo ($p = 0,2997$) (Figura 11). Este resultado demonstra que o tratamento com EAA protege o *C. elegans* contra estresse oxidativo e hiperosmótico, mas não exerce efeito na sobrevivência de animais tratados sob condições normais.

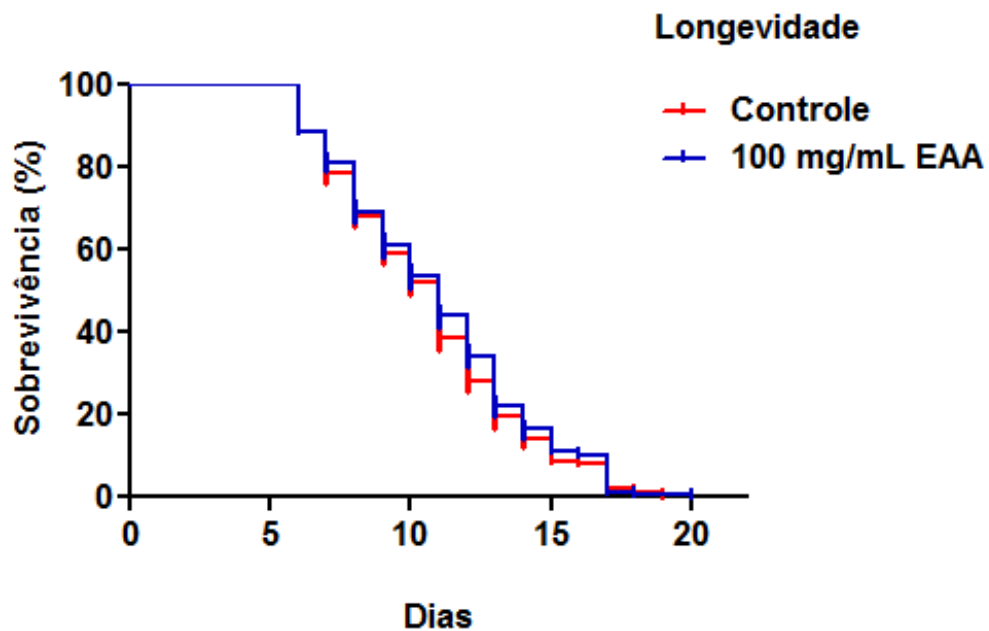


Figura 11: Análise da sobrevivência do *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açai (EAA) sob condições normais. Animais mutantes *fem-1(hc17)* foram tratados a 25°C com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1. A sobrevivência foi contabilizada diariamente até que todos os animais estivessem mortos. A análise pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) mostrou que não houve diferença significativa entre as curvas.

5.6 Avaliação do efeito do EAA sobre o crescimento bacteriano

Uma vez que estudos demonstram que diferentes cepas de bactérias podem apresentar diferentes níveis de patogenicidade e desempenhar um papel na mortalidade e resistência ao estresse em *C. elegans* (GARIGAN *et al.*, 2002; GEMS *et al.*, 2000), nós investigamos se o aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento com EAA poderia ser uma resposta secundária a uma possível propriedade antimicrobiana. Para isto, nós avaliamos o crescimento da cepa *E. coli* OP50 medindo-se a densidade óptica ao longo de 4 h, na presença ou ausência de 100 mg/mL de EAA. O tratamento com EAA diminuiu o crescimento bacteriano em todos os tempos analisados (Figura 12A). Como o tratamento com 100 mg/mL de EAA inibiu o crescimento bacteriano e desta forma, exerceu um efeito antimicrobiano, nós repetimos o ensaio de resistência ao estresse oxidativo em animais tratados com EAA ressuspendido em bactéria e posteriormente tratada com o antibiótico canamicina. Animais tipo selvagem tratados com 100 mg/mL de EAA apresentaram aumento da sobrevivência em 7,5 mM de t-BOOH em relação aos animais controle ($p < 0,0001$) (Figura 12B). Estes resultados mostram que o efeito protetor do tratamento com EAA contra o estresse oxidativo é independente de seu efeito antimicrobiano.

5.7 Avaliação do efeito do EAA sobre o *status redox* em *C. elegans* e HUVEC

Moléculas que apresentam atividade antioxidante em potencial, podem agir diretamente e neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) e, assim, prevenir uma resposta celular secundária do organismo ao aumento do estresse oxidativo. Para avaliar a capacidade do EAA em neutralizar ERO *in vivo*, nós quantificamos a produção de ERO em *C. elegans* e HUVEC, utilizando a sonda fluorescente H₂DCFDA. O tratamento com EAA não apresentou efeito sobre os níveis basais de ERO tanto em *C. elegans* quanto em HUVEC (dados preliminares não mostrados). A exposição de vermes e células às suas respectivas condições de estresse aumentou, significativamente, a intensidade de fluorescência nos dois modelos (Figuras 13A e 13B). Este aumento do acúmulo intracelular de ERO mediado pelo

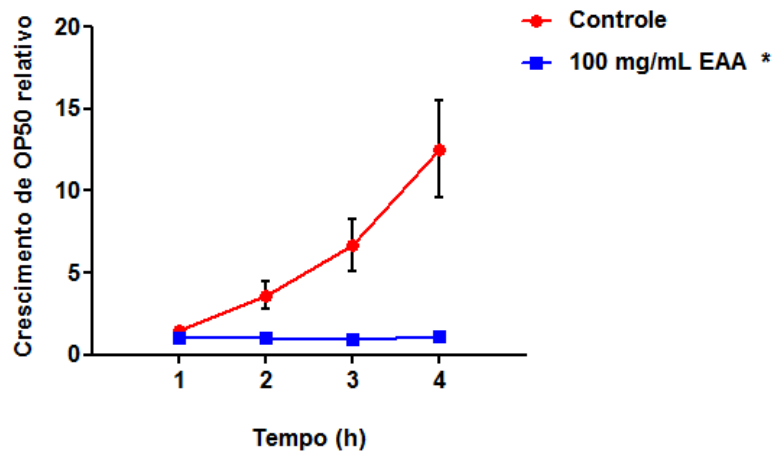
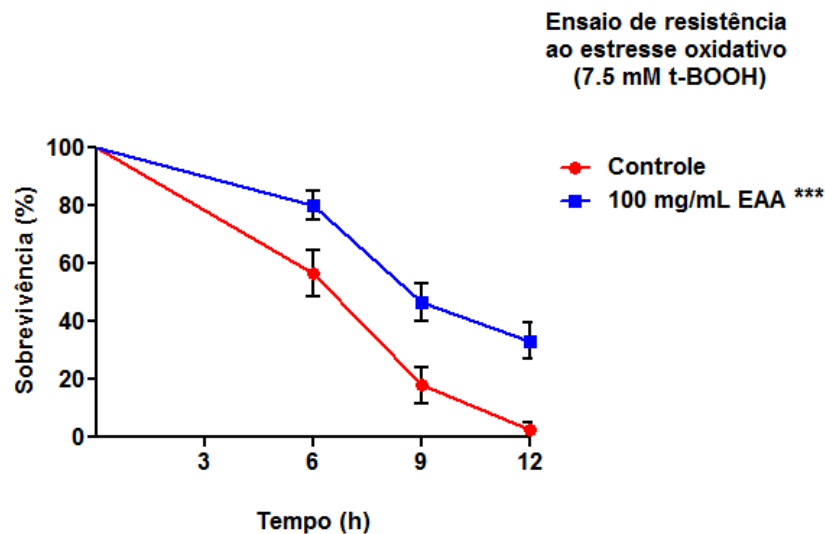
A**B**

Figura 12: Efeito do extrato aquoso de açaí (EAA) no crescimento bacteriano e na resistência ao estresse oxidativo de *C. elegans* tipo selvagem crescido em bactéria morta. A) O crescimento da cepa *E. coli* OP50 foi avaliado durante 4 h na presença ou ausência de 100 mg/mL de EAA. A OD do grupo controle no tempo zero foi usada para normalizar todas as outras leituras de OD. * O tratamento com 100 mg/mL de EAA diminuiu o crescimento bacteriano em todos os tempos analisados com $p < 0,05$ pelo teste *t* de Student. B) Os animais foram tratados ou não com 100 mg/mL de EAA, ressuspendido em *E. coli* OP50 tratada com 10 mM de canamicina (CAN), desde L1 até L4, e então submetidos a 7,5 mM de t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 6, 9 e 12 h. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).**

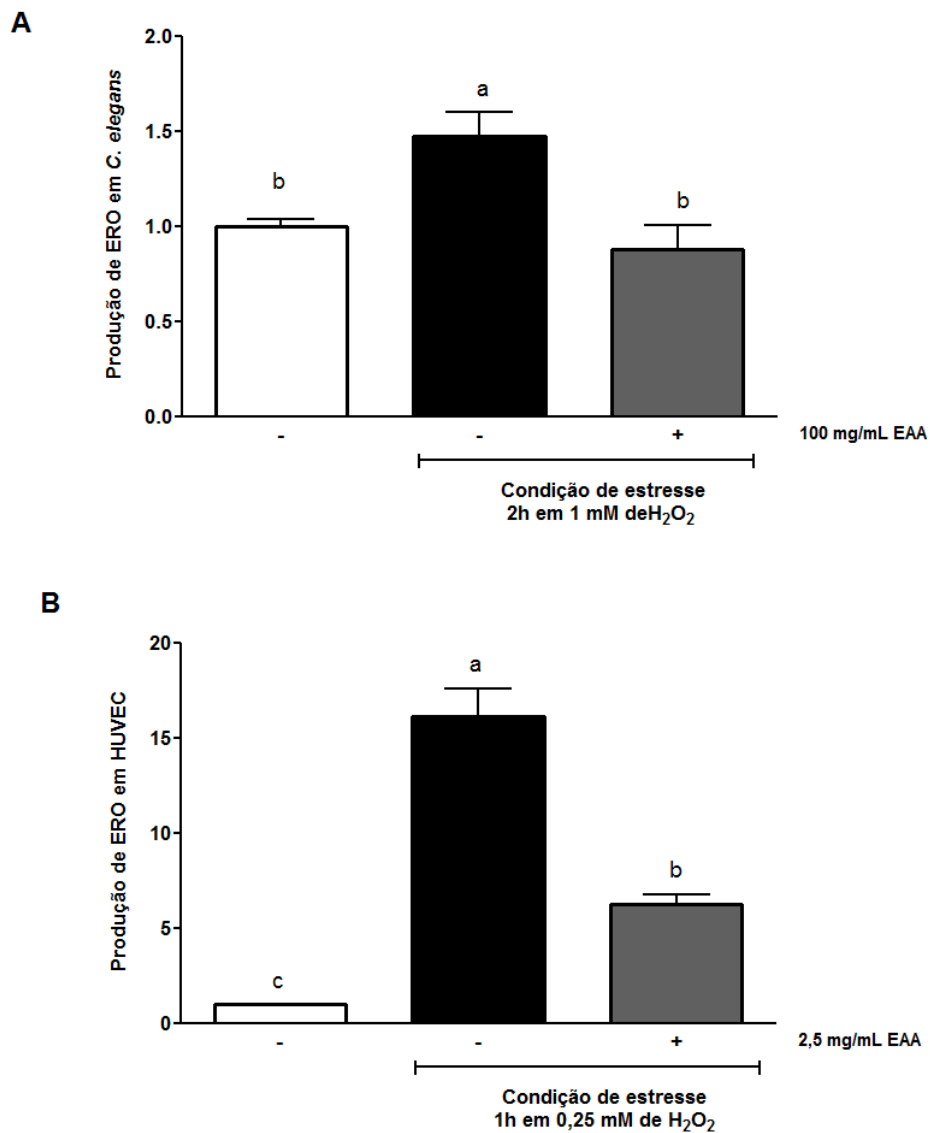


Figura 13: Avaliação da produção de ERO em *C. elegans* e HUVEC. A) *C. elegans* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h, e então submetidos à presença ou ausência de 1mM de H₂O₂ por 2 h. Os resultados são expressos como fluorescência de H₂DCFDA relativa ao controle não tratado. **B)** HUVEC foram tratadas ou não com 2,5 mg/mL de EAA durante 16 h, e então incubadas em 0,25 mM de H₂O₂ por 1 h. A fluorescência da sonda foi medida por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como fluorescência de H₂DCFDA relativa ao controle não tratado. Letras diferentes indicam diferença significativa pela análise univariada ANOVA seguida do pós-teste de Tukey.

estresse oxidativo foi prevenido pelo tratamento prévio com EAA em *C. elegans* ($p < 0,01$) (Figura 13A). Em HUVEC, a condição de estresse aumentou a produção de ERO cerca de 16 vezes em relação ao controle, e o tratamento com EAA diminuiu este aumento em até 10 vezes ($p < 0,001$) (Figura 13B).

Como o tratamento com EAA exibiu capacidade antioxidante *in vivo*, nós verificamos se o EAA poderia melhorar o *status* redox em *C. elegans* tipo selvagem. O *status* redox foi medido através da quantificação de grupos SH totais. Para quantificar os níveis de sulfidrilas totais (SH), os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4. O tratamento do *C. elegans*, com 100 mg/mL de EAA, durante 48 h, não aumentou os níveis de grupos sulfidrilas totais em relação ao grupo controle ($515,97 \pm 32,73$ vs $512,2 \pm 52,75$ $\mu\text{mol/mg}$ de proteína). A condição de estresse diminuiu significativamente os níveis de grupos SH ($515,97 \pm 32,73$ vs $279,73 \pm 5,51$ $\mu\text{mol/mg}$ de proteína) em relação ao controle ($p < 0,05$). No entanto, quando os vermes foram submetidos previamente ao tratamento com EAA e, em seguida, expostos à condição de estresse com t-BOOH, este pré-tratamento foi capaz de prevenir a redução dos níveis de grupos sulfidrilas mediada por t-BOOH ($601,18 \pm 38,25$ vs $279,73 \pm 5,51$ $\mu\text{mol/mg}$ de proteína) ($p < 0,05$) (Figura 14).

Para correlacionar o efeito antioxidante *in vivo* observado pelo tratamento com EAA à uma resposta molecular em *C. elegans*, nós analisamos os níveis de expressão da γ -glutamil cisteína sintetase-1 (GCS-1) e da glutathione-s-transferase-4 (GST-4). GCS-1 é a enzima limitante da via de síntese da glutathione (GSH), e em *C. elegans*, é expressa em níveis elevados no intestino em resposta ao estresse oxidativo de modo dependente de SKN-1, e em níveis basais nas condições normais de cultivo (AN; BLACKWELL, 2003). GST-4 é expressa principalmente nos músculos e na hipoderme, sob condições normais, e tem a expressão aumentada em resposta à uma variedade de condições de estresse oxidativo (HASEGAWA *et al.*, 2010; HASEGAWA *et al.*, 2008). Para análise de fluorescência de animais transgênicos, os animais contendo genes repórteres foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h desde o estágio

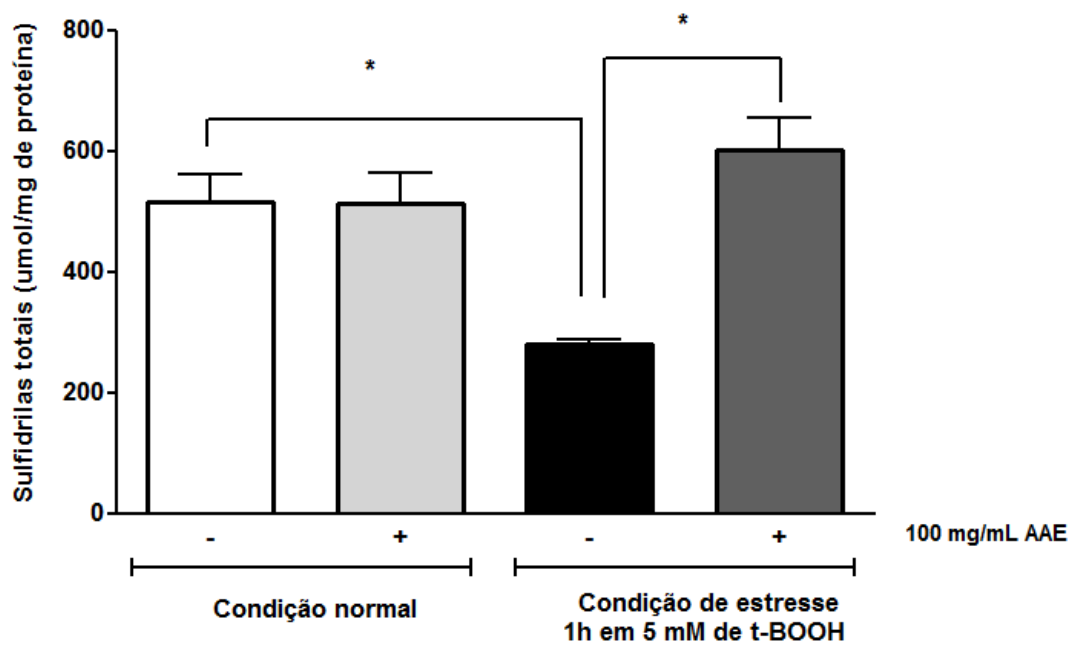


Figura 14: Avaliação do efeito do extrato aquoso de açaí (EAA) nos níveis de SH totais em *C. elegans*. Os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4, e então incubados ou não com 5 mM de t-BOOH por 1 hora. * os valores de p foram determinados pelo teste *t* de Student, sendo que os grupos foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

larval L1, na presença ou ausência de estresse oxidativo. Os sinais de fluorescência de *gcs-1::GFP* e *gst-4::GFP* de animais tratados com EAA não foram significativamente diferentes da fluorescência apresentada pelos animais do grupo controle (Figuras 15A e 15B). A exposição a 7,5 mM de t-BOOH por 1 h aumentou tanto a expressão de *gcs-1::GFP* quanto de *gst-4::GFP*, sendo que o tratamento com EAA preveniu parcialmente a ativação de *gcs-1::GFP* (Figura 15A), mas não de *gst-4::GFP* (Figura 15B). Estes resultados sugerem que o EAA atua como um antioxidante direto através da remoção de ERO, prevenindo o consumo de grupos SH e atenuando a ativação de enzimas de detoxificação mediados pela condição de estresse oxidativo em *C. elegans*.

5.8 Avaliação dos mecanismos subjacentes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo mediada pelo EAA

Alguns flavonóides protegem contra o estresse oxidativo, diretamente, por neutralização de radicais livres, ou indiretamente, por indução da expressão de enzimas antioxidantes e, portanto, aumentam a resistência ao estresse do organismo. Em *C. elegans*, fitoquímicos e extratos de plantas ativam várias vias de sinalização em resposta ao estresse (WILSON *et al.*, 2006; PIETSCH *et al.*, 2009; GUHA *et al.*, 2012). Para verificar se, além do seu mecanismo de proteção direto sob condições de estresse oxidativo, o EAA também poderia promover a ativação de vias de sinalização, nós realizamos o ensaio de resistência ao estresse oxidativo em animais tipo selvagem e mutantes tratados com 100 mg/mL de EAA ou solução controle (S basal).

5.8.1 Avaliação do envolvimento das vias de sinalização DAF-16/FOXO e JNK-1

DAF-16/FOXO, o alvo à jusante da via de sinalização semelhante à insulina em *C. elegans*, é um fator de transcrição necessário tanto para a regulação da sobrevivência quanto da resistência ao estresse (MURPHY *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2005). A translocação nuclear de DAF-16 é regulada positivamente pela JNK-1, em paralelo com a sinalização da via semelhante à insulina (OH *et al.*, 2005). Devido ao efeito biológico que a ativação destas vias de sinalização proporciona no *C. elegans*, no presente estudo nós avaliamos se a resistência ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com EAA

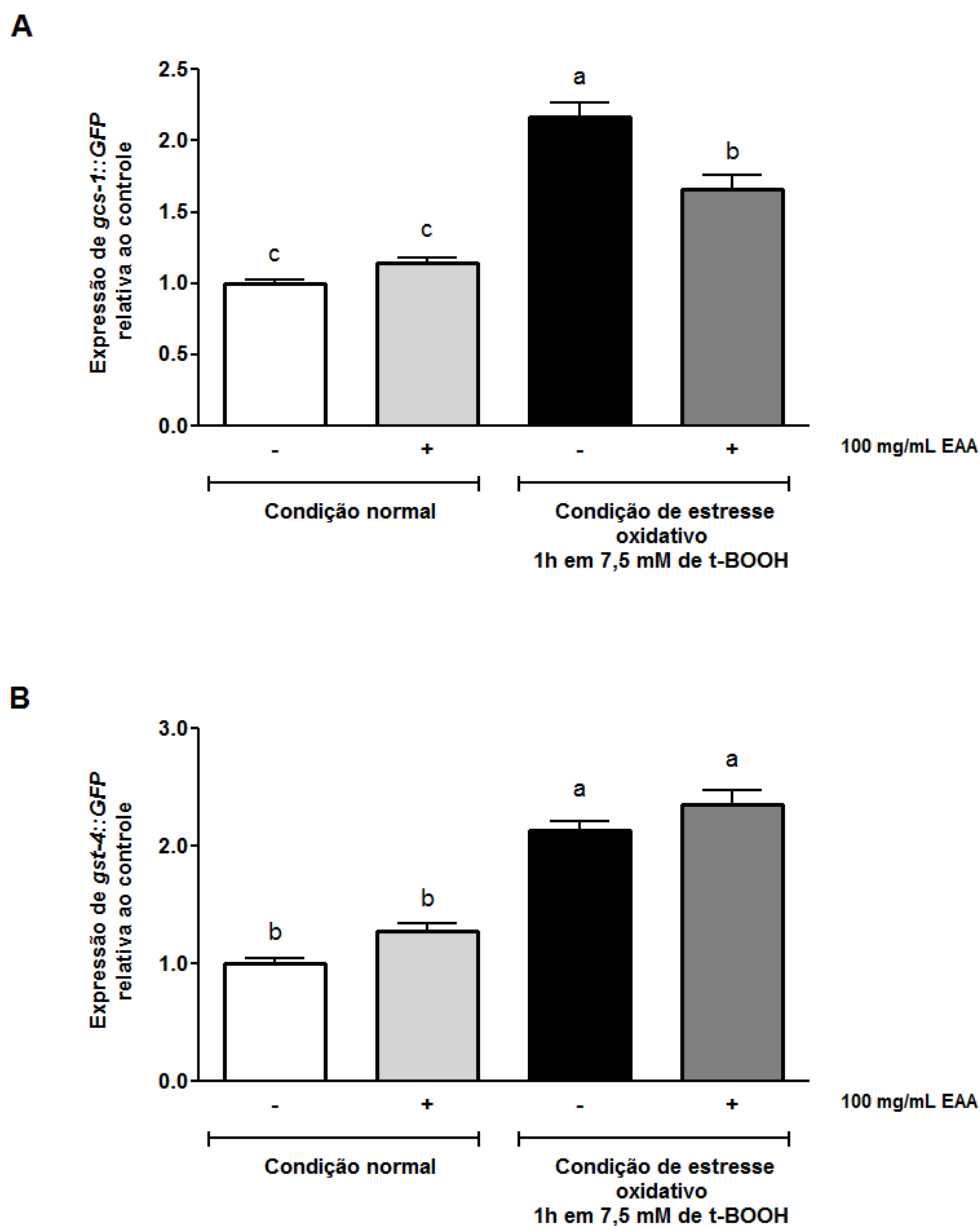


Figura 15: Avaliação do efeito do extrato aquoso de açaí (EAA) na expressão de *gcs-1::GFP* e *gst-4::GFP*. Animais transgênicos contendo genes repórteres foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA por 48 h desde L1, e então submetidos ou não à condição de estresse. Após 1 h de recuperação, as fotos foram capturadas em um microscópio de fluorescência. Para os animais **(A)** *gcs-1::GFP* e **(B)** *gst-4::GFP*, o sinal de fluorescência GFP foi medido usando o software NIH Image J. Letras diferentes correspondem à diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.

depende da sinalização JNK-1/DAF-16. O tratamento com 100 mg/mL de EAA não aumentou o tempo de vida médio de animais mutantes *daf-16(mu86)* ($p = 0,1782$), por outro lado, este aumento do tempo médio de vida foi observado em mutantes *jnk(gk7)* ($p < 0,0001$) (Figura 16; Tabela 5). Estes resultados sugerem que o EAA pode aumentar a resistência ao estresse oxidativo por meio de DAF-16 e independentemente de JNK-1.

5.8.2 Avaliação do envolvimento da via de sinalização da p38 MAPK

SKN-1/Nrf é um fator de transcrição que promove a expressão de enzimas antioxidantes ou de detoxificação, aumentando assim a resistência ao estresse e a longevidade em *C. elegans* (TULLET *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Sob condições de estresse oxidativo, SKN-1 é ativado pela via de sinalização da p38 MAPK representada pelas quinases NSY-1/SEK-1/PMK-1 (INOUE *et al.*, 2005). Nós também avaliamos a sobrevivência dos animais mutantes *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)* e *skn-1(zu67)* tratados ou não com 100 mg/mL de EAA durante 48 h. O tratamento com EAA aumentou o tempo de vida médio dos mutantes *nsy-1(ag3)* ($p = 0,0005$) e *skn-1(zu67)* ($p = 0,0002$), mas não dos mutantes *sek-1(km4)* ($p = 0,7483$) (Figura 17; Tabela 5). Estes resultados sugerem que o efeito antioxidante do EAA não depende de SKN-1. Além disso, o EAA pode atuar ativando a via da p38 MAPK, porém apenas através de SEK-1, uma vez que seu efeito protetor foi dependente desta quinase.

5.8.3 Avaliação do envolvimento da via de sinalização em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1

Em *C. elegans*, a sobrevivência sob condições de estresse hiperosmótico requer a ativação da via de sinalização em resposta ao estresse OSR-1/UNC-43/SEK-1 (SOLOMON *et al.*, 2004). Nós verificamos o envolvimento desta via de sinalização na resposta contra o estresse oxidativo mediada pelo tratamento com EAA. O aumento da resistência ao estresse oxidativo proporcionado pelo tratamento com 100 mg/mL de EAA foi dependente de OSR-1 e UNC-43. O tratamento com EAA não aumentou o tempo de vida médio dos animais mutantes *unc-43(n498n1186)* ($p = 0,7320$) (Figura 18; Tabela 5). Em animais mutantes *osr-1(rm1)*, o tratamento com EAA.

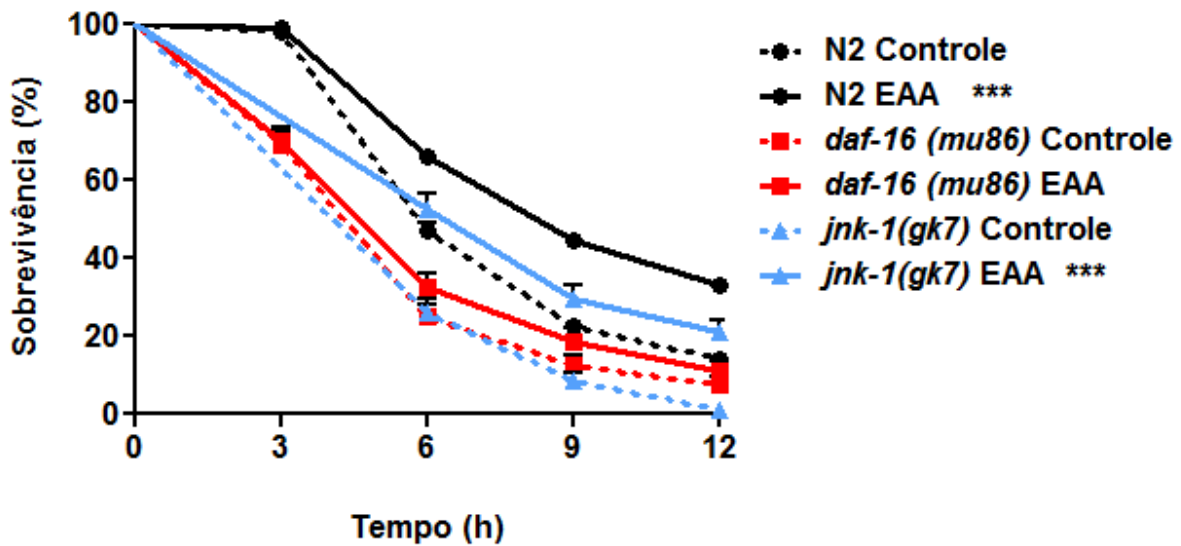


Figura 16: Análise do envolvimento da via DAF-16/FOXO e JNK na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açai (EAA). Os animais N2 tipo selvagem e mutantes *daf-16(mu86)* e *jnk-1(gk7)* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4, e então submetidos a 7,5 mM de t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h. *** $p < 0,001$ pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) (Veja tabela 5 para mais detalhes).

Tabela 5: Efeito do extrato aquoso de açáí (EAA) na resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* selvagem e mutantes.

	Sobrevivência média (h)		p vs. Controle (log-rank) ^b	n ^a	
	Controle	EAA		Controle	EAA
N2	7.4	8.0	< 0.0001	665 (12)	669 (12)
<i>osr-1(rm-1)</i>	5.4	4.7	0.0009	167 (3)	166 (3)
<i>unc-43(n498n1186)</i>	6.6	6.7	0.7320	186 (3)	183 (3)
<i>daf-16(mu86)</i>	5.7	6.0	0.1782	185 (3)	150 (3)
<i>jnk-1(gk7)</i>	7.0	7.5	< 0.0001	165 (3)	162 (3)
<i>nsy-1(ag3)</i>	8.9	9.5	0.0005	63 (2)	80 (2)
<i>sek-1(km4)</i>	7.3	7.6	0.7483	109 (2)	108 (2)
<i>skn-1(zu67)</i>	6.7	7.3	0.0002	163 (3)	157 (3)

^a Número total de hermafroditas analisados. O número entre parênteses indica o número de experimentos independentes.

^b As comparações entre as curvas foram realizadas usando o teste de Log-rank (Mantel-Cox).

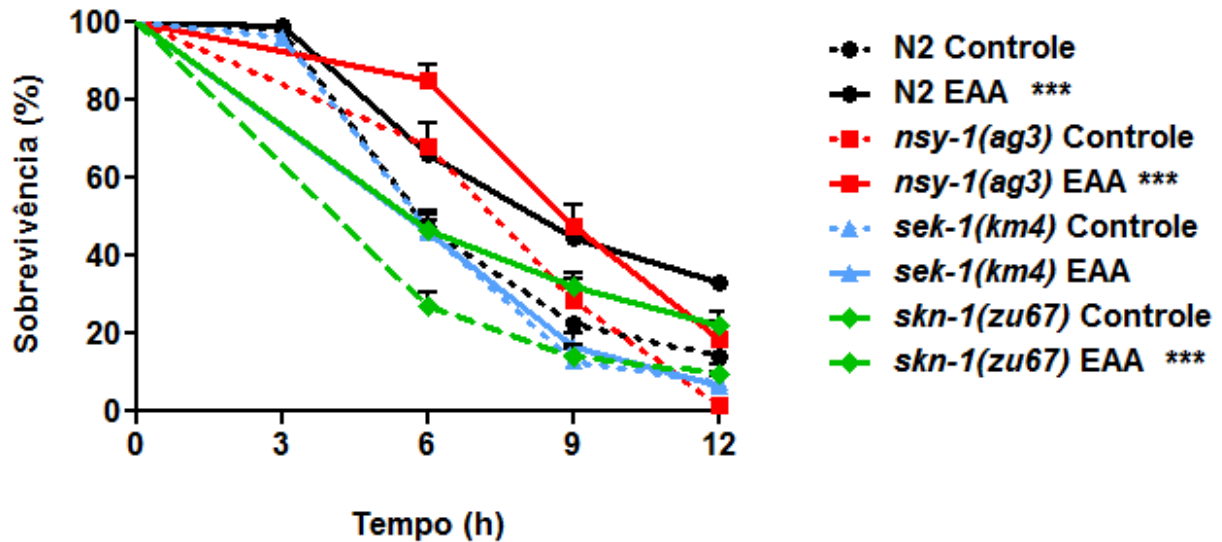


Figura 17: Análise do envolvimento da via da p38 MAPK na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açaí (EAA). Os animais N2 tipo selvagem e mutantes *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)* e *skn-1(zu67)* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4, e então submetidos a 7,5 mM de t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h. *** $p < 0,001$ pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) (Veja tabela 5 para mais detalhes).

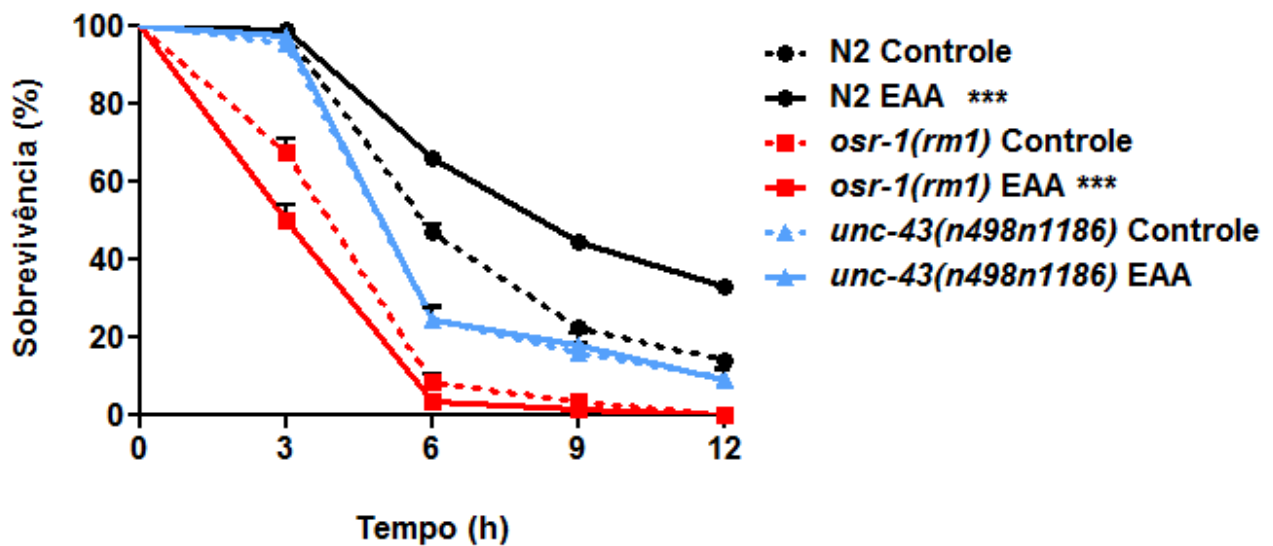


Figura 18: Análise do envolvimento da via de sinalização em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1 na resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com extrato aquoso de açai (EAA). Os animais N2 tipo selvagem e mutantes *osr-1(rm1)* e *unc-43(n498n1186)* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4, e então submetidos a 7,5 mM de t-BOOH em M9. A sobrevivência foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h. *** $p < 0,001$ pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) (Veja tabela 5 para mais detalhes).

reduziu o tempo de vida médio sob condições de estresse oxidativo ($p = 0,0009$) (Figura 18; Tabela 5). Estes resultados sugerem que o EAA modula a resistência ao estresse oxidativo através de OSR -1 e dois de seus efetores: UNC-43 e SEK-1. Em resumo, o aumento da resistência ao estresse oxidativo mediado pelo tratamento com EAA depende da via de sinalização de DAF-16 e da via OSR-1/UNC-43/SEK-1.

5.8.4 Análise da translocação nuclear de DAF-16::GFP em *C. elegans* tratado com EAA

Como o tratamento com EAA aumentou a resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* de maneira dependente de DAF-16, nós investigamos se o tratamento com EAA ativa a translocação nuclear de DAF-16 em condições normais e de estresse. Nossos resultados mostraram que, em condições normais de cultivo, o tratamento com EAA não induziu a expressão nuclear de DAF-16::GFP (Figuras 19A e 19B). A condição de estresse utilizada neste estudo (7,5 mM de t-BOOH por 1 h), também não aumentou a fração de animais com expressão nuclear de DAF-16::GFP (Figura 19B). No entanto, sob condições de estresse, o tratamento com EAA reduziu significativamente a localização nuclear de DAF-16::GFP (Figura 19B). Uma possível explicação para este achado é que o EAA possa modificar ou interagir com DAF-16 e aumentar a sua atividade, mas não a sua concentração.

5.8.5 Efeito do EAA na expressão gênica de *daf-16* e seus genes alvo *sod-3*, *ctl-1* e *gst-7*

Para testar a hipótese de que o EAA esteja aumentando a atividade de DAF-16, nós medimos a expressão de *daf-16* e de alguns dos seus genes alvo envolvidos na resposta ao estresse em *C. elegans*. Após tratamento com 100 mg/mL de EAA, o RNAm de animais tipo selvagem e mutantes *daf-16(mu86)* foi extraído para posterior síntese do cDNA e análise da expressão gênica por qPCR. Os resultados demonstram que apesar do tratamento com EAA não ter alterado os níveis relativos do RNAm de *daf-16* (Figura 20A), este aumentou os níveis do RNAm de *ctl-1* e *gst-7* de maneira dependente de *daf-16* (Figura 20B). No entanto, o tratamento com EAA não induziu a expressão do RNAm de *sod-3* (Figura 20B), nem a expressão de *sod-3::GFP* (Figura 21). Em resumo,

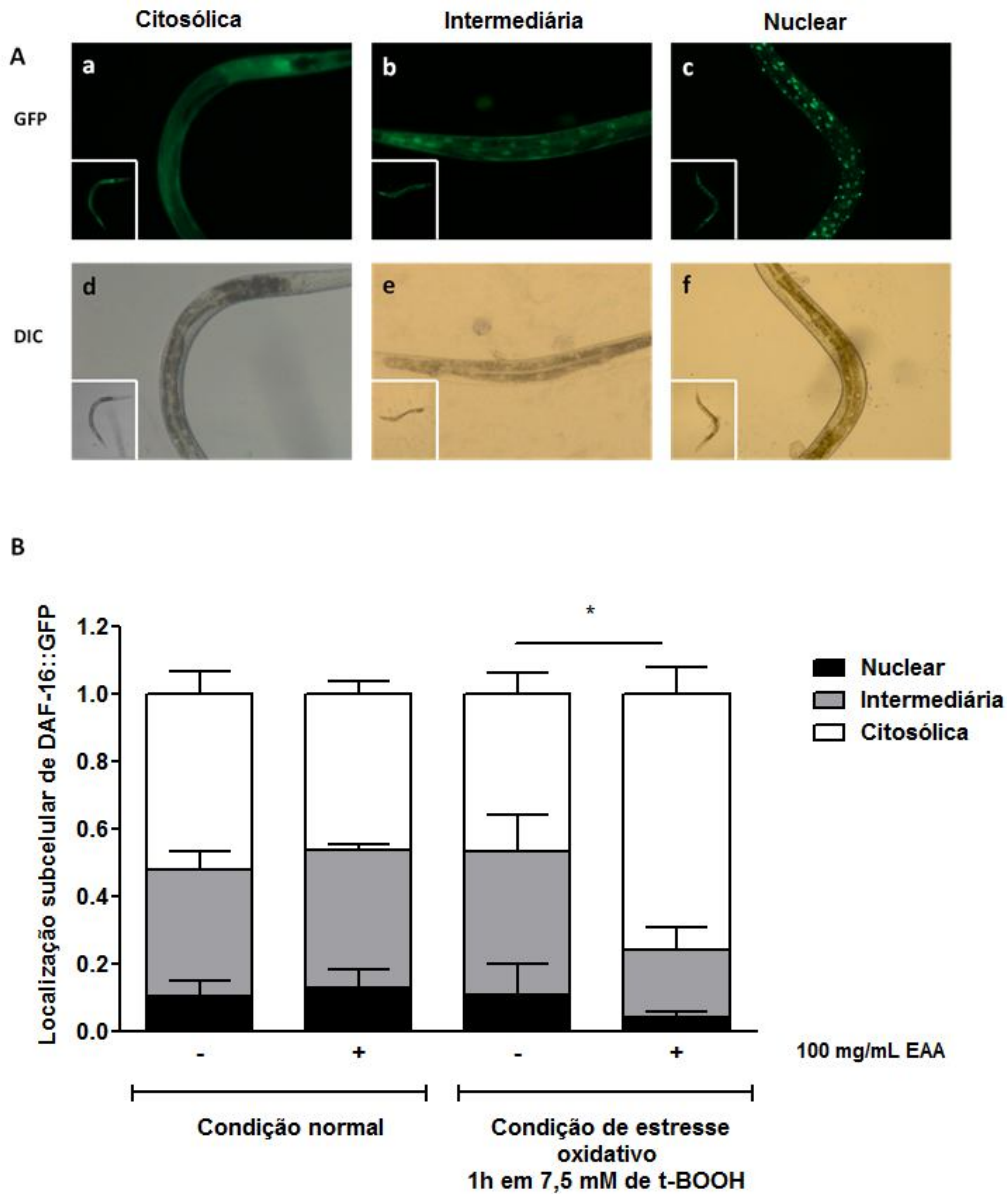


Figura 19: Análise da localização subcelular de DAF-16::GFP em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açai (EAA). Animais transgênicos contendo o gene repórter foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA durante 48 h desde L1, e então submetidos ou não à condição de estresse. As fotos foram capturadas em um microscópio de fluorescência. **A,B)** Animais *DAF-16::GFP* foram classificados quanto sua distribuição subcelular de DAF-16 em citosólica, intermediária e nuclear. * $p < 0,05$, pelo teste *t* de Student.

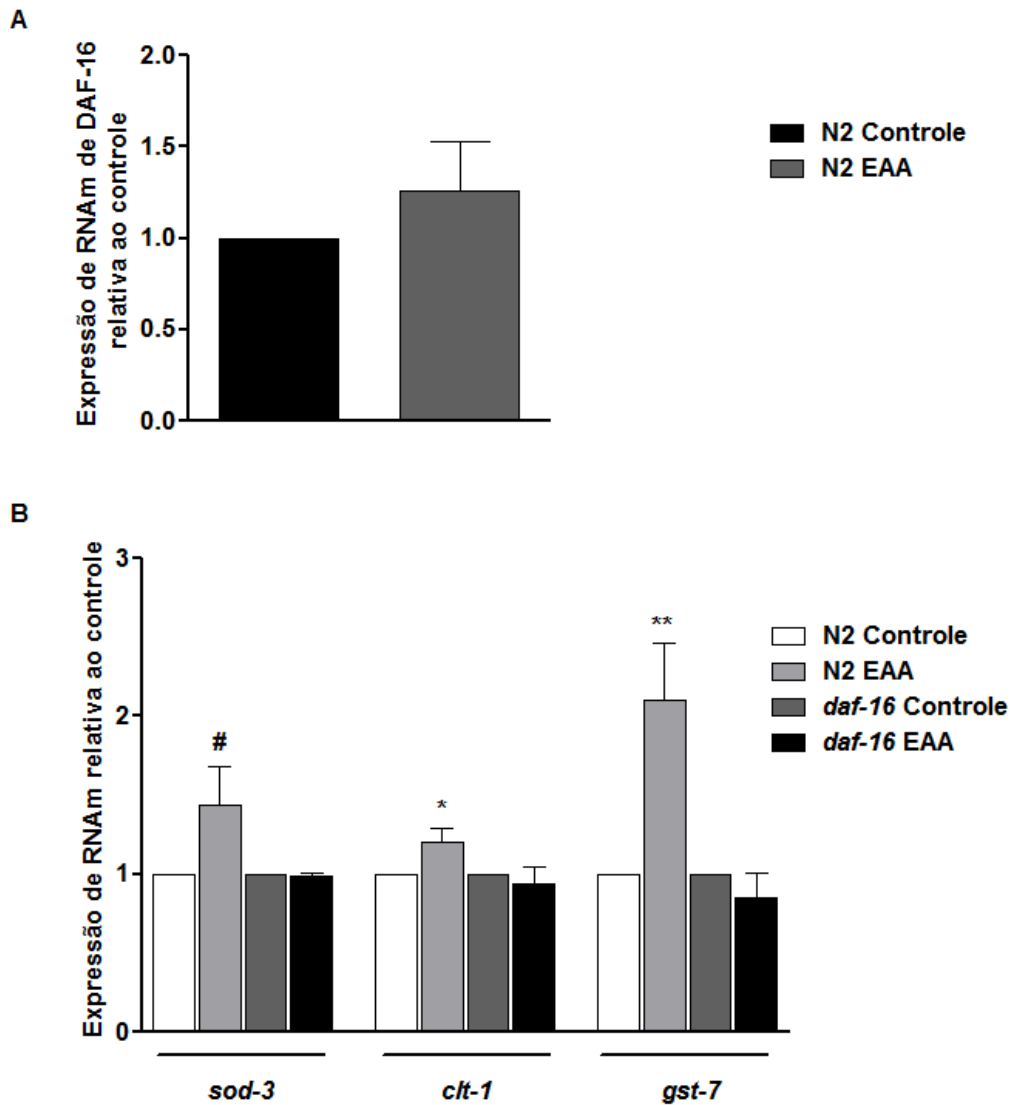


Figura 20: Análise da expressão de RNAm de DAF-16 e seus genes alvo induzíveis por estresse *sod-3*, *cti-1* e *gst-7* em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). A) Expressão de RNAm de DAF-16 de animais selvagens tratados ou não com 100 mg/mL de EAA durante 48 h desde L1 B) Expressão de RNAm dos genes alvo de DAF-16 induzíveis por estresse *sod-3*, *cti-1* and *gst-7* de animais selvagens e mutantes *daf-16* tratados ou não com 100 mg/mL de EAA. # $p = 0,07$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ pelo teste *t* de Student.

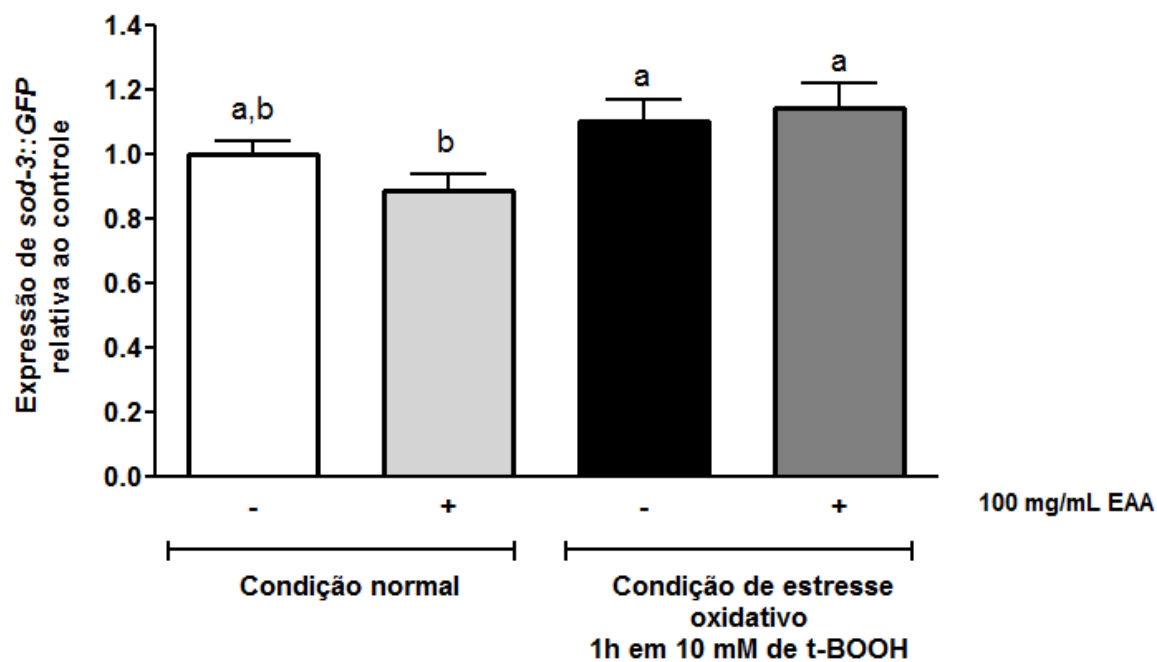


Figura 21: Avaliação da expressão de *sod-3::GFP* em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). Animais transgênicos contendo o gene repórter *sod-3::GFP* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA por 48 h desde L1, e então submetidos ou não à condição de estresse. Após 1 h de recuperação, as fotos foram capturadas em um microscópio de fluorescência. O sinal de fluorescência GFP foi medido usando o software NIH Image J. Letras diferentes correspondem à diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.

nossos resultados sugerem que o tratamento com EAA aumenta a resistência ao estresse oxidativo, ativando genes antioxidantes alvos de DAF-16.

5.9 Efeito do EAA na homeostase proteica

5.9.1 Análise da expressão de *osr-1* e *gpdh::GFP* em *C. elegans* tratado com EAA

OSR-1 é uma proteína secretada que atua juntamente com SEK-1/MAPKK através da UNC-43/CaMKII para promover a resistência ao estresse osmótico (SOLOMON *et al.*, 2004). A perda da função de OSR-1 ativa constitutivamente a expressão de *gpdh-1* com o consequente acúmulo de glicerol (WHEELER; THOMAS, 2006). O glicerol substitui íons inorgânicos no citoplasma e atua como uma chaperonina química que ajuda no enovelamento de proteínas (LAMITINA; HUANG; STRANGE, 2006). É possível que o EAA aumente tanto a resistência ao estresse oxidativo quanto o estresse osmótico, bloqueando diretamente a atividade de OSR-1 e induzindo a expressão de *gpdh-1*. Para testar esta hipótese, nós avaliamos os níveis de RNAm de OSR-1 e os níveis de expressão de *gpdh-1::GFP* em animais tratados ou não com 100 mg/mL de EAA durante 48 h. O tratamento com EAA não modificou a expressão gênica de *osr-1* sob condições normais (Figura 22) e reduziu a expressão de *gpdh::GFP* (Figura 23). Nossos resultados demonstram que o tratamento com EAA não interfere na expressão de *osr-1* e ainda diminui a expressão de *gpdh::GFP*. Estes achados não excluem a possibilidade de que o tratamento com EAA poderia estar interferindo na atividade da proteína OSR-1, que está acoplada à via de sinalização UNC-43/SEK-1 para promover a resistência ao estresse oxidativo.

5.9.2 Efeito do EAA na agregação de proteínas poliglutamínicas

Alternativamente, o EAA poderia funcionar como um fator de estresse leve, aumentando o estresse hipertônico e/ou a homeostase proteica. A força iônica elevada pode causar danos à estrutura secundária de proteínas, aumentando a agregação proteica (CHOE; STRANGE, 2007). Para testar a hipótese de que o tratamento com EAA poderia aumentar a força iônica, nós quantificamos a agregação de proteínas poliglutamínicas induzida pelo envelhecimento em animais transgênicos *vha-6::Q44::YFP*.

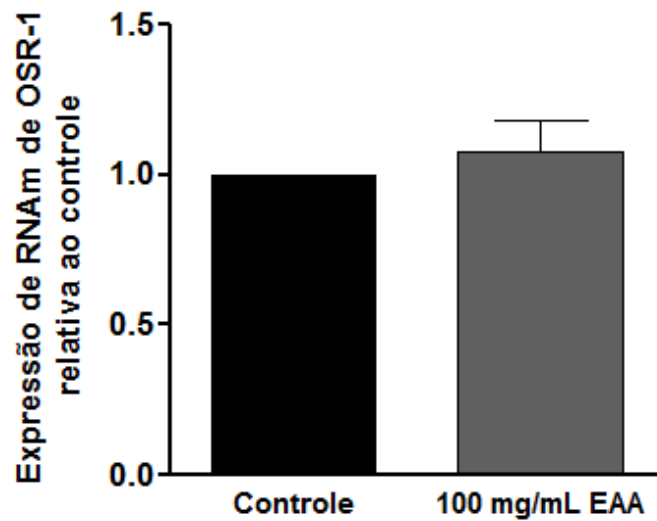


Figura 22: Análise da expressão de RNAm de OSR-1 em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). Expressão de RNAm de OSR-1 de animais selvagens tratados ou não com 100 mg/mL de EAA durante 48 h desde L1. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo test *t* de Student.

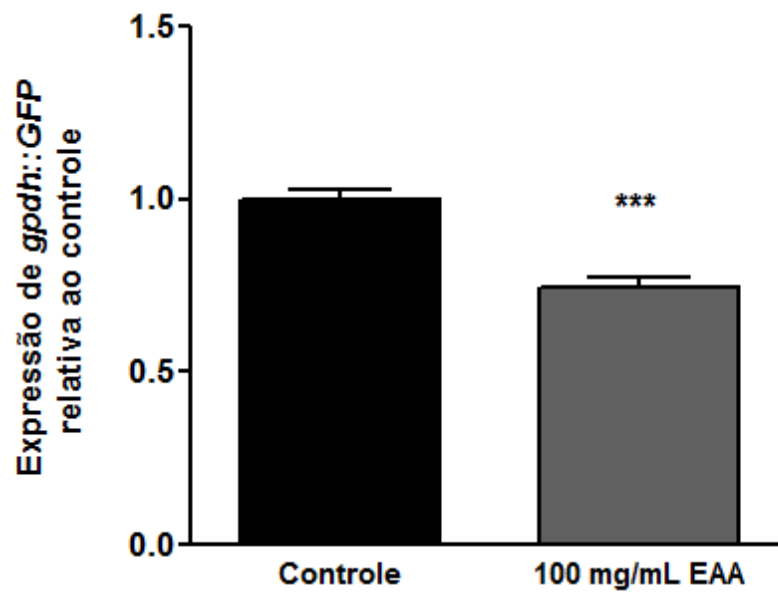


Figura 23: Avaliação da expressão de *gpdh::GFP* em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açai (EAA). Animais transgênicos contendo o gene repórter *gpdh-1::GFP* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA por 48 h desde L1. As fotos foram capturadas em um microscópio de fluorescência. O sinal de fluorescência GFP foi medido usando o software NIH Image J. *** $p < 0,001$ pelo teste *t* de Student.

Estes animais exibem uma fluorescência difusa por todo o intestino até atingirem a idade adulta, quando então, os agregados fluorescentes aumentam gradualmente com a idade. Em animais adultos de 1 dia de idade, a agregação Q44::YFP não foi diferente entre o grupo controle e o grupo tratado com 100 mg/mL de EAA (Figura 24), enquanto que animais Q44::YFP adultos de 4 dias de idade tratados com 100 mg/mL de EAA apresentaram aproximadamente o dobro de agregados que os animais controle ($p < 0,05$) (Figura 24). Embora o número médio de agregados tenha aumentado com a idade, o tratamento com EAA não teve nenhum efeito sobre a agregação proteica em animais Q44::YFP adultos de oito e doze dias de idade (Figura 24). Este resultado sugere que o tratamento com EAA acelera a formação de agregados proteicos na fase adulta jovem.

5.9.3 Efeito do EAA na atividade proteolítica do proteassoma

Para avaliar se o tratamento com EAA prejudica a homeostase de proteínas, nós medimos a atividade do proteassoma em animais tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4. A atividade semelhante à quimiotripsina do proteassoma foi monitorizada por digestão com SLLVY-MCA em extratos proteicos de animais L4 contendo quantidades iguais de proteína total. O tratamento com EAA diminuiu a atividade de degradação do proteassoma 2,5 vezes em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 25). Nossos resultados sugerem que o EAA pode aumentar a resistência ao estresse oxidativo e a resistência ao estresse osmótico através do aumento da força iônica e/ou modificações na homeostase proteica.

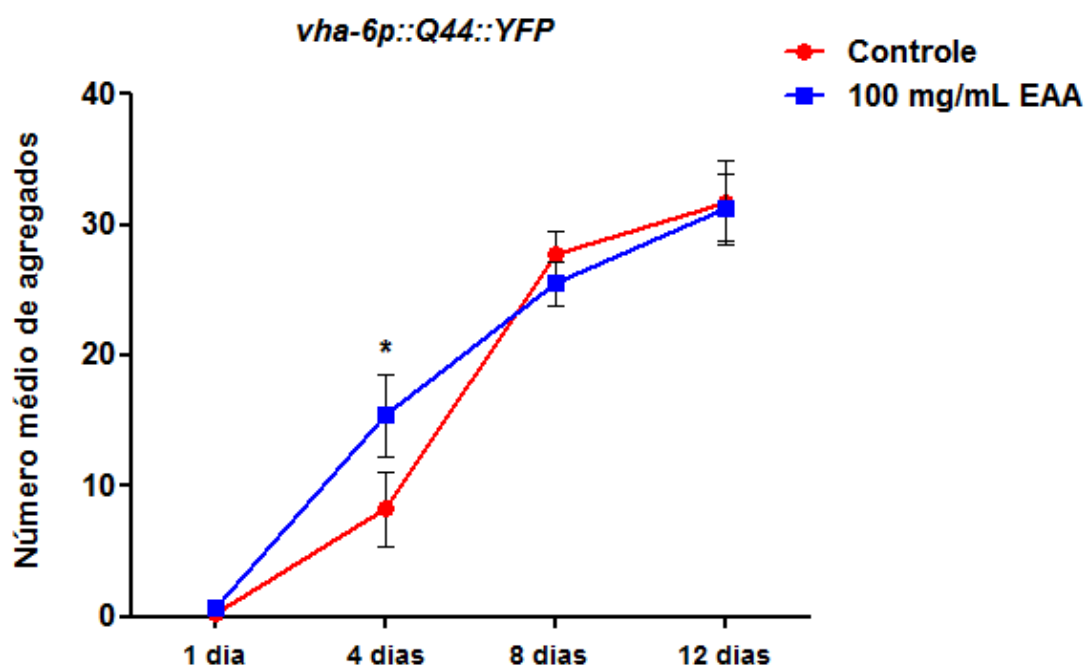


Figura 24: Análise da agregação poliglutamínica em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). Animais transgênicos carregando o gene reporter *vha-6::Q44::YFP* foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1. As fotos foram capturadas em animais adultos de 1, 4, 8 e 12 dias em um microscópio de fluorescência. O número de agregados foi contabilizado usando o software NIH Image J. * $p < 0,05$ pelo teste *t* de Student.

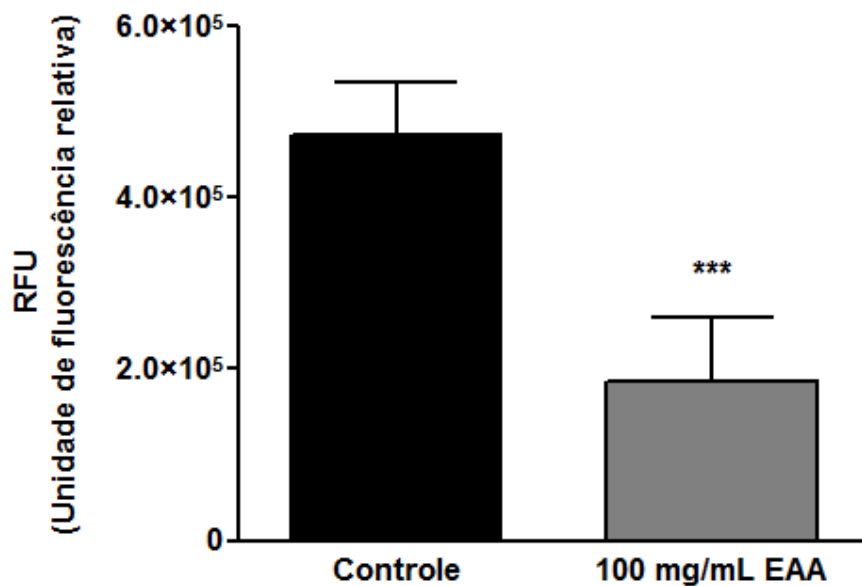


Figura 25: Análise da atividade proteassomal em *C. elegans* tratado com extrato aquoso de açaí (EAA). Os animais foram tratados com solução controle (S basal) ou 100 mg/mL de EAA desde L1 até L4. A atividade do proteassoma semelhante à quimiotripsina foi monitorada pela digestão com SLLVY-MCA em vermes no estágio larval L4, contendo igual quantidade de proteína total. *** $p < 0,001$ pelo teste t de Student.

6. DISCUSSÃO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) tem sido um fruto muito estudado nos últimos anos por ter uma ampla gama de benefícios terapêuticos e na promoção da saúde devido ao seu valor nutricional e aos altos níveis de compostos polifenólicos, especialmente antocianinas e proantocianidinas. Embora um grande número de estudos têm demonstrado que o tratamento com açaí apresenta atividade antiproliferativa, anti-inflamatória, antioxidante e efeitos cardioprotetores *in vitro* (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011), estudos *in vivo* são ainda escassos.

No nosso estudo, nós utilizamos uma abordagem *in vivo* para investigar as propriedades antioxidantes do açaí e seus mecanismos de ação subjacentes usando o organismo modelo *C. elegans*.

6.1 Avaliação da toxicidade do EAA

A toxicidade de diversos compostos, tais como urânio, alumínio, ferro, fluoreto de sódio, ácidos graxos trans e acrilamida foi demonstrada no *C. elegans* (DUTILLEUL *et al.*, 2013.; LI *et al.*, 2012; REISNER *et al.*, 2011; WANG; YANG; WANG, 2009; HU *et al.*, 2008; HASEGAWA *et al.*, 2004). Em comum, compostos considerados tóxicos para os vermes alteram suas características fenotípicas, como sobrevivência, tempo de geração, tamanho da prole, comprimento do corpo, curvatura corporal, plasticidade e locomoção. Neste estudo, nós avaliamos o desenvolvimento corporal, a progênie e a sobrevivência como parâmetros biológicos para análise da toxicidade do tratamento com EAA. O EAA não alterou o desenvolvimento, a quantidade total de prole gerada, bem como o perfil de geração e a sobrevivência dos animais. Desta forma, nós demonstramos que o tratamento com EAA não apresentou toxicidade no nosso modelo de estudo.

6.2 Avaliação da sobrevivência do *C. elegans* tratado com EAA sob condições de estresse

No nosso trabalho, nós demonstramos que o EAA aumenta a resistência ao estresse oxidativo, independentemente de qualquer efeito sobre a reprodução, o desenvolvimento e o crescimento bacteriano. O tratamento com

EAA responde ao estresse oxidativo de forma protetora. No entanto, ele não apresenta efeito sob condições de estresse térmico.

Outros compostos tais como, a quercetina, o extrato de ginkgo biloba e polifenóis presentes no extrato de mirtilo demonstraram aumento da termotolerância em *C. elegans* (KAMPKOTTER *et al*, 2008; KAMPKOTTER *et al*, 2007b; WILSON *et al*, 2006). A capacidade destes fitoquímicos em aumentar a resistência ao estresse térmico pode estar associada à composição de polifenóis, que é semelhante entre eles. No entanto, apesar do açaí apresentar compostos polifenólicos semelhantes aos encontrados nos extratos de “cranberry” (CBE), ginkgo biloba e mirtilo, o EAA não promoveu proteção contra estresse térmico.

Uma série de estudos demonstram que diferentes fitoquímicos podem agir em sinergismo para exercer as suas funções biológicas (APOSTOLIDIS; KWON; SHETTY, 2006; LIU, 2004; SEERAM *et al*, 2004). O açaí apresenta outros metabólitos bioativos, tais como, peonidina-3-rutinosídeo, peonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-arabinosilarabinosídeo, cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-acetil-hexose (SCHAUSS *et al.*, 2006; DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). Estes metabólitos podem estar agindo em sinergismo para promover o perfil diferenciado de resposta ao estresse mediado pelo EAA.

Da mesma forma, uma série de extratos botânicos que contêm altos níveis de polifenóis promovem resistência ao estresse de maneira diferencial em várias espécies. Por exemplo, o cacau, que contém flavonóides abundantes promove resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* (MARTORELL *et al.*, 2011). Extratos de nectarina e de açaí aumentam a sobrevivência de *Drosophila* sob condições de estresse oxidativo e alimentadas com dietas ricas em gordura (BOYD *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2010). O extrato de “cranberry” aumenta a resistência ao estresse térmico, mas não protege contra outros tipos de estresse como estresse oxidativo, radiação ultravioleta e estresse osmótico em *C. elegans* (GUHA *et al.*, 2012). Assim, não é inesperado que o tratamento com EAA não aumente a resistência ao estresse térmico em *C. elegans*.

6.3 Análise dos mecanismos diretos e indiretos envolvidos na resistência ao estresse mediada pelo EAA

6.3.1 Mecanismo de ação direto do EAA

A maioria das propriedades biológicas e funções envolvendo estrutura de proteínas, catálise enzimática e vias de sinalização de oxirredução dependem das propriedades de grupos tióis presentes tanto em proteínas quanto em moléculas de baixo peso molecular (BINDOLI; FUKUTO; FORMAN, 2008). Já está bem estabelecido na literatura que os níveis de grupos tióis também podem ser considerados biomarcadores do estresse oxidativo (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2013; SADOWSKA-WODA *et al.*, 2011; QUINLAN; EVANS; GUTTERIDGE, 1994; KADOTA *et al.*, 1991), uma vez que esses grupos contribuem significativamente para a capacidade antioxidante do plasma e sua depleção reflete oxidação intracelular. São representados principalmente pela albumina (principal fonte de grupos tióis ligados à proteína) e por tióis de baixo peso molecular como a glutathiona reduzida (GSH) e a cisteína (CSH) que quando oxidados formam a glutathiona oxidada (GSSG) e a cistina (CSSC), respectivamente (KOEHLER, 2003).

O *status* redox de tióis celulares é controlado por dois sistemas principais, o sistema da tiorredoxina e da glutathiona. O sistema da tiorredoxina contém a proteína tiorredoxina e a tiorredoxina redutase. No seu estado ativo, a tiorredoxina opera como um eficaz agente de redução, eliminando as espécies reativas de oxigênio e mantendo outras proteínas no seu estado reduzido. Depois de ter sido oxidada, a tiorredoxina ativa é regenerada pela ação da tiorredoxina redutase, usando NADPH como doador de elétrons. A glutathiona representa o grupo tiol não proteico predominante nas células, onde esta age como substrato enzimático e como agente protetor contra compostos xenobióticos e oxidantes, e quando mantida em seu estado reduzido pela glutathiona redutase, é capaz de transferir seus equivalentes redutores à várias enzimas, como a GPx, glutathiona transferases (GSTs) e glutarredoxinas (revisado por HO *et al.*, 2013; DICKINSON; FORMAN, 2002).

Outra enzima antioxidante importante na remoção de espécies reativas de oxigênio e detoxificação de compostos xenobióticos que produzem superóxido, direta ou indiretamente, é a superóxido dismutase (SOD). A SOD converte superóxidos altamente tóxicos em peróxido de hidrogênio. O peróxido

de hidrogênio produzido pela SOD é mantido em concentrações seguras pelo sistema da glutathione (Revisado por BORRELLI *et al.*, 2014).

Muitos polifenóis têm atividade antioxidante, e esta atividade é geralmente atribuída à sua capacidade de neutralizar diretamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os flavonóides são reconhecidos como antioxidantes eficientes na remoção de radicais livres, o que é largamente demonstrado em ensaios *in vitro*. Esta propriedade é, muitas vezes, atribuída como sendo responsável pelos efeitos benéficos à saúde de dietas ricas em flavonóides. No entanto, existem efeitos indiretos que podem ser de maior importância biológica para a ação *in vivo* dos flavonóides do que o envolvimento direto destes compostos em reações redox. Estudos têm indicado que altas concentrações de polifenóis são requeridas para induzir uma atividade antioxidante direta, enquanto baixas concentrações, como as fornecidas pela ingestão dietética, poderiam induzir efeito antioxidante indireto ou mesmo agir como pró-oxidantes (HOLLMAN *et al.*, 2011; FRAGA *et al.*, 2011).

Nossos resultados sugerem um mecanismo de ação direta do EAA através da redução da produção de ERO induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *C. elegans* e HUVEC. Muitos autores já demonstraram que a suplementação dietética com polifenóis e fitoquímicos diminui significativamente a produção de ERO em condições de estresse em *C. elegans*. Por exemplo, os flavonóides epicatequina, quercetina, rutina e o extrato de Ginkgo biloba EGb761 reduziu o acúmulo de ERO induzido pelo estresse térmico (GONZALEZ-MANZANO *et al.*, 2012; KAMPKOTTER *et al.*, 2007a; KAMPKOTTER *et al.*, 2007b;). Da mesma forma, o tratamento com miricetina, um flavonóide comumente utilizado como quimiopreventivo natural, também reduziu o acúmulo de ERO em animais tipo selvagem expostos ao H₂O₂ (BUCHTER *et al.*, 2013). Por outro lado, Guha *et al.* (2012) demonstraram que a suplementação com CBE não foi eficaz na redução dos níveis de ERO em vermes expostos ao paraquat.

Os efeitos antiproliferativo, pró-apoptótico, anti-inflamatório e antioxidante dos extratos de açaí têm sido avaliados por diversos estudos em cultura de células (SONG *et al.*, 2013; POULOSE *et al.*, 2012; NORATTO *et al.*, 2011; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT 2010; DEL

POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006). O extrato aquoso de açaí inibiu a formação de ERO mediada por H₂O₂ em macrófagos polimorfonucleares humanos mesmo em concentrações muito baixas (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Compostos polifenólicos isolados do extrato metanólico dos frutos de açaí apresentaram capacidade removedora do radical DPPH *in vitro* e exibiram atividade citoprotetora em células MCF-7 (linhagem de células de câncer de mama humano) expostas ao H₂O₂ (CHIN *et al.*, 2008).

Um estudo recente demonstrou que células MDA-MB-231 (linhagem de células de câncer de mama humano) pré-tratadas com cianidina-3-glicosídeo e posteriormente expostas à acrilamida (AAM), apresentaram menor toxicidade da AAM, redução da produção de ERO, recuperação dos níveis de glutathiona e diminuição da atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona-S-transferase em comparação com as células expostas somente à AAM. Os autores concluíram que o pré-tratamento com cianidina-3-glicosídeo, uma das antocianinas mais abundantes do fruto de açaí, apresenta papel protetor contra o estresse oxidativo induzido pela AAM nestas células (SONG *et al.*, 2013).

O sistema de detoxificação de compostos xenobióticos é conservado entre mamíferos e *C. elegans*. Em *C. elegans*, flavonóides e fitoquímicos aumentam a expressão de genes protetores, tais como *gst-4* (HASEGAWA *et al.*, 2010), *gcs-1* (GONZALEZ-MANZANO *et al.*, 2012) e *sod-3* (SHI *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, o tratamento com EAA não alterou a expressão de *gst-4*, *gcs-1* ou *sod-3*, em condições normais, mas preveniu a ativação de *gcs-1* em condições de estresse oxidativo. Além disso, o tratamento com EAA também preveniu a redução dos níveis de SH em condições de estresse oxidativo. Da mesma forma, os níveis de GSH em vermes tratados com epicatequina sob estresse térmico foram restaurados aos níveis normais (GONZALEZ-MANZANO *et al.*, 2012). Estes resultados indicam um modo de ação direto para o EAA, que pode ser parcialmente explicado pelos altos níveis de polifenóis presentes no açaí. Neste cenário, a propriedade removedora de radicais livres demonstrada pelo açaí *in vitro* e *in vivo*, representa a sua capacidade em agir diretamente neutralizando ERO produzidas sob condições de estresse. Como citado anteriormente, o tratamento com EAA não alterou a expressão de *sod-3*, no entanto, a redução do estresse no ambiente celular

promovida pelo EAA foi capaz de evitar a oxidação de grupos sulfidrilas e a ativação de GCS-1, a enzima limitante da via de síntese da glutathiona.

6.3.2 Mecanismo de ação indireto do EAA

Antioxidantes que atuam aumentando a resistência ao estresse oxidativo através da indução da transcrição de proteínas citoprotetoras exercem ação antioxidante indireta. No nosso trabalho, o aumento da resistência ao estresse oxidativo mediado pelo EAA também foi indiretamente dependente de DAF-16 e da via de sinalização ativada em resposta ao estresse osmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1. Nós demonstramos que o tratamento com EAA também aumentou a resistência ao estresse osmótico agudo em *C. elegans*. Esta resposta protetora pode ser explicada não só pela propriedade de remoção de radicais livres do EAA, mas também por um mecanismo indireto através da ativação de vias de sinalização de detoxificação em resposta ao estresse.

O fator de transcrição DAF-16/FOXO é regulado pela via de sinalização da insulina e é considerado um regulador chave de muitos processos biológicos importantes, incluindo a longevidade, metabolismo e resposta ao estresse (MUKHOPADHYAY; OH; TISSENBAUM, 2006).

A translocação nuclear de DAF-16 e a ativação da expressão de *sod-3* foram relatados para diferentes extratos e compostos polifenólicos, como extrato de “cranberry” (GUHA *et al.*, 2012) e *Dioscorea* fermentada por *Monascus* (SHI *et al.*, 2012), a quercetina (KAMPKOTTER *et al.*, 2008), miricetina e kaempferol (GRUNZ *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que o tratamento com EAA não aumenta a resistência ao estresse oxidativo em animais mutantes *daf-16(mu86)*, sugerindo que o tratamento com EAA protege contra o estresse oxidativo de maneira dependente de DAF-16. No entanto, o tratamento com EAA não aumenta a localização nuclear de DAF-16 ou a expressão de *sod-3* sob condições normais. Desta forma, nós sugerimos que o EAA possa interagir com DAF-16 e aumentar sua atividade, mas não sua concentração no núcleo, uma vez que DAF-16 é necessária para a proteção contra o estresse oxidativo mediada pelo EAA, mas este não aumenta a sua localização nuclear. Além disso, a ativação de DAF-16 pelo EAA no núcleo pode regular subconjuntos específicos de genes além de *sod-3*. Nós

observamos que o tratamento com EAA aumentou a expressão de *ctl-1* e *gst-7* de maneira dependente de DAF-16.

Recentemente, Tao *et al.* (2013) demonstraram em *C. elegans*, que DAF-16 é fosforilada e ativada por UNC-43/CaMKII em uma serina na posição 286. Outra proteína, TAX-6/Calcineurina remove este mesmo grupo fosfato. Desta forma, UNC-43 e TAX-6 regulam DAF-16 através da fosforilação reversível da proteína. Este mecanismo regulatório tem modo de ação diferente da via de sinalização da insulina, uma vez que é requerido para ativação e não para a inibição de DAF-16. A ativação de DAF-16 por UNC-43 ocorre em resposta a diferentes sinais de estresse, como estresse térmico, oxidativo e escassez de alimentos. Eles observaram que UNC-43 e TAX-6 regulam DAF-16 independentemente da via de sinalização da insulina e estes dois mecanismos parecem se coordenar para atuar sobre DAF-16. Finalmente, os autores demonstraram que a regulação de FOXO por CaMKII e Calcineurina é conservada em mamíferos.

OSR-1 é uma proteína que regula a sobrevivência do *C. elegans* em ambientes hiperosmóticos (SOLOMON *et al.*, 2004). OSR-1 atua conjuntamente com SEK-1/MAPKK através de UNC-43/CaMKII para promover a resistência ao estresse osmótico crônico. A dependência de UNC-43 para o aumento da sobrevivência em *C. elegans* foi demonstrada pelo tratamento com polifenóis do mirtilo (WILSON *et al.*, 2006), “cranberry” (GUHA *et al.*, 2012) e quercetina (PIETSCH *et al.*, 2009). No entanto, o efeito pró-longevidade induzido por estes fitoquímicos depende de forma diferente das quinases OSR-1 e SEK-1. Por exemplo, SEK-1, mas não OSR-1, é necessária para o aumento da longevidade promovido pela quercetina (PIETSCH *et al.*, 2009), enquanto que OSR-1, mas não SEK-1, é necessária para o efeito pró-longevidade do “cranberry” (GUHA *et al.*, 2012). Nosso estudo genético indica que OSR-1 é necessária para o aumento da resistência ao estresse oxidativo mediado pelo EAA, bem como UNC-43 e SEK-1. Wilson *et al.* (2006) verificaram que o aumento da longevidade induzido pelo tratamento com polifenóis do mirtilo é dependente da via OSR-1/UNC-43/SEK-1. Estes resultados sugerem que a via de sinalização OSR-1/UNC-43/SEK-1 é um alvo chave para antocianinas, os polifenóis predominantes presentes no açaí e mirtilo.

GUHA *et al.* (2012) observaram que o tratamento com CBE diminui a resistência ao estresse osmótico em *C. elegans*. Os autores explicam esta susceptibilidade ao estresse osmótico por uma depressão da via de sinalização CaMKII/p38 MAPK mediada pelo tratamento com CBE, com base na observação de que os níveis do RNAm de *osr-1* são regulados positivamente pelo tratamento com CBE. Uma regulação positiva de *osr-1* mediada por flavonóides da cebola também foi demonstrada por Xue *et al.* (2011).

Em nosso estudo, nós demonstramos que o tratamento com EAA aumentou a resistência ao estresse osmótico agudo em *C. elegans*. A perda de função da proteína OSR-1 ativa constitutivamente GPDH-1 e o acúmulo de glicerol (WHEELER; THOMAS, 2006). O glicerol, por sua vez, substitui íons inorgânicos no citoplasma e funciona como uma chaperonina química que ajuda no enovelamento de proteínas danificadas. Este efeito diminui o dano proteico sob condições de estresse osmótico (LAMITINA *et al.*, 2006). A princípio, nossa hipótese seria de que o EAA pudesse estar diminuindo os níveis de RNAm de *osr-1* e conseqüentemente aumentando a síntese de glicerol na célula. No entanto, o tratamento com EAA não modificou a expressão gênica de *osr-1* em condições normais e ainda reduziu a expressão de *gpdh::GFP*. Estes resultados não suportam a nossa hipótese de que o mecanismo de aumento da resistência ao estresse osmótico mediado pelo EAA envolva a regulação negativa de OSR-1 e o aumento da síntese de glicerol.

Como a resistência ao estresse oxidativo mediada pelo tratamento com EAA foi dependente de OSR-1, nossa hipótese é de que o açaí pode atuar diretamente, bloqueando a atividade da proteína OSR-1 ou mesmo inibindo proteínas acessórias. A inibição de OSR-1 pelo EAA por sua vez ativa UNC-43 e SEK-1 e, conseqüentemente, promove a resistência ao estresse oxidativo.

6.4 Análise da sobrevivência do *C. elegans* tratado com EAA sob condições normais

Notavelmente, o efeito pró-longevidade é uma característica comum observada em *C. elegans* submetidos à intervenções com fitoquímicos, tais como miricetina, CBE, quercetina e polifenóis do mirtilo (BUCHTER *et al.*, 2013; GUHA *et al.*, 2012; KAMPKOTTER *et al.*, 2008; WILSON *et al.*, 2006). O tratamento com EAA aumentou a resistência sob condições de estresse. No

entanto, ele não apresentou um efeito pró-longevidade, uma vez que não aumentou a sobrevivência do *C.elegans* sob condições normais. Esta ausência de correlação entre a capacidade antioxidante *in vitro* e o aumento da longevidade em *C. elegans* foi observada por Pun *et al.* (2009), onde os extratos das espécies *Cortex magnoliae officinalis* (casca), *Curculigo orchioides Gaertn* (rizoma), *Glycyrrhiza uralensis Fisch* (casca), *Psoralea corylifolia L.* (fruta), *Cratoxylum cochinchinense* (folhas), e casca de pinheiro não aumentaram a longevidade dos animais.

6.5 Avaliação do efeito do EAA na homeostase proteica

Danos oxidativos estão ligados à várias doenças relacionadas ao envelhecimento, e estão entre os mecanismos químicos que determinam a degradação proteica. Especialmente, estresse oxidativo e agregação proteica são relacionados à perda de função celular em patologias como na doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Revisado por VENKATARAMAN; KHURANA; TAI, 2013; CHAKRABORTY *et al.*, 2013).

Um estudo recente, verificou o envolvimento de vias de sinalização ativadas por estresse na patofisiologia da amiloidose cardíaca induzida pela agregação poliglutamínica associada à doença de Huntington em *Drosophila*. Entre os sinais observados estão o acúmulo de agregados, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e anormalidades cardíacas morfológicas e funcionais. Os autores demonstraram que a superexpressão da chaperona UNC-45 suprime a deposição amilóide e melhora parcialmente as disfunções cardíacas. Além disso, a superexpressão de SOD, assim como a ingestão dietética do antioxidante resveratrol também suprime parcialmente as disfunções cardíacas induzidas pela agregação proteica. Estes resultados sugerem que o mal envelhecimento proteico e/ou o estresse oxidativo podem ser a causa dos efeitos cardíacos deletérios mediados pelos agregados proteicos (MELKANI *et al.*, 2013).

Uma vez que o tratamento com EAA reduziu a produção de ERO em *C. elegans* nós esperaríamos que animais transgênicos *vha-6::Q44::YFP* tratados com EAA apresentassem menor quantidade de agregados em relação aos animais controle. No entanto, nós observamos que o tratamento com EAA aumentou o número de agregados da proteína Q44::YFP.

Uma hipótese para responder este efeito seria a possibilidade do EAA atuar como um agente estressor leve. Esta propriedade promoveria o aumento da força iônica e alterações na homeostase proteica. O que por sua vez, poderia também resultar em uma resposta protetora secundária sob condições de estresse osmótico. Em situações de elevada força iônica, a estrutura secundária das proteínas são rompidas, o que pode aumentar a agregação proteica (BURKEWITZ; CHOE; STRANGE, 2011; CHOE; STRANGE, 2008). Se o tratamento com EAA gera um ambiente hipertônico, poderíamos esperar o aumento da agregação de proteínas e da atividade de degradação proteasomal. Como citado anteriormente, o EAA aumentou a agregação proteica. No entanto, a atividade proteassomal foi significativamente reduzida, o que também pode ter contribuído para o aumento da agregação de proteínas poliglutamínicas.

6.6 Modelo proposto de atuação do EAA

Nosso estudo destaca as propriedades antioxidantes do EAA *in vivo*. Este trabalho também ajuda a revelar os mecanismos moleculares subjacentes pelos quais o EAA modula a resposta ao estresse. Propomos que o EAA modula a resistência ao estresse oxidativo por mecanismos diretos e indiretos. O tratamento com EAA remove ERO diretamente e previne a ativação de GCS-1, assim como a redução dos níveis de grupos SH, os quais, por sua vez protegem contra o estresse oxidativo. O EAA também promove a resistência ao estresse oxidativo indiretamente através de DAF-16 e OSR-1/UNC-43/SEK-1. Além disso, o EAA aumenta a resistência ao estresse osmótico, possivelmente como resultado do aumento da força iônica e/ou alterações na homeostase de proteínas (Figura 26). Independentemente do mecanismo específico envolvido, as nossas constatações indicam que os compostos naturais disponíveis no EAA podem melhorar a capacidade antioxidante de um organismo, sob certas condições de estresse.

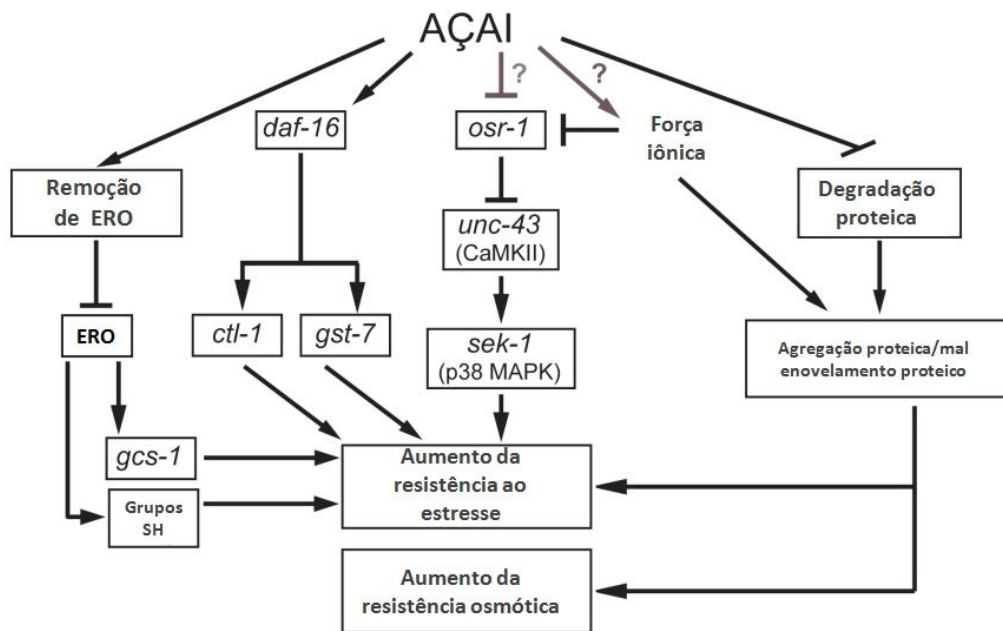


Figura 26: Modelo hipotético do mecanismo de ação do extrato aquoso de açaí (EAA) em *C. elegans*. Textos marcados dentro de retângulos representam moduladores ou dados observados experimentalmente neste trabalho. O EAA modula a resistência ao estresse oxidativo por mecanismos diretos e indiretos. O EAA remove ERO diretamente e previne a ativação de *gcs-1* e a redução de grupos SH mediadas pelo estresse oxidativo, o que por sua vez aumenta a resistência dos animais. O EAA também promove a resistência ao estresse oxidativo indiretamente através das vias DAF-16/OSR-1/UNC-43/SEK-1. Além disso, o EAA aumenta a resistência ao estresse osmótico, possivelmente como um resultado do prejuízo à homeostase proteica e/ou aumento da força iônica.

7. CONCLUSÕES

- O EAA apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*;
- O tratamento com EAA não é tóxico para o modelo *C. elegans*, uma vez que não retarda o desenvolvimento corporal e não reduz a prole e a sobrevivência sob condições normais;
- O EAA aumenta a resistência ao estresse oxidativo e hiperosmótico de maneira independente de sua atividade antimicrobiana;
- O EAA melhora o *status* redox em *C. elegans* e HUVEC sob condições de estresse oxidativo através da neutralização direta de ERO;
- O aumento da resistência ao estresse oxidativo induzido pelo EAA depende da via de sinalização DAF-16/FOXO e da via de sinalização ativada em resposta ao estresse hiperosmótico OSR-1/UNC-43/SEK-1, o que sugere um mecanismo de ação indireto do EAA;
- O tratamento com EAA induz a expressão de *ctl-1* e *gst-7* de maneira dependente de DAF-16;
- O EAA pode estar atuando como um agente estressor leve e desta forma aumentando a agregação de proteínas poliglutâmicas. Além disso, o EAA diminui a atividade de degradação proteossomal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAVIVA, R. *et al.* Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. **Cell Biol Toxicol**, v. 19, n. 4, p. 243-252, 2003.

ADACHI, H; ISHII, N. Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 55, n. 6, p. B280-285, 2000.

AKINMOLADUN, A.C.; OBUOTOR, E.M.; FAROMBI, E.O. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants. **J Med Food**, v. 13, n. 2, p. 444-451, 2010

AMIN, A.R. *et al.* Perspectives for cancer prevention with natural compounds. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 16, p. 2712-2725, 2009.

AN, J.H.; BLACKWELL, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes Dev**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.

AN, J.H. *et al.* Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n 45, p. 16275-16280, 2005.

ANDERSON, G.L.; BOYD, W.A.; WILLIAMS, P.L. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environ Toxicol Chem**, v. 20, n.4, p. 833-838, 2001.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I.; SHETTY, K. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 15, n. 3, p. 433-441, 2006.

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

BERTELLI, A.A.; DAS, D.K. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 468-476, 2009.

BINDOLI, A.; FUKUTO, J.M.; FORMAN, H.J. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 9, p. 1549-1564, 2008.

BORRELLI, A. *et al.* The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. **Biomed Res Int**, 2014:476789.

BOULANGER, E. *et al.* Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. **Kidney Int**, v. 71, n. 2, p. 126-133, 2007.

- BOUTROS, T.; CHEVET, E.; METRAKOS, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 3, p. 261-310, 2008.
- BOYD, O. *et al.* Nectarine promotes longevity in *Drosophila melanogaster*. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 11, p. 1669-1678, 2011.
- BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm Wiss Technol**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BREGER, J. *et al.* Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 2, p. e18, 2007.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- BROWN, M.D.; SACKS, D.B. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. **Cell Signal**, v. 21, n. 4, p. 462-469, 2009.
- BRUNET, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2011-2015, 2004.
- BUCHTER, C. *et al.* Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* Is Modulated by DAF-16. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 11895-11914, 2013.
- BURKEWITZ, K.; CHOE, K.; STRANGE, K. Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in *C. elegans*. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 3, p. C566-576, 2011.
- BUSTIN, S.A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- C. *ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998.
- CHAKRABORTY, S. *et al.* Oxidative stress mechanisms underlying Parkinson's disease-associated neurodegeneration in *C. elegans*. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 23103-23128, 2013.
- CHEN, N. *et al.* WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. 383-389, 2005.
- CHIN, Y.W. *et al.* Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. **J Agric Food Chem**, v. 56, n.17, p. 7759-7764,2008.
- CHOE, K.P.; STRANGE, K. Genome-wide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of damaged proteins as an essential hypertonic stress response. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 6, p. 1488-1498, 2008.

- CHOE, K.P.; STRANGE, K. Molecular and genetic characterization of osmosensing and signal transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **FEBS J**, v. 274, n. 22, p. 5782-5789, 2007.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nat Protoc**, v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.
- COÏSSON, J. D. *et al.* *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Res Int**, v. 38, p. 893-897, 2005.
- CONDEZO-HOYOS, L. *et al.* A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. **J Vasc Surg**, v. 57, n. 1. p. 205-213, 2013.
- COOKE, M.S. *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.
- CORSI, A.K. A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. **Anal Biochem**, v. 359, n. 1, p. 1-17, 2006.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep**, v. 26, n.8, p. 1001-1043, 2009.
- DABROWSKI, A. *et al.* Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. **Pancreas**, v. 21, n. 4, p. 376-384, 2000.
- DAVID, H.E. *et al.* Construction and evaluation of a transgenic hsp16-GFP-lacZ *Caenorhabditis elegans* strain for environmental monitoring. **Environ Toxicol Chem**, v. 22, n. 1, p. 111-118, 2003.
- DE MOURA, R.S. *et al.* Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 4, p. 855-863, 2011.
- DE OLIVEIRA, P.R. *et al.* Effects of an extract obtained from fruits of *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. 619-626, 2010.
- DE 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. 804-810, 2010.
- DE SOUZA, M.O. *et al.* The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutr Res**, v. 32, n 12, p. 976-984, 2012.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

- DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S.S.; TALCOTT, S.T. 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. 1222-1229, 2006.
- DENGG, M.; VAN MEEL, J.C. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 50, n. 3, p. 209-214, 2004.
- DICKINSON, D.A.; FORMAN, H.J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. **Ann N Y Acad Sci**, v. 973, p. 488-504, 2002.
- DING, M. *et al.* Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. **J Biol Chem**, v. 281, n. 25, p. 17359-17368, 2006.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. Suppl 1, p. S128-138, 2008.
- DUTHIE, S.J. *et al.* DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats in vivo and colon cells in vitro--modulation by the dietary anthocyanin, cyanidin-3-glycoside. **Eur J Nutr**, v. 44, n. 4, p. 195-203, 2005.
- DUTILLEUL, M. *et al.* Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 862-868, 2013.
- EASTON, A.; GUVEN, K.; DE POMERAI, D.I. Toxicity of the dithiocarbamate fungicide mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 15-25, 2001.
- ENGELS, G. Açai - *Euterpe oleracea* (herb profile). **Herbalgram** v. 86, p. 1-2, 2010.
- ERICKSON, J.R. *et al.* CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. **Physiol Rev**, v. 91, n. 3, p. 889-915, 2011.
- ERICKSON, J.R. *et al.* A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 462-474, 2008.
- EVASON, K. *et al.* Anticonvulsant medications extend worm life-span. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 258-262, 2005.
- EVASON, K. *et al.* Valproic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan. **Aging Cell**, v. 7, n. 3, p. 305-317, 2008.
- FEIO, C.A. *et al.* *Euterpe oleracea* (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 3, p. 237-245, 2012.
- FITZGERALD, V. *et al.* A transfer-less, multi-well liquid culture feeding system for screening small molecules that affect the longevity of *C. elegans*. **Biotechniques**, v. 47, p. ix-xv, 2009.

FOODBIZ <http://foodbizdaily.com/archive/2009/08/10/91816-the-acaiberrytrade-opportunity-a-quick-report.aspx> (accessed November 29, 2009).

FRAGA, C.G. *et al.* Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 6, p. 435-445, 2011.

GARIGAN, D. *et al.* Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1101-1112, 2002.

GEHART, H. *et al.* MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? **EMBO Rep**, v. 11, n. 11, p. 834-840, 2010.

GEMS, D.; RIDDLE, D.L. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 55, n. 5, p. B215-219, 2000.

GILCA, M. *et al.* The oxidative hypothesis of senescence. **J Postgrad Med**, v. 53, n. 3, p. 207-213, 2007.

GIRONES-VILAPLANA, A. *et al.* New beverages of lemon juice enriched with the exotic berries maqui, acai, and blackthorn: bioactive components and in vitro biological properties. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 26, p. 6571-6580, 2012.

GIUSTI M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE AT, An H, *et al.*, editor. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York: Wiley. pp. Unit F1.2.1–13, 2001.

GONZALEZ-MANZANO, S. *et al.* Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 36, p. 8911-8916, 2012.

GORDON, A. *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256-263, 2012.

GRUNZ, G. *et al.* Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. **Mech Ageing Dev**, v. 133, n. 1, p. 1-10, 2012.

GUERRA, J.F. *et al.* Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **J Clin Biochem Nutr**, v. 49, n. 3, p. 188-194, 2011.

GUHA, S. *et al.* The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1. **Age (Dordr)**, v. 5, p. 1559-1574, 2012.

HARMAN, D. Aging: phenomena and theories. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 1-7, 1998.

HASEGAWA, K. *et al.* A rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide, a harmful substance in food. **Toxicol Lett**, v. 175, n. 1-3, p. 82-88, 2007.

HASEGAWA, K. *et al.* Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol Sci**, v. 101, n. 2, p. 215-225, 2008.

HASEGAWA, K. *et al.* Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9267, 2010.

HASEGAWA, K. *et al.* Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol Lett**, v. 152, n. 2, p. 183-189, 2004

HAYES, J.D.; MCMAHON, M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. **Cancer Lett**, v. 174, n. 2, p. 103-113, 2001.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochem Lett**, v. 4, n. 1, p. 10-21, 2011.

HELMCKE, K.J. *et al.* Characterization of the effects of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 240, n. 2, p. 265-272, 2009.

HO, E. *et al.* Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol**, v. 1, n. 1, p. 483-491, 2013.

HOEVEN, R. *et al.* Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 12, p. e1002453, 2011.

HOGAN, S. *et al.* Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HOLLMAN, P.C. *et al.* The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 989S-1009S, 2011.

HOLT, E.M. *et al.* Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. **J Am Diet Assoc**, v. 109, n. 3, p. 414-421, 2009.

HONDA, Y.; HONDA, S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **FASEB J**, v. 3, n. 11, p. 1385-1393, 1999.

HONZEL, D. *et al.* Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 18, p. 8319-8325, 2008.

HOOGEWIJS, D.; HOUTHOOFD, K.; MATTHIJSSSENS, F.; VANDESOMPELE, J.; VANFLETEREN, J.R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 9, 2008.

HRIBAL, M.L. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. **J Cell Biol**, v. 162, n. 4, p. 535-541, 2003.

HU, Y.O. *et al.* Phenotypic and behavioral defects induced by iron exposure can be transferred to progeny in *Caenorhabditis elegans*. **Biomed Environ Sci**, v. 21, n. 6, p. 467-473, 2008.

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

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.

JENSEN, G.S. *et al.* Pain reduction and improvement in range of motion after daily consumption of an acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp-fortified polyphenolic-rich fruit and berry juice blend. **J Med Food**, v. 14, n. 7-8, p. 702-711, 2011.

KADOTA, K. *et al.* Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. **Jpn Circ J**, v. 55, n. 10, p. 937-941, 1991.

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

KAMATA, H. *et al.* Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 649-661, 2005.

KAMPKOTTER, A. *et al.* Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 149, n. 2, p. 314-323, 2008.

KAMPKOTTER, A. *et al.* Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 234, n. 1-2, p. 113-123, 2007a.

KAMPKOTTER, 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*. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 2, p. 139-147, 2007b.

KANG, J. *et al.* Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chem**, v. 128, n. 1, p. 152-157, 2011.

- KISSELEV, A.F.; GOLDBERG, A.L. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. **Methods Enzymol**, v. 398, p. 364-378, 2005.
- KITAMURA, T. *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. **J Clin Invest**, v. 117, n. 9, p. 2477-2485, 2007.
- KOEHLER, P. Effect of ascorbic acid in dough: reaction of oxidized glutathione with reactive thiol groups of wheat glutenin. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 17, p. 4954-4959, 2003.
- KOPS, G.J. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature**, v. 419, n. 6904, p. 316-321, 2002.
- KROTZ, F.; SOHN, H.Y.; POHL, U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 11, p. 1988-1996, 2004.
- LABRADOR, V. *et al.* Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 23, n. 3, p. 189-199, 2007.
- LAI, F.R. *et al.* Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. **Carbohydr Polym**, v. 81, n. 2, p. 323-329, 2010.
- LAMITINA, T.; HUANG, C.G.; STRANGE, K. Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 32, p. 12173-12178, 2006.
- LANDIS, J.N.; MURPHY, C.T. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. **Dev Dyn**, v. 239, n. 5, p. 1405-1412, 2010.
- LARSEN, P.L. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 19, p. 8905-8909, 1993.
- LASLO, M. *et al.* A botanical containing freeze dried acai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 4, p. 1117-1132, 2013.
- LEE, J.M. *et al.* Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 14, p. 12029-12038, 2003.
- LEUNG, M.C. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicol Sci**, v. 106, n. 1, p 5-28, 2008.
- LI, Q. *et al.* Toxicity of sodium fluoride to *Caenorhabditis elegans*. **Biomed Environ Sci**, v. 25, n. 2, p. 216-223, 2012.
- LICHTENTHALER, R. *et al.* Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. **Int J Food Sci Nutr**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

- LIEDO, P. *et al.* The interplay among dietary fat, sugar, protein and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp in modulating lifespan and reproduction in a Tephritid fruit fly. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 7, p. 536-539, 2012.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S-3485S, 2004.
- LIU, Z.P. *et al.* Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. **Dev Cell**, v. 9, n. 2, p. 261-270, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. **Pharmacol Ther**, v. 125, n. 3, p. 376-393, 2010.
- MA, Q. Xenobiotic-activated receptors: from transcription to drug metabolism to disease. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 9, p. 1651-1671, 2008.
- MALEMUD, C.J. *et al.* Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 3, p. 339-343, 2007.
- 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. 2077-2085, 2011.
- MCCUBREY, J.A.; LAHAIR, M.M.; FRANKLIN, R.A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1775-1789, 2006.
- MELKANI, G.C. *et al.* Huntington's disease induced cardiac amyloidosis is reversed by modulating protein folding and oxidative stress pathways in the *Drosophila* heart. **PLoS Genet**, v. 9, n. 12, p. e1004024, 2013.
- MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amaz.**, v. 38, n.2, p. 311-316, 2008.
- MENG, D. *et al.* Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 11, p. 1651-1660, 2007.
- MENZEL, R. *et al.* CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Arch Biochem Biophys**, v. 438, n. 1, p. 93-102, 2005.
- MERTENS-TALCOTT, S.U. *et al.* Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp

- (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 7796-7802, 2008.
- MITSCHER, L.A. *et al.* Natural antimutagenic agents. **Mutat Res**, v. 350, n. 1, p. 143-152, 1996.
- MONTIEL-DAVALOS, A. *et al.* Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 1, p. 135-141, 2010.
- MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 11, p. 549-557, 2004.
- MU, L. *et al.* Comparison of the neuroprotective effects of flavonoids and terpenoids, and their combinations from ginkgo biloba on ischemia-reperfusion-injured mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 728-733, 2007.
- MUKHOPADHYAY, A.; OH, S.W.; TISSENBAUM, H.A. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. **Exp Gerontol**, v. 41, n. 10, p. 928-934, 2006.
- MURPHY, C.T. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. **Exp Gerontol**, v. 41, n. 10, p. 910-921, 2006.
- 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.
- MUTWAKIL, M.H. *et al.* Use of stress-inducible transgenic nematodes as biomarkers of heavy metal pollution in water samples from an english river system. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 32, n. 2, p. 146-153, 1997.
- NAGAI, H. *et al.* Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **J Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 2007.
- NAKAE, J. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. **Dev Cell**, v. 4, n. 1, p. 119-129, 2003.
- NORATTO, G.D. *et al.* Polyphenolics from acai (*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**, v. 59, n. 14, p. 7999-8012, 2011.
- NUNES, D.S. Avaliação dos efeitos antioxidantes e pró-longevidade do extrato de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.
- OH, W.S. *et al.* Identification and characterization of a dual-acting antinematodal agent against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7593, 2009.

- OKOLI, I. *et al.* Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7025, 2009.
- OLIVEIRA, R.P. *et al.* Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. **Ageing Cell**, v. 8, n. 5, p. 524-541, 2009.
- OLIVEIRA, R.P. *et al.* Isothiocyanate and triterpenoid treatment induces SKN-1 and DAF-16 oxidative stress response and prolongs *C. elegans* life span. In: **International C. elegans Meeting**, XV, Los Angeles, 2007.
- OLOYEDE, K.G. *et al.* Antioxidant and Anticonvulsant Alkaloids in *Crinum ornatum* bulb Extract. **World journal of chemistry**, v. 5, n. 1, p. 26-31, 2010.
- ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8758, 2010.
- OWEN, R.W. *et al.* The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **Eur J Cancer**, v. 36, n. 10, p. 1235-1247, 2000.
- PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 12, p. 4631-4636, 2008.
- PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1071-1078, 2010.
- PETRASCHECK, M.; YE, X.; BUCK, L.B. An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 553-556, 2007.
- PIETSCH, K. *et al.* Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. **Biogerontology**, v. 10, n. 5, p. 565-578, 2009.
- POULOSE, S.M. *et al.* Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 4, p. 1084-1093, 2012.
- PUN, P.B. *et al.* Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? **Biogerontology**, v. 11, n. 1, p. 17-30, 2010.
- QUINLAN, G.J.; EVANS, T.W.; GUTTERIDGE, J.M. Linoleic acid and protein thiol changes suggestive of oxidative damage in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome. **Free Radic Res**, v. 20, n. 5, p. 299-306, 1994.
- RATNAM, D.V. *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J Control Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

- REINKE, V. Functional exploration of the *C. elegans* genome using DNA microarrays. **Nat Genet**, v. 32, p. Suppl 541-546, 2002.
- REISNER, K. *et al.* Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant fat-3. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 25, n. 5, p. 269-279, 2011.
- RELLOS, P. *et al.* Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. **PLoS Biol**, v. 8, n. 7, p. e1000426, 2010.
- RIBEIRO, J.C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutat Res**, v. 695, n. 1-2, p. 22-28, 2010.
- RIMBACH, G. *et al.* Polyphenols from cocoa and vascular health-a critical review. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 10, p. 4290-4309, 2009.
- ROH, J.Y.; LEE, J.; CHOI, J. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 25, p. 2946–2956, 2006.
- RUFFELS, J., GRIFFIN, M.; DICKENSON, J.M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. **Eur J Pharmacol**, v. 483, n. 2-3, p. 163-173, 2004.
- RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2100-2106, 2011.
- SADOWSKA-WODA, I. *et al.* Nutritional supplement attenuates selected oxidative stress markers in pediatric patients with cystic fibrosis. **Nutr Res**, v. 31, n. 7, p. 509-518, 2011.
- SALA, A. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. **J Pharm Pharmacol**, v. 54, n. 3, p. 365-371, 2002.
- SALIH, D.A.; BRUNET, A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20, n. 2, p. 126-136, 2008.
- SAMOYLENKO, V. *et al.* Antiparasitic, nematicidal and antifouling constituents from Juniperus berries. **Phytother Res**, v. 22, n. 12, p. 1570-1576, 2008.
- SANGHA, J.S. *et al.* Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against beta-amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43990, 2012.
- SANTOS, G.M. *et al.* Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). **Arch Latinoam Nutr**, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.

- SCHAUSS, A.G. *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006a.
- SCHAUSS, A.G. *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006b.
- SCHOUEST, K. *et al.* Toxicological assessment of chemicals using *Caenorhabditis elegans* and optical oxygen respirometry. **Environ Toxicol Chem**, v. 28, n. 4, p. 791-799, 2009.
- SCHRECKINGER, M.E. *et al.* Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **J Med Food**, v. 13, n. 2, p. 233-246, 2010.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. 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.
- SEERAM, N.P. *et al.* Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 9, p. 2512-2517, 2004.
- SERRAINO, I. *et al.* Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **LIFE SCI**, v. 73, n. 9, p. 1097-1114, 2003.
- SHI, Y.C. *et al.* Monascus-fermented dioscorea enhances oxidative stress resistance via DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39515, 2012.
- SOLOMON, A. *et al.* *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. **Genetics**, v. 167, n. 1, p. 161-170, 2004.
- SON, T.G.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Hormetic dietary phytochemicals. **Neuromolecular Med**, v. 10, n. 4, p. 236-246, 2008.
- SON, Y. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? **J Signal Transduct**, v. 2011, p. 792639, 2011.
- SONG, J. *et al.* Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 58, p. 306-310, 2013.
- SONG, Y.H. A Memory Molecule, Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Redox Stress; Key Factors for Arrhythmias in a Diseased Heart. **Korean Circ J**, v. 43, n. 3, p. 145-151, 2013.
- SPADA, P.D. *et al.* Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **J Med Food**, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.

SPADA, P.D. *et al.* Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **J Med Food**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

SPORN, M.B.; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 10, p. 518-525, 2005.

SUGIMOTO, A. High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. **Differentiation**, v. 72, n. 2-3, p. 81-91, 2004.

SUN, X. *et al.* Acai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Exp Gerontol** 45(3): 243-251, 2010.

SUR, P., *et al.* Antiinflammatory and antioxidant property of saponins of tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] root extract. **Phytother Res**, v. 15, n. 2, p. 174-176, 2001.

SURH, Y.J. *et al.* Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. **Planta Med**, v. 74, n. 13, p. 1526-1539, 2008.

TAKEKAWA, M. *et al.* Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. **Nagoya J Med Sci**, v. 73, n. 1-2, p. 1-14, 2011.

TAMPAKAKIS, E.; OKOLI, I.; MYLONAKIS, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1925-1931, 2008.

TAO, L. *et al.* CAMKII and Calcineurin regulate the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through the FOXO transcription factor DAF-16. **Elife**, v. 2, p. e00518, 2013.

TORRES, M.; FORMAN, H.J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors**, v. 17, n. 1-4, p. 287-296, 2003.

TULLET, J.M. *et al.* Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1025-1038, 2008.

UDANI, J.K. *et al.* Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. **Nutr J**, v. 10, p. 45, 2011.

UTTARA, B. *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DER HORST, A. *et al.* FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (SIRT1). **J Biol Chem**, v. 279, n. 28, p. 28873-28879, 2004.

- VANFLETEREN, J.R.; DE VREESE, A. The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. **Faseb J**, v. 9, n. 13, p. 1355-1361, 1995.
- VENKATARAMAN, K.; KHURANA, S.; TAI, T.C. Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17897-17925, 2013.
- VIGNESHKUMAR, B.; PANDIAN, S.K.; BALAMURUGAN, K. Catalase activity and innate immune response of *Caenorhabditis elegans* against the heavy metal toxin lead. **Environ Toxicol**, v. 28, n. 6, p. 313-321, 2013.
- WALKER, A.K. *et al.* A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 22166-22171, 2000.
- WANG, D.Y.; YANG, Y.C.; WANG, Y. Aluminium toxicosis causing transferable defects from exposed animals to their progeny in *Caenorhabditis elegans*. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, v. 43, n. 1, p. 45-51, 2009.
- WATERMAN, C. *et al.* Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 3, p. 755-759, 2010.
- WHEELER, J.M.; THOMAS, J.H. Identification of a novel gene family involved in osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 174, n. 3, p. 1327-1336, 2006.
- WILSON, M.A. *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Ageing Cell**, v. 5, n. 1, p. 59-68, 2006.
- WU, Z. *et al.* Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 48, n. 6, p. 725-731, 2002.
- XIE, C. *et al.* Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-333, 2011.
- XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Arch Pharm Res**, v. 28, n. 3, p. 249-268, 2005.
- XUE, Y.L. *et al.* Isolation and *Caenorhabditis elegans* lifespan assay of flavonoids from onion. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 11, p. 5927-5934, 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. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 4, p. 623-634, 2011.
- YU, Y.B. *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. e9339, 2010.

ZHANG, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. **Drug Metab Rev**, v. 38, n. 4, p. 769-789, 2006.

9. ANEXO

9.1 ANEXO 1

Tabela A: Valores de Ct para os genes de referência endógena analisados.

Gene	N2	N2 EAA	<i>daf-16(mu86)</i>	<i>daf-16(mu86)</i> EAA
<i>ama-1</i>	22,94±0,04	22,65±0,05	22,59±0,02	22,12±0,05
<i>act-1</i>	18,52±0,03	16,78±0,05	17,28±0,03	16,46±0,05
<i>gpd-2</i>	21,07±0,01	19,24±0,03	20,30±0,06	19,37±0,10
<i>csq-1</i>	21,84±0,11	21,45±0,06	21,95±0,18	21,92±0,05

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão

9.2 ANEXO 2

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms

Larissa de Freitas Bonomo¹, David Nunes Silva¹, Patrícia Ferreira Boasquivis¹, Franciny Aparecida Paiva¹, Joyce Ferreira da Costa Guerra¹, Talita Alves Faria Martins³, Álvaro Gustavo de Jesus Torres³, Igor Thadeu Borges Raposo de Paula¹, Washington Luiz Caneschi¹, Philippe Jacolot⁴, Nicolas Grossin⁵, Frederic J. Tessier⁴, Eric Boulanger⁵, Marcelo Eustáquio Silva^{1,6}, Maria Lúcia Pedrosa^{1,2}, Riva de Paula Oliveira^{1,3*}

1 Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, **2** Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, **3** Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, **4** Institut polytechnique LaSalle Beauvais, Beauvais, France, **5** Faculté de Médecine – Pôle Recherche, Université de Lille 2, Lille, France, **6** Departamento de Alimentos, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

Abstract

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) has recently emerged as a promising source of natural antioxidants. Despite its claimed pharmacological and nutraceutical value, studies regarding the effects of açaí *in vivo* are limited. In this study, we use the *Caenorhabditis elegans* model to evaluate the *in vivo* antioxidant properties of açaí on an organismal level and to examine its mechanism of action. Supplementation with açaí aqueous extract (AAE) increased both oxidative and osmotic stress resistance independently of any effect on reproduction and development. AAE suppressed bacterial growth, but this antimicrobial property did not influence stress resistance. AAE-increased stress resistance was correlated with reduced ROS production, the prevention of sulfhydryl (SH) level reduction and *gcs-1* activation under oxidative stress conditions. Our mechanistic studies indicated that AAE promotes oxidative stress resistance by acting through DAF-16 and the osmotic stress response pathway OSR-1/UNC-43/SEK-1. Finally, AAE increased polyglutamine protein aggregation and decreased proteasome activity. Our findings suggest that natural compounds available in AAE can improve the antioxidant status of a whole organism under certain conditions by direct and indirect mechanisms.

Citation: Bonomo LdF, Silva DN, Boasquivis PF, Paiva FA, Guerra JFdC, et al. (2014) Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. PLoS ONE 9(3): e89933. doi:10.1371/journal.pone.0089933

Editor: Aamir Nazir, CSIR-Central Drug Research Institute, India

Received: October 4, 2013; **Accepted:** January 24, 2014; **Published:** March 3, 2014

Copyright: © 2014 Bonomo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Process 473015/2008 0), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG Process CBBAPQ-01153-08 and CBB-PPM-00491-10) and Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Research fellowships were sponsored by CAPES (Bonomo, L.F.; Boasquivis, P.F.; de Paula, I.T.B.R.; Guerra, J.F.C.), CNPq (Oliveira, R.P., Pedrosa, M.L., Silva, M.E.), FAPEMIG (Paiva, F.A.; Silva, D.N.) and UFOP (Caneschi, W.L.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: rivaoliveira@nupe.ufop.br

Introduction

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is an exotic fruit originally native to Central and South America that grows in the floodplains of the Amazon region [1]. Traditionally, açaí is used as a medicinal plant and as a staple food in many parts of Brazil. In recent years, açaí pulp has gained international attention as a functional food due to its nutritional benefits and therapeutic promise. Composition analysis shows that açaí pulp contains approximately 13% protein, 48% lipids, 1.5% total sugar and several other nutrients such as lignans, dietary fiber and polyphenols [2]. The main polyphenols found in açaí are anthocyanins, proanthocyanidins (specifically cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside) and other flavonoids [2,3]. The overall pharmacological properties of açaí are related to its antiproliferative, anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective effects [4].

Açaí pulp and its polyphenolic fractions show high antioxidant activity based on various *in vitro* assays, predominantly against DPPH, superoxide and hydroxyl radicals and hypochlorous acid [5–11]. *In vitro* cell-based assays have also demonstrated that the pulp can reduce ROS production in human erythrocytes and polymorphonuclear (PMN) cells exposed to oxidative stress [8,9]. Brain tissue cells pretreated with açaí decreased H₂O₂-induced damage to lipids and proteins and reduced the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) to basal levels [12].

Despite its claimed pharmacological and nutraceutical value, studies regarding the effects of açaí *in vivo* are limited [4]. Dietary açaí in rats reduces ROS production by neutrophils, increases GSH levels, reduces protein damage and activates the gene expression of glutathione peroxidase (GPx) and γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) in the liver [13]. In humans, intervention studies of volunteers ingesting an açaí juice blend showed a

significant increase in serum antioxidant capacity and a reduction of lipid peroxidation [8,14]. In another study, açai puree improved select markers of metabolic disease risk in overweight adults [15]. The high superoxide and peroxy radical scavenging capacity of açai pulp suggests that açai has anti-aging properties. In *Drosophila melanogaster*, dietary açai supplementation increased the lifespan of female flies fed a high fat diet and also under oxidative stress induced by *sod1* RNAi [16]. In another fruit fly, *Anastrepha ludens*, açai supplementation promoted survival in flies on diets with high fat and high sugar while decreasing lifetime reproductive output [17].

In addition to flies, genetic and pharmacological modifications of stress resistance and lifespan mechanisms have been well elucidated in the nematode *Caenorhabditis elegans*. A number of genes and pathways have been identified to modulate lifespan in *C. elegans*. These highly conserved pathways include the insulin/IGF-1 receptor-like signaling pathway, which depends on the transcription factor DAF-16/FOXO. Reduced insulin/IGF-1 signaling activates DAF-16 nuclear localization, which in turn induces the expression of genes that increase lifespan and promote resistance to various stresses [18]. SKN-1/Nrf is another transcription factor regulated by the insulin/IGF-1 signaling pathway [19]. SKN-1 contributes to the increased stress tolerance and longevity resulting from reduced insulin/IGF-1 signaling independently of DAF-16 [19]. Using this model, several studies have demonstrated the beneficial effects of natural products in promoting stress resistance and longevity, including extracts from *Ginkgo biloba* [20], blueberry [21], *Cinnamomum cassia* bark [22] and cranberry [23].

In the present study, we use the *C. elegans* model to evaluate the *in vivo* antioxidant properties of açai on an organismal level and to unveil its mechanism of action. Our results indicate that açai aqueous extract (AAE) increases both oxidative and osmotic stress resistance independently of any effect on reproduction and development. AAE also suppressed bacterial growth, but this antimicrobial property did not influence stress resistance. AAE-increased stress resistance was correlated with reduced ROS production, the prevention of SH level reduction and *gcs-1* activation under oxidative stress conditions. AAE promotes oxidative stress resistance by acting through DAF-16 and the osmotic stress response pathway OSR-1/UNC-43/SEK-1. Our findings suggest that AAE modulates oxidative stress responses *in vivo* by both direct and indirect mechanisms.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

M199, Fungizone, penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased from Gibco by Life Technologies (Saint Aubin, France). Methanol, HPLC-grade acetonitrile, HPLC-grade water, formic acid, DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and cyanidin 3-O-rutinoside and kanamycin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cyanidin 3-O-glucoside was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Carboxy-H₂DCFDA was purchased from Invitrogen (Eugene, Oregon, USA). Lyophilized açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) was obtained from Liotécnica Alimentos LTDA (Embu, SP, Brazil).

Caenorhabditis elegans Strains and Maintenance

The following strains were used in this study: Bristol N2 (wild-type; WT); LD1171, Is003 (*gcs-1::GFP*); CL2166, dvl519[pAF15(*gst-4::GFP::NLS*)]; CF1553, muls84[pAD76(*sod-3::GFP*)]; VP198, kbIs5 [*gpdh-1p::GFP* + *rol-6(su1006)*]; TJ 356,

zIs356[pGP30(*DAF-16::GFP*)+pRF4(*rol-6*)]; BA17, *fem-1(hc17)*; EU1, *skn-1(zu67) IV/nT1*; CF1038, *daf-16(mu86)*; AU3, *nsy-1(ag3)*; KU4, *sek-1(km4)*; VC8, *jnk-1(gk7)*; AM1, *osr-1(m1)*; and MT2605, *unc-43(n498n1186)*. All *C. elegans* strains were maintained at 20°C on solid nematode growth medium (NGM) seeded with *E. coli* (OP50) as a food source according to Brenner [24]. The synchronization of worm cultures was achieved by hypochlorite treatment of gravid hermaphrodites.

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture

HUVECs isolated previously by Boulanger *et al.* [25] were collected from the veins of umbilical cords obtained from Jeanne de Flandres Maternity (Lille University Hospital, France). Cells were cultured in M199 (2.5 µg/mL Fungizone, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 150 mM HEPES) supplemented with 20% FBS. HUVECs were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Açai Aqueous Extract Preparation and Treatment

For all the experimental procedures, lyophilized açai fruit was diluted with S basal solution and filter sterilized to obtain an aqueous extract (AAE). Control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE was then mixed with an *E. coli* (OP50) pellet at OD 1 and seeded onto NGM plates. In experiments conducted with dead bacteria, NGM plates seeded with *E. coli* OP50, with or without 100 mg/mL AAE, were treated with 10 mM Kanamycin (KAN).

Anthocyanin Quantification

Total anthocyanin was quantified by the pH differential method as described by Giusti *et al.* [26]. Diluted samples were added to 0.025 M chloride buffer (pH 1.0) and 4.0 M sodium acetate buffer (pH 4.5). After incubation in the dark for 30 min at room temperature, absorbances were determined simultaneously as absorption maxima for the visible light spectrum and at 700 nm (SP-220, Biospectro, PR, Brazil). The total anthocyanin content was expressed in mg of cyanidin-3-glucoside equivalent per 100 g of açai powder. A molar absorptivity of 26,900 M⁻¹ cm⁻¹ and a molecular mass of 449.2 g/mol were used for cyanidin-3-glucoside.

The quantification of cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside was performed in duplicate using a modified method from Gordon *et al.* [27]. Briefly, 0.25 g of sample was diluted in 3 mL of methanol/water/acetic acid (50:49.5:0.5, v/v/v). After shaking for 5 min, the sample was sonicated for 20 sec and centrifuged at 8,000 rpm for 10 min at 10°C. The supernatant was collected, and the pellet was re-extracted twice. The three supernatants were pooled, transferred into a 10 mL volumetric flask and diluted with methanol/water/acetic acid mix. After filtration through a 0.45 µm filter, each sample was analyzed by LC-MS/MS. Mass spectrometry analyses were carried out on a Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery MAX triple-stage quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) with an electrospray ionization (ESI) probe coupled to an Accela HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The analytical separation was performed on a Symmetry Shield RP₁₈ column, 150×2.1 mm, 3.5 µm (Waters, Guyancourt, France), at 20°C. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B) and was eluted at a flow rate of 0.2 mL/min. The HPLC gradient started with 5% B for 20 min, reaching 30% B at 40 min and 95% B at 45 min. Mass spectra for the determination of anthocyanins were obtained by using positive ionization mode. Tandem MS analyses were performed in Selected Reaction

Monitoring (SRM) mode. The specific transitions m/z 449.0 \rightarrow m/z 287.1 and m/z 595.0 \rightarrow m/z 287.1 were used for the detection and quantification of cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside, respectively. As no stable isotopically labeled internal standard for anthocyanins is commercially available, the quantification was performed using the standard addition method and expressed as mg/100 g of dry matter.

DPPH Radical Scavenging Assay

The DPPH Radical Scavenging Activity of AAE was determined as described by Brand-Williams *et al.* [28]. In short, 100 μ L of açaí extract (1, 10 and 100 mg/mL) was added to 3.9 mL of 60 μ M DPPH dissolved in 80% methanol. The mixture was homogenized and kept in the dark for 30 min at room temperature, after which the absorbance at 515 nm was determined (SP-220, Biospectro, PR, Brazil). A calibration curve was prepared using 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) in the concentration range 200–800 μ M. The percentage of inhibition was determined according to the following equation: % Scavenging activity = $(1 - \text{Abs Sample } 515 / \text{Abs Control } 515) \times 100$. The DPPH radical scavenging assay was conducted twice.

Body Length and Brood Size Assays

To measure body length, first-larval-stage animals (L1) were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE until the third larval stage (L3) and then transferred to NGM plates with *E. coli* OP50 until the next day. Images were captured (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA) of one-day-old animals, and body length was measured along the animal axis using NIH Image J software.

To determine total progeny production, ten fourth-larval-stage (L4) worms, previously treated with control solution (S Basal) or 100 mg/mL AAE since L1, were placed onto the *E. coli* OP50 lawn on individual NGM plates in the presence or absence of 100 mg/mL AAE. During the egg-laying period, nematodes were transferred onto new plates every 24 h for five days until the end of the reproductive period. The F1 progeny from each individual worm was counted after approximately two days. The total progeny numbers for each plate were calculated and divided by the number of animals [29]. Both experiments were conducted three times.

Longevity

The longevity assay was performed with the adult sterile strain *fem-1(hc17)* as the wild-type strain to avoid progeny overgrowth in lifespan. Therefore, eggs were shifted to 25°C, the nonpermissive temperature for *fem-1(hc17)* fertility. Lifespan was scored every day after hermaphrodites completed the final larval molt, from the first day of adulthood (defined as $t=0$) until death. We analyzed approximately 90 hermaphrodites treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE and divided into three NGM plates of 30 animals each. Animals were scored as dead if they displayed no spontaneous movement or failed to respond when prodded. Dead worms that displayed internally hatched progeny, an extruded gonad or desiccation caused by crawling off the agar were excluded from the data [21]. The longevity assay was conducted three times.

Stress Resistance Assays

To evaluate oxidative stress resistance, N2 wild-type animals and *skn-1(zu67)*, *daf-16(mu86)*, *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)*, *jnk-1(gk7)*, *osr-1(m1)* and *unc-43(n498n1186)* mutants were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4 and then

with 7.5 mM *tert*-butyl hydrogen peroxide (t-BOOH) in M9. To perform the oxidative stress resistance assay in dead bacteria, NGM plates seeded with *E. coli* OP50, with or without 100 mg/mL AAE, were treated with 10 mM KAN. Survival was measured at 3, 6, 9 and 12 h. We analyzed five wells, each with approximately ten worms, for each experimental group. Worms were prodded with a platinum wire and scored as dead if they displayed no pharyngeal pumping or movement [30].

Thermotolerance assays were performed with hermaphrodites on adult day 5, after the majority of egg-laying had ceased. Animals treated at 20°C with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until adult day 5 were transferred onto 3-cm NGM agar plates supplemented as indicated above and then incubated at 35°C for 12 h. Survival was monitored at 6, 9 and 12 h and scored as the number of animals responsive to gentle touch as a fraction of the original number of animals on the plate. Animals that had died from desiccation on the sides of the plate were excluded [21]. To quantify the percent of motile worms under acute osmotic stress, animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 68 h from L1 and then transferred to new plates containing 500 mM NaCl. The percentage of worms that moved outside a 7-mm circle was monitored at 15, 30 and 60 min. All experiments measuring oxidative stress resistance were conducted at least twice. The heat stress and motility under acute osmotic stress assays were each performed three times.

Bacterial Growth Curve

E. coli OP50 growth was evaluated over 4 h in the presence of 100 mg/mL AAE. All OD readings at 600 nm were normalized to the OD of the control group at time zero. Bacterial growth was measured in three individual experiments.

In vivo Measurement of ROS

ROS production was measured in *C. elegans* and HUVECs using the fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA). ROS production in *C. elegans* was performed as described by Shi *et al.* [31]. Synchronized L1 animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h. L4 worms were incubated in 1 mL PBS containing 1 mM H₂O₂ for 2 h. Subsequently, the worms were washed twice and incubated in 0.5 mL PBS containing 50 μ M H₂DCFDA for 1 h. Thirty animals in experimental triplicates of each group were then transferred into the wells of a 96-well microtiter plate containing 200 μ L PBS. The fluorescence quantification was carried out on a multilabel microplate Reader VICTOR X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) using excitation at 485 nm and emission at 535 nm.

ROS production in HUVECs was performed as described by Montiel-Dávalos *et al.* [32]. HUVECs were grown in 12-well plates to a density of 1×10^5 cells per well. Confluent cells were then pretreated with or without 2.5 mg/mL AAE for 16 h, followed by incubation for 30 min with 10 μ M H₂DCFDA at 37°C in the dark. After this, the cells were washed with PBS and then treated with or without 0.25 mM H₂O₂ for 1 h. Cells were washed once and harvested in PBS. Fluorescence was detected with a flow cytometer using excitation at 488 nm and emission at 525 nm. In both *C. elegans* and HUVECs, the fluorescence of the control group was used to normalize the values from all other groups. The experiments were repeated at least four times.

Quantification of Total Sulfhydryl (SH) Levels

To measure the levels of total SH groups, approximately 5,000 animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4 and then incubated with or without 5 mM

Table 1. Determination of anthocyanins present in açai aqueous extract (AAE).

Compounds	Concentration (mg/100 g)
Total monomeric anthocyanins ^a	31.0±2.4
Cyanidin 3-O glucoside ^b	8.8±0.9
Cyanidin 3-O rutinoside ^b	8.7±0.6

The results are expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean).

^aTotal monomeric anthocyanins measured by the pH differential method.

^bCyanidin 3-O glucoside and Cyanidin 3-O rutinoside determined by LC-MS/MS analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0089933.t001

t-BOOH for 1 h. The animals were then washed with M9 buffer and sonicated in 2-mL microcentrifuge tubes. The resulting homogenate was centrifuged, and the supernatant was collected, discarding cellular debris and intact worms. The total protein content was determined according to the method described by Lowry *et al.* [33] using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The total and free serum sulfhydryl groups were estimated using Ellman's reagent according to Sedlak and Lindsay [34]. The protein-bound sulfhydryl groups were determined as the difference between the total and free sulfhydryl groups. The experiment was repeated twice.

Reporter Gene Expression

Transgenic worms containing reporter genes were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h starting at L1, followed by the presence or absence of oxidative stress. The stress condition was 7.5 mM t-BOOH for 1 h for *gcs-1::GFP* and *gst-4::GFP* gene expression analysis and 10 mM t-BOOH for 1 h for *sod-3::GFP*. To analyze the subcellular localization of *DAF-16::GFP*, synchronized L1 transgenic worms were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h with or without subsequent 7.5 mM t-BOOH treatment for 1 h. Twenty worms from each group were mounted onto microscope slides coated with 1% agarose, anaesthetized with 0.5 mM sodium azide and capped with coverslips. Photographs were taken on a fluorescence microscope (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA), and GFP fluorescence signals were measured using NIH Image J software. For *DAF-16::GFP*, expression patterns were classified as cytosolic, intermediate or nuclear. The experiment was conducted three times.

Analysis of gene expression by qPCR

Synchronized L1 larvae were grown in plates containing *E. coli* OP50 bacteria resuspended in basal solution or AAE 100 mg/mL until L4 stage. Total RNA from worms was isolated using BRAZOL (LCG Biotecnologia, São Paulo, Brazil) according to manufacturer's instructions and cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). The qPCR was performed on a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using a Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). qPCR levels were normalized to the expression of *ama-1*, which encodes the large subunit of RNA polymerase II. The fold change was normalized to that observed in untreated *C. elegans* samples. Primers sequences for *ama-1*, *daf-16*, *gst-7*, *ctl-1*, *sod-3* and *osr-1* are listed in Table S1. The gene expression was analyzed in three individual experiments.

Table 2. *In vitro* antioxidant activity of açai aqueous extract (AAE) measured by DPPH assay.

AAE (mg/mL)	% inhibition (Mean ± SEM)			
	AAE	AAE + OP50	AAE + OP50 + KAN	AAE + KAN
1	5.07±0.75 ^a	4.38±0.98 ^a	-0.71±0.28 ^b	0.10±0.16 ^b
10	53.30±5.61 ^a	49.53±4.07 ^a	18.55±2.18 ^b	25.68±2.22 ^b
100	79.61±3.33 ^a	77.30±3.49 ^a	73.46±4.54 ^a	78.35±1.78 ^a

DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; OP50, *E. coli* strain; KAN, Kanamycin. Different subscript letters indicate significant differences by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

doi:10.1371/journal.pone.0089933.t002

Polyglutamine (PolyQ) Aggregation Quantification

Transgenic worms carrying the reporter gene *vha-6::Q44::YFP* were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE since L1. Photographs of one-, four-, eight- and twelve-day-old animals were taken with a fluorescence microscope (Axio Imager Z2, Zeiss, NY, USA), and the numbers of aggregates were counted. The experiment was repeated three times.

Proteasome Activity Quantification

In vitro 26S proteasome activity assays were performed as described by Kisselev and Goldberg [35]. Approximately 5,000 N2 wild-type animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h at L1. L4 worms were then harvested and sonicated. The lysates were centrifuged at 20,000 ×g for 20 min at 4°C. Protein extract was quantified using the QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). For measuring the chymotrypsin-like activity of the proteasome, succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methyl-coumaryl-7-amide (SLLVY-MCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used both in the presence or absence of 20 μM MG-132, a proteasome inhibitor. Enzyme kinetics were monitored in a temperature-controlled microplate reader VICTOR X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) every 15 min for 1 h at 37°C; the excitation and emission wavelengths were 380 and 460 nm, respectively. Proteasome activity was calculated as the difference between the total activity and the activity remaining in the presence of 20 μM MG-132. The proteasome activity quantification was conducted three times.

Data Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (San Diego, CA). The results were plotted as the mean ± SEM (standard error of the mean) of at least two individual experiments. Data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov test for normality. For data with a normal distribution, Student's *t* test was used to compare pairs of groups, whereas a one-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to compare three or more groups. Nonparametric data were analyzed using the Mann-Whitney test when comparing two groups and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test for comparing three or more groups. All survival curves were analyzed by the Log-rank (Mantel-Cox) test. The statistical significance was determined as *p*<0.05.

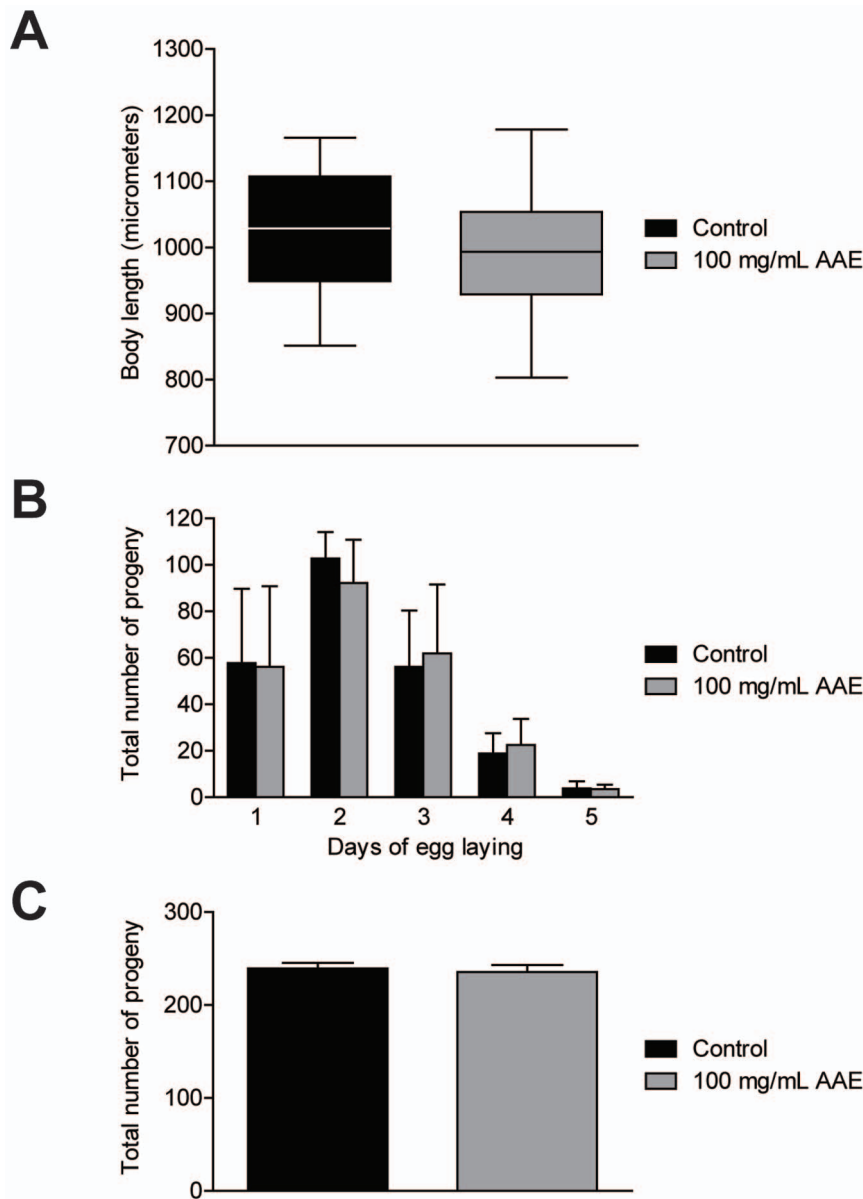


Figure 1. Effect of açai aqueous extract (AAE) on wild-type *C. elegans* body length and progeny. **A**, L1 animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE until L3 and then transferred onto NGM plates with OP50 until the next day. Images were captured of one-day-old animals, and body length was measured along the animal axis using NIH Image J software. There was no significant difference between groups, as determined by two-tailed Student's *t*-test. **B, C** Progeny profiles were measured in animals treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE. Animals were transferred individually to NGM plates and moved daily until the end of the reproductive period. The results were plotted as the mean \pm SEM for each day (B) and total final progeny (C). There was no significant difference between groups by a two-tailed Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g001

Results

AAE phytochemical composition and antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*

We first characterized the composition of anthocyanins and the *in vitro* antioxidant capacity of our extract. AAE presents 31.0 ± 2.4 mg/100 g of the total anthocyanins measured by the pH differential method. Cyanidin 3-O glucoside and cyanidin 3-O rutinoside are the two major anthocyanins in açai pulp; AAE presents 8.8 ± 0.9 mg/100 g of cyanidin 3-O glucoside and 8.7 ± 0.9 mg/100 g of cyanidin 3-O rutinoside, as determined by LC-MS/MS analysis (Table 1). Açai's polyphenolic compounds have already been associated with its *in vitro* antioxidant capacity

[3,36,37]. We next determined the antioxidant capacity of 1, 10 and 100 mg/mL AAE by the DPPH radical scavenging activity method. We observed that AAE displays increasing *in vitro* antioxidant capacity in a dose-dependent manner (Table 2). At 100 mg/mL AAE, the highest concentration tested, the DPPH inhibition was 79.61%, which is equivalent to 800 μ M Trolox, the reference standard, which shows 80.90% inhibition. Moreover, the percentage of DPPH inhibition for any concentration tested was not significantly altered when the extracts were mixed with *E. coli* OP50. Thus, we used AAE at 100 mg/mL with live *E. coli* OP50 for the subsequent experiments.

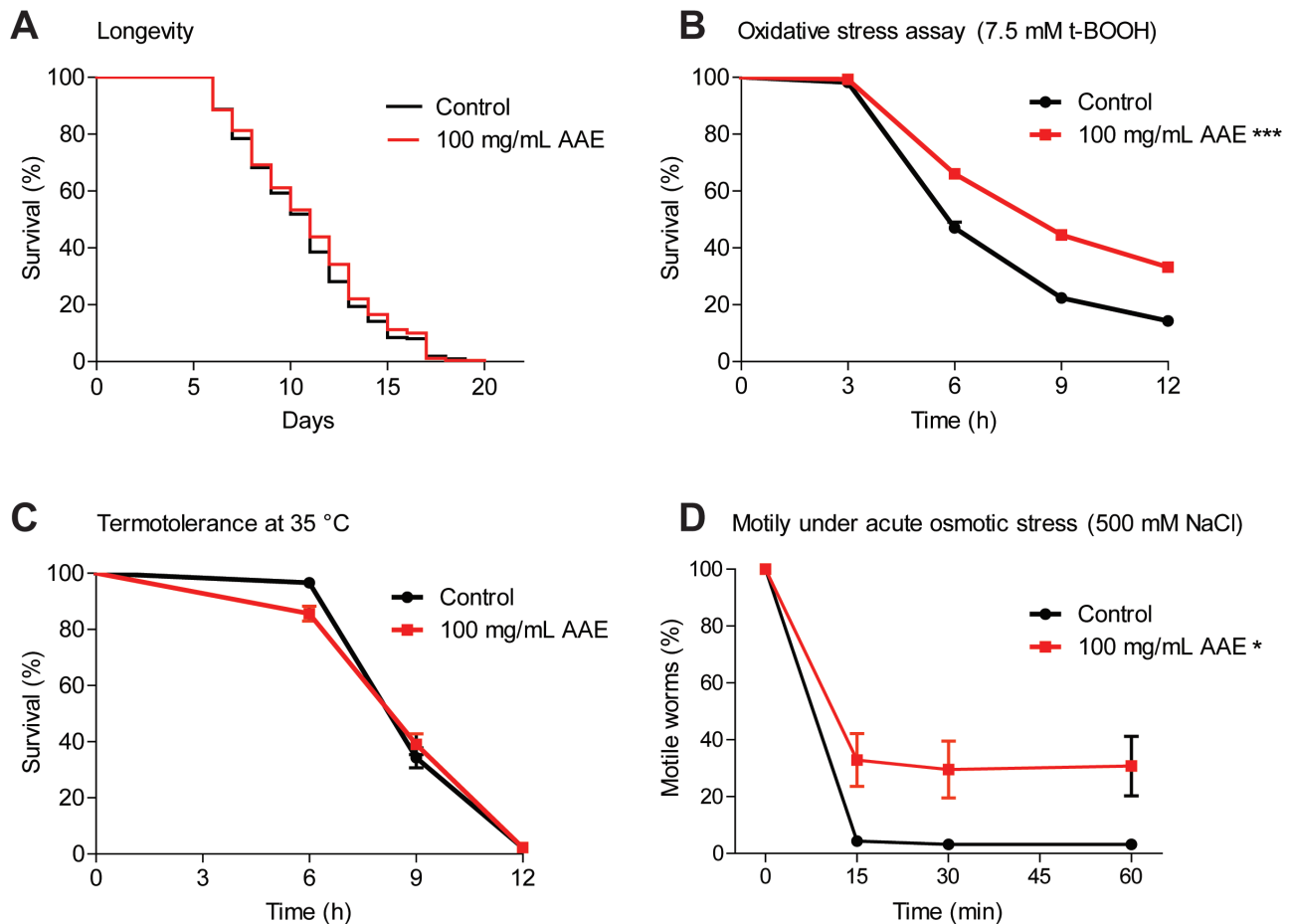


Figure 2. Effect of açai aqueous extract (AAE) on *C. elegans* grown under normal and stress conditions. **A** *fem-1(hc17)* mutants were treated at 25°C with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE beginning at L1. Surviving and dead animals were counted daily until all nematodes had died. Log-rank (Mantel-Cox) analysis showed no significant difference between the curves. **B** Animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4 and then submitted to 7.5 mM t-BOOH in M9. The survival was measured at 6, 9 and 12 h. The survival curves show that AAE treatment increased *C. elegans* oxidative stress resistance. *** $p < 0.001$ by the Log-rank (Mantel-Cox) test. **C** Animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE beginning at L1. After five days at 20°C, the animals were incubated at 35°C and survival was monitored at 6, 9 and 12 h. There was no significant difference between curves by the Log-rank (Mantel-Cox) test. **D** Animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 68 h beginning at L1 and then transferred to new plates containing 500 mM NaCl. The percentage of worms that moved outside a 7-mm circle was monitored at 15, 30 and 60 min. * $p < 0.05$ by a two-tailed Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g002

AAE does not alter *C. elegans* development and progeny

As toxic compounds usually delay *C. elegans* development and progeny [38], we characterized the effect of AAE treatment on these two biological parameters. Body length was determined in one-day-old adults treated with or without 100 mg/mL AAE from L1 until L3 and then transferred to NGM plates with *E. coli* OP50. We did not observe a significant difference in body length between control ($1020.0 \pm 11.6 \mu\text{m}$) and AAE-treated animals ($994.3 \pm 10.5 \mu\text{m}$) (Figure 1A). To measure the total number of progeny, animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until the end of their reproductive period. There was no significant difference in the total number of progeny between control (239.4 ± 6.1) and AAE-treated animals (235.6 ± 7.5) (Figure 1B). In addition, there was no difference in the egg-laying profile between the two groups (Figure 1C). These results suggest that 100 mg/mL AAE is not toxic to *C. elegans*, as it does not interfere with development and progeny (Figure 1A, 1B and 1C).

AAE increases resistance to oxidative and hyperosmotic stress conditions

As AAE shows *in vitro* antioxidant activity and is not toxic to *C. elegans*, we next evaluated whether AAE treatment has a protective effect under normal and oxidative, heat and hyperosmotic stress conditions. To monitor longevity under normal conditions, *fem-1(hc17)* mutants grown at 25°C were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE beginning at L1. AAE treatment had no effect on the *C. elegans* aging profile ($p = 0.2997$) (Figure 2A). Oxidative stress resistance assays were performed in wild-type animals treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4 and then with 7.5 mM t-BOOH in M9. AAE showed increased oxidative stress resistance when compared to the control ($p = 0.0002$) (Figure 2B). The effect of AAE on heat tolerance was analyzed at 35°C in five-day-old wild-type animals with or without 100 mg/mL AAE treatment from L1. AAE did not protect *C. elegans* against heat stress when compared to the control group ($p = 0.7388$) (Figure 2C). Finally, we analyzed motility under acute osmotic stress at 500 mM NaCl. For the

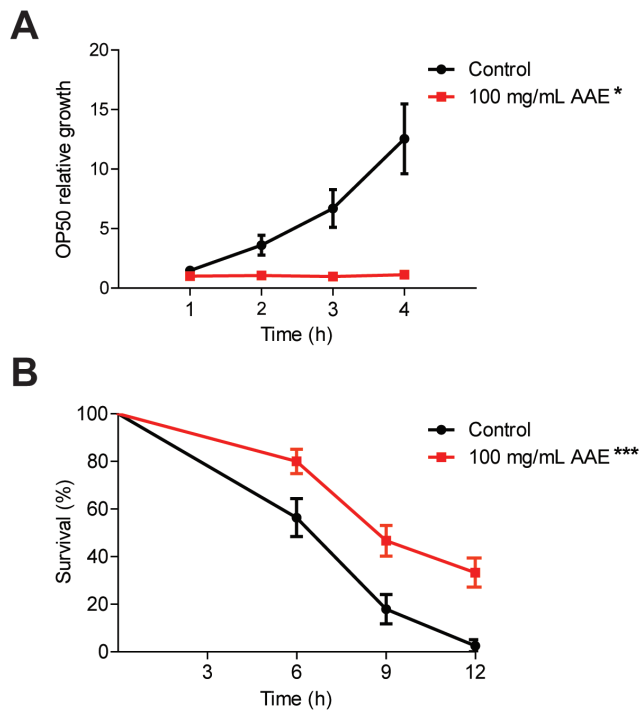


Figure 3. Effect of açai aqueous extract (AAE) on the bacterial growth and oxidative stress resistance of wild-type *C. elegans* grown on dead bacteria. **A)** *E. coli* OP50 growth was evaluated over 4 h in the presence of 100 mg/mL AAE. The OD of the control group at time zero was used to normalize all other OD readings. * Treatment of 100 mg/mL AAE decreased bacteria growth at all times analyzed with $p < 0.05$, determined by a two-tailed Student's *t*-test. **B)** Animals were treated with or without 100 mg/mL AAE, mixed with either *E. coli* OP50 or *E. coli* OP50 treated with 10 mM Kanamycin (KAN), from L1 until L4 and then submitted to 7.5 mM t-BOOH in M9. The survival was measured at 6, 9 and 12 h. The survival curves show that AAE treatment increased *C. elegans* oxidative stress resistance independent of its antibacterial effect. *** $p < 0.001$ related to the respective control by the Log-rank (Mantel-Cox) test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g003

motility assay, L1 wild-type animals were treated with 100 mg/mL AAE for 68 h and then transferred to NGM plates with 500 mM NaCl. AAE treatment significantly increased motility under the osmotic stress condition (Figure 1D). After 1 h, 48.31% of the animals treated with 100 mg/mL AAE showed motility compared to 27.70% from the control group ($p < 0.05$). We conclude that 100 mg/mL AAE protects against oxidative and hyperosmotic stress conditions but not under normal and heat stress conditions.

The protective effect of AAE against oxidative stress is independent of its antimicrobial effect

As bacteria play a role in *C. elegans* mortality and stress resistance [39,40], we investigated whether the increased oxidative stress promoted by AAE could be a secondary response to a possible AAE antimicrobial property. First, we evaluated *E. coli* OP50 growth, measuring the OD over 4 h in the presence or absence of 100 mg/mL AAE. AAE treatment decreased bacteria growth at all times analyzed (Figure 3A). Because we observed that 100 mg/mL AAE exerted an antimicrobial effect, we repeated the oxidative stress resistance assay in animals treated with AAE on dead bacteria. We observed that wild-type animals treated with 100 mg/mL AAE presented increased survival on 7.5 mM t-

BOOH compared to controls ($p < 0.0001$) (Figure 3B). These results show that AAE treatment does not increase *C. elegans* oxidative stress resistance through an antimicrobial property.

AAE improves redox status in *C. elegans* and HUVECs under oxidative stress conditions

Potential antioxidants can act directly to neutralize reactive oxygen species (ROS) and thus prevent the cellular response to increased oxidative stress to combat and remove ROS. To evaluate the capacity of AAE to neutralize ROS *in vivo*, we assessed ROS production in two experimental models, *C. elegans* and HUVECs, using the H₂DCFDA fluorescent probe. We did not detect an effect of AAE treatment on basal ROS levels in either *C. elegans* or HUVECs (data not shown). We observed a significant increase in fluorescence intensity in worms (Figure 4A) and cells (Figure 4B) treated with their respective stress conditions. However, AAE treatment significantly reduced intracellular ROS accumulation in *C. elegans* under stress conditions ($p < 0.01$) (Figure 4A). In HUVECs, the stress condition increased ROS production by 16-fold relative to the control, and AAE diminished this increase by up to 6-fold ($p < 0.001$) (Figure 4B).

As AAE exhibited an *in vivo* antioxidant capacity, we next evaluated whether AAE would improve redox status in wild-type *C. elegans*. We assessed the levels of total sulfhydryl (SH) groups in animals treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4. The treatment of *C. elegans* with 100 mg/mL of AAE for 48 h did not increase the levels of total protein sulfhydryl groups (515.97 ± 32.73 vs. 512.2 ± 52.75 $\mu\text{mol/mg}$ of protein). The stress condition significantly decreased the levels of SH groups (515.97 ± 32.73 vs. 279.73 ± 5.51 $\mu\text{mol/mg}$ of protein) ($p < 0.05$). However, when the worms were first exposed to AAE and then submitted to the stress condition with t-BOOH, this pretreatment was able to prevent the reduction of protein sulfhydryl group levels induced by t-BOOH (601.18 ± 38.25 vs. 279.73 ± 5.51 $\mu\text{mol/mg}$ of protein) ($p < 0.05$) (Figure 4C).

To correlate the *in vivo* antioxidant effect of AAE treatment with a molecular response in *C. elegans*, we analyzed the gene expression of γ -glutamyl cysteine synthetase-1 (*gcs-1*) and glutathione-S-transferase-4 (*gst-4*). GCS-1 is the limiting enzyme of glutathione (GSH) synthesis and is expressed at high levels in the intestine in response to oxidative stress but at low levels under normal conditions in an SKN-1-dependent manner [41]. *gst-4::GFP* is expressed primarily in the muscles and the hypodermis under normal conditions, and is increased in response to a variety of oxidative stress treatments [42,43]. Transgenic worms containing reporter genes were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h beginning at L1 and either in the presence or absence of oxidative stress. The fluorescence signals of *gcs-1::GFP* and *gst-4::GFP* animals treated with 100 mg/mL of AAE for 48 h were not significantly increased compared to the control group (Figure 4D–E). Exposure to 7.5 mM t-BOOH for 1 h increased *gcs-1::GFP* and *gst-4::GFP* expression, and AAE significantly prevented the upregulation of *gcs-1::GFP* (Figure 4D) but not *gst-4::GFP* (Figure 4E). Taken together, these results suggest that AAE functions as a direct antioxidant through the removal of ROS, preventing the decrease in SH groups mediated by the stress condition.

Increased oxidative stress resistance induced by AAE treatment depends on DAF-16 and OSR-1/UNC-43/SEK-1

Certain flavonoids protect against oxidative stress either directly, by radical scavenging, or indirectly, by inducing antioxidant enzymes and thus increasing the stress resistance of

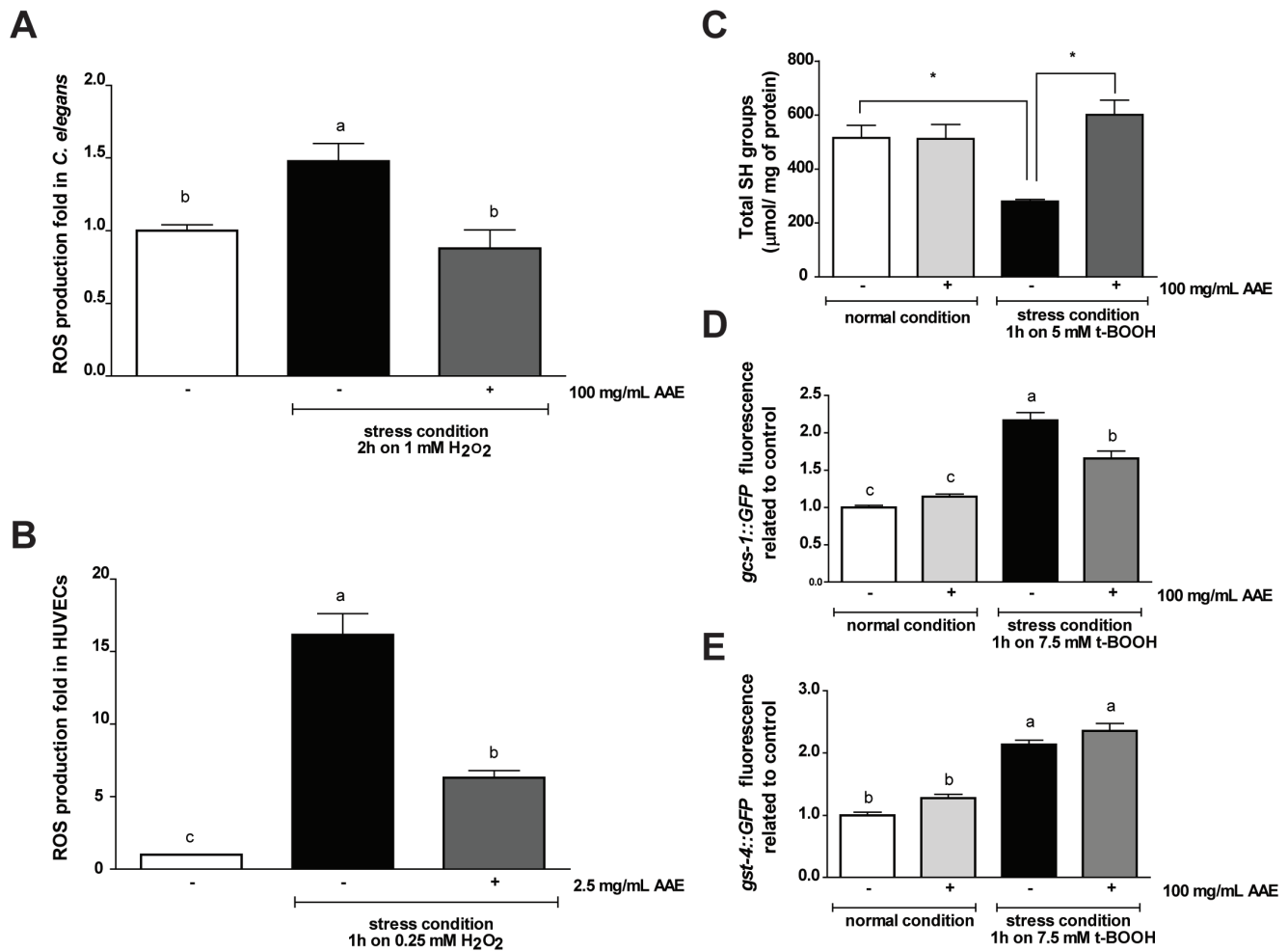


Figure 4. Effect of açaí aqueous extract (AAE) on redox status in wild-type *C. elegans* and HUVECs. **A)** *C. elegans* was treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h and then submitted to the presence or absence of 1 mM H₂O₂ for 2 h. The results are expressed as H₂DCFDA fluorescence relative to the untreated control. **B)** HUVECs were treated with or without 2.5 mg/mL AAE for 16 h and then incubated in 0.25 mM H₂O₂ for 1 h. The fluorescence was measured by flow cytometry. The results are expressed as H₂DCFDA fluorescence relative to the untreated control. Different letters indicate significant differences by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. **C)** To measure the levels of total SH groups, animals were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE from L1 until L4 and then incubated with or without 5 mM t-BOOH for 1 h. *p values were determined by a two-tailed Student's t-test, and groups were significantly different when p<0.05 in *C. elegans*. Transgenic worms containing reporter genes were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h beginning at L1 and then with or without the oxidative stress condition. After a 1-h hour recovery period, photographs were taken on a fluorescence microscope. For **(D)** *gcs-1::GFP* and **(E)** *gst-4::GFP* animals, GFP fluorescence signals were measured using NIH Image J software. Different letters correspond to significant differences by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g004

the organism. It has been shown in *C. elegans* that phytochemicals and plant extracts activate several stress response pathways [21,23,44]. To verify whether, in addition to its direct role, AAE protection under oxidative stress could also require these pathways, we performed the oxidative stress resistance assay in wild-type and mutant animals treated with 100 mg/mL AAE or control solution (S basal).

DAF-16/FOXO, the downstream target of insulin-like signaling in *C. elegans*, is a transcription factor required for both lifespan regulation and stress resistance [45,46]. The nuclear translocation of DAF-16 is positively regulated by c-Jun N-terminal kinase (JNK-1) in parallel with insulin-like signaling [46]. We therefore investigated whether oxidative stress resistance induced by AAE treatment depends on JNK-1/DAF-16 signaling. AAE treatment did not increase *daf-16(mu86)* mean survival (p = 0.1782), whereas it increased the mean survival of *jnk-1(gk7)* (p<0.0001) (Figure 5A;

Table 3). These results suggest that AAE may increase oxidative stress resistance via DAF-16 independently of JNK-1.

SKN-1/Nrf is a transcription factor that promotes the expression of antioxidant or detoxification enzymes, thus increasing stress resistance and longevity in *C. elegans* [19,30]. Under oxidative stress, SKN-1 functions depend on p38 MAPK signaling through the NSY-1/SEK-1/PMK-1 pathway [47]. We measured the survival of *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)* and *skn-1(zu67)* mutants treated with AAE. AAE treatment prolonged the mean survival of *nsy-1(ag3)* (p = 0.0005) and *skn-1(zu6)* (p = 0.0002) but not *sek-1(km4)* (p = 0.7483) (Figure 5B; Table 3). These results suggest that the AAE antioxidant effect does not depend on SKN-1, and may act via the p38 pathway, but only through SEK-1.

In *C. elegans*, survival under hyperosmotic stress requires the OSR-1/UNC-43/SEK-1 stress response pathway [48]. We also tested whether the protective effect of AAE treatment under

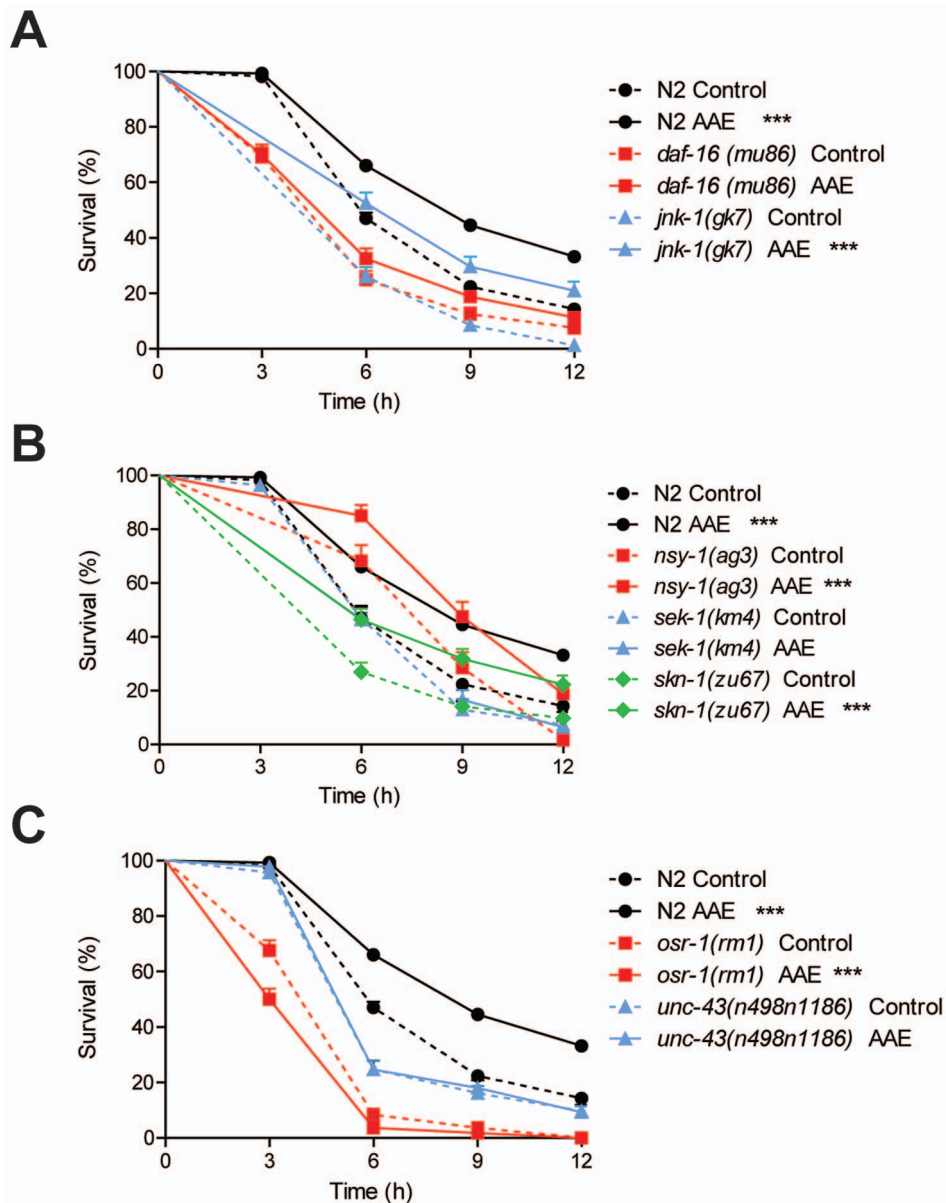


Figure 5. Contribution of genetic background to oxidative stress resistance induced by açai aqueous extract (AAE) treatment. Animals were treated with 100 mg/mL AAE or control solution (S basal) from L1 until L4 and then submitted to 7.5 mM t-BOOH in M9. Survival was measured at 3, 6, 9 and 12 h. **A**) Survival curves for transcription factor *daf-16(mu86)* and JNK MAPK pathway *jnk-1(gk7)* mutants. **B**) Survival curves for *skn-1(zu67)* and p38 MAPK pathway, *nsy-1(ag3)*, *sek-1(km4)* mutants. **C**) Survival curves for osmotic stress resistance pathway, *unc-43(n498n1186)* and *osr-1(rm1)* mutants. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ by the Log-rank (Mantel-Cox) test (see Table 3 for more details). doi:10.1371/journal.pone.0089933.g005

oxidative stress conditions depends on OSR-1 and UNC-43. AAE treatment did not extend the mean survival of *unc-43(n498n1186)* ($p = 0.7320$) (Figure 5C, Table 3). In *osr-1(rm1)* mutants, AAE treatment reduced the mean survival under oxidative stress ($p = 0.0009$) (Figure 5C, Table 3). These findings suggest that AAE modulates oxidative stress resistance through OSR-1 and two of its downstream effectors: UNC-43 and SEK-1.

AAE treatment induces *ctl-1* and *gst-7* expression in a DAF-16-dependent manner

As AAE treatment increased oxidative stress resistance in *C. elegans* through DAF-16, we investigated whether AAE treatment

activates DAF-16 nuclear translocation under normal and stress conditions. The results showed that under normal growth conditions, AAE treatment did not induce DAF-16::GFP nuclear translocation (Figure 6A–B). Moreover, the AAE treatment did not alter *daf-16* mRNA levels in wild-type animals (Figure 6C). The stress condition used in this study (7.5 mM t-BOOH for 1 h) also did not increase the fraction of animals showing DAF-16::GFP nuclear localization (Figure 6B). However, under stress conditions, AAE treatment significantly reduced DAF-16::GFP nuclear localization (Figure 6B). One possible explanation for this finding is that AAE modifies DAF-16 to increase its activity but not its concentration. To further test this hypothesis, we measured the

Table 3. Effect of açai aqueous extract (AAE) on the oxidative stress resistance of wild-type and mutant *C. elegans*.

	Median survival (h)		P vs. Control (log-rank) ^b	n ^a	
	Control	Treated		Control	Treated
N2	7.4	8.0	<0.0001	665 (12)	669 (12)
<i>osr-1(rm-1)</i>	5.4	4.7	0.0009	167 (3)	166 (3)
<i>unc-43(n498n1186)</i>	6.6	6.7	0.7320	186 (3)	183 (3)
<i>daf-16(mu86)</i>	5.7	6.0	0.1782	185 (3)	160 (3)
<i>jnk-1(gk7)</i>	7.0	7.5	<0.0001	165 (3)	162 (3)
<i>nsy-1(ag3)</i>	8.9	9.5	0.0005	63 (2)	80 (2)
<i>sek-1(km4)</i>	7.3	7.6	0.7483	109 (2)	108 (2)
<i>skn-1(zu67)</i>	6.7	7.3	0.0002	163 (3)	157 (3)

^aTotal number of hermaphrodites analyzed. The number in parentheses indicates the number of independent trials.

^bComparisons were performed using the Log-rank (Mantel-Cox) test.

doi:10.1371/journal.pone.0089933.t003

expression of the DAF-16 stress target genes after AAE treatment in wild-type animals and *daf-16* mutants (Figure 6D). The results showed that the transcripts levels of *ctl-1* and *gst-7* were upregulated in wild-type animals treated with AAE in a manner that was dependent upon *daf-16* (Figure 6D). However, AAE treatment did not induce neither *sod-3* mRNA (Figure 6D) nor *sod-3::GFP* expression (Figure S1). Taken together, these results suggest that AAE treatment increases oxidative stress resistance by activating antioxidant genes via DAF-16.

AAE increases polyglutamine protein aggregation and decreases proteasome activity

OSR-1 is a secreted protein that couples with SEK-1/MAPKK through UNC-43/CaMKII to promote resistance to osmotic stress [48]. A loss of OSR-1 function constitutively activates *gpdh-1* expression and glycerol accumulation [49]. Glycerol replaces inorganic ions in the cytoplasm and functions as a chemical chaperone that aids in the refolding of misfolded proteins [50].

It is possible that AAE increases both oxidative and osmotic stress resistance by directly blocking OSR-1 activity and inducing *gpdh-1* expression. To test this hypothesis, we measured *osr-1* mRNA levels and *gpdh-1::GFP* expression in animals treated or not with 100 mg/mL AAE for 48 h. The AAE treatment did not modify *osr-1* gene expression under normal conditions (Figure 7A) and reduced *gpdh-1::GFP* expression (Figure 7B). Nevertheless, AAE treatment could interfere in OSR-1 activity which is coupled with the pathway UNC-43/SEK-1 in order to promote oxidative stress resistance.

Alternatively, AAE may function as a mild stressor, increasing hypertonic stress and/or protein homeostasis. High ionic strength is a well-known disruptor of protein secondary structure that can increase protein aggregation [51]. To test the hypothesis that AAE could increase hypertonic strength, we quantified aging-induced polyglutamine protein aggregation in *pha-6::Q44::YFP* transgenic worms. Q44 animals exhibit a diffuse fluorescence throughout the intestine until they reach adulthood, when focal fluorescent aggregates gradually increase. At one-day-old, Q44::YFP aggregation was not different between the control and 100 mg/mL AAE-treated groups (Figure 7C), whereas four-day-old Q44::YFP adult animals treated with 100 mg/mL AAE had approximately twice as many aggregates as control animals ($p < 0.05$) (Figure 7C). Although the average number of aggregates increased with age, the AAE treatment had no effect on Q44::YFP aggregation in adult worms at eight- and twelve-day-old (Figure 7C). This result

suggests that AAE treatment accelerates the aggregation formation at the young adult stage. To evaluate whether AAE treatment impairs protein homeostasis, we measured proteasome activity in animals treated with control solution (S basal) from L1 until L4. Proteasome chymotrypsin-like activity was monitored by SLLVY-MCA digestion in L4 worm extracts containing equal amounts of total protein. AAE decreased proteasome degradation activity by 2.5-fold relative to the controls ($p < 0.05$) (Figure 7D). These results suggest that AAE may increase oxidative and osmotic stress resistance via increased ionic strength and/or impairment of protein homeostasis.

Discussion

Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has been highly praised in recent few years for having a wide range of health-promoting and therapeutic benefits due to its nutritional value and high levels of polyphenolic compounds, especially anthocyanin and proanthocyanidin. Although a great number of studies have reported that açai treatment *in vitro* provides antiproliferative, anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective effects [4], *in vivo* studies are still lacking. Here, we employed an *in vivo* approach to investigate the antioxidant properties of açai and its underlying mode of action by using the model organism *C. elegans*. Our results reveal that açai protects against oxidative stress through both direct and indirect mechanisms. AAE increases resistance to oxidative and osmotic stress independently of any effect on reproduction, development and bacterial growth. AAE treatment directly reduces ROS production and prevents SH level reduction and *gcs-1* activation under oxidative stress conditions. Oxidative stress resistance is also indirectly mediated by AAE through DAF-16 and the OSR-1/UNC-43/SEK-1 osmotic stress pathway.

Many dietary polyphenols have antioxidant activity, and this activity is generally attributed to their ability to directly neutralize reactive oxygen and nitrogen species. The findings presented here support a direct mechanism of action for AAE through the reduction of ROS production induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in *C. elegans* and HUVECs. Many authors have already demonstrated that dietary supplementation with polyphenols and phytochemicals significantly decreases ROS production under stress conditions in *C. elegans*. For example, the flavonoids epicatechin, quercetin, rutin and *Ginkgo biloba* extract EGb761 reduce the ROS accumulation induced by thermal stress [52–54]. Similarly, treatment with myricetin, a flavonoid commonly used as

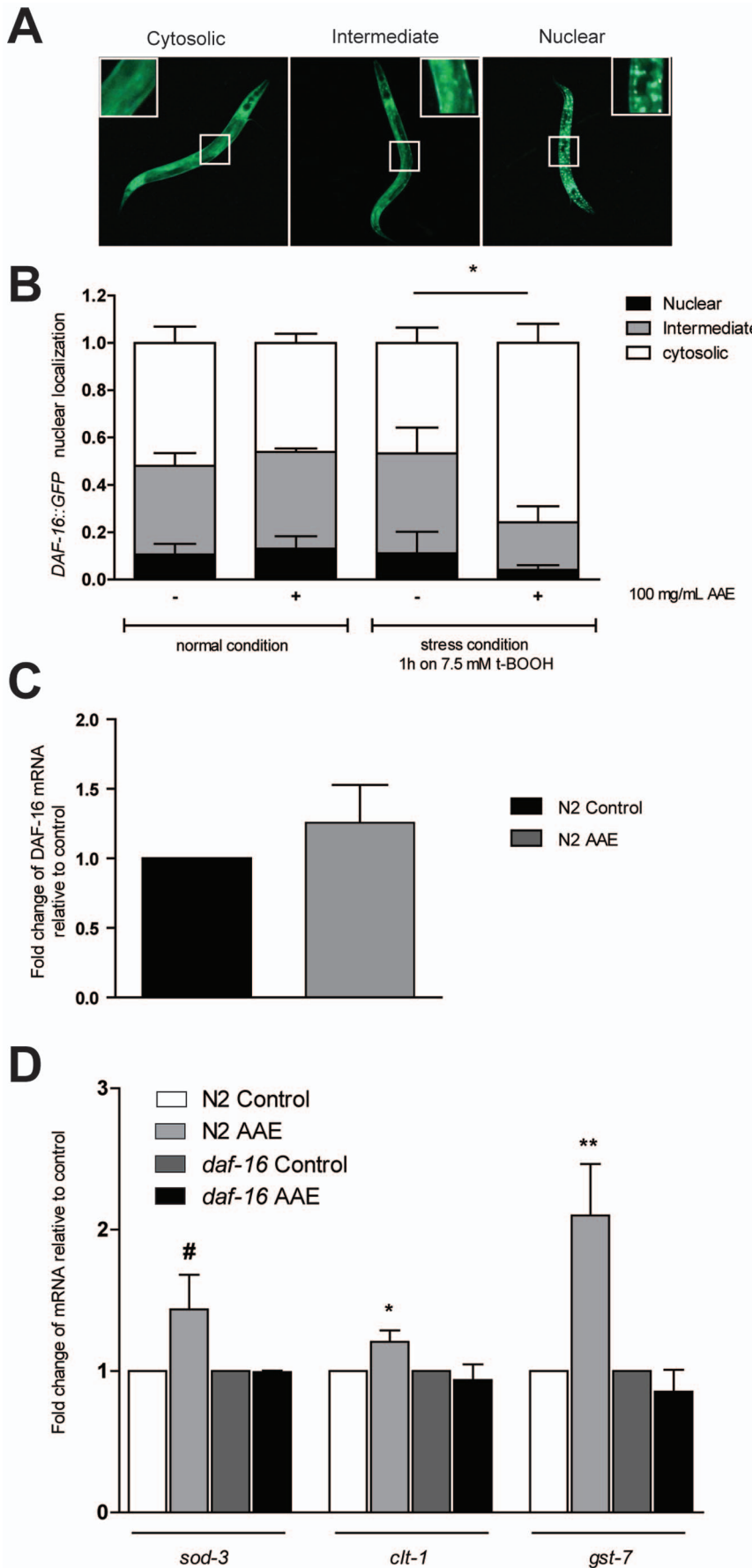


Figure 6. Effect of açai aqueous extract (AAE) on *DAF-16::GFP* nuclear localization and the expression of its stress-inducible targets. Transgenic worms containing reporter genes were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h from L1 and then with or without the oxidative stress condition. **A, B)** *DAF-16::GFP* worms were classified as cytosolic, intermediate or nuclear according to their subcellular distribution of DAF-16. **C)** mRNA level of *daf-16* in wild-type animals treated or not with 100 mg/mL AAE for 48 h. **D)** mRNA levels of DAF-16 stress-inducible genes *sod-3*, *ctl-1* and *gst-7* in wild-type and *daf-16* animals treated or not with 100 mg/mL AAE. #*p* = 0.07, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 by a two-tailed Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g006

a natural chemopreventive, also reduces ROS accumulation in wild-type animals exposed to H₂O₂ [55]. Conversely, Guha *et al.* [23] demonstrated that cranberry extract (CBE) supplementation was not effective in reducing ROS levels in worms exposed to paraquat or in protecting worms exposed to oxidative stress.

Many antioxidants can also increase oxidative stress resistance by inducing the transcription of cytoprotective proteins. Flavonoids and phytochemicals have been shown to increase the

expression of protective genes in *C. elegans* such as *gst-4* [42], *gcs-1* [56] and *sod-3* [31]. In our work, AAE treatment did not alter the expression of *gst-4*, *gcs-1* or *sod-3* under normal conditions, but it prevented *gcs-1* activation under oxidative stress conditions. Moreover, AAE treatment prevented SH level reduction under oxidative stress conditions. Similarly, GSH levels in epicatechin-treated worms under thermal stress were restored to normal levels [52]. These findings support a direct mode of action for AAE.

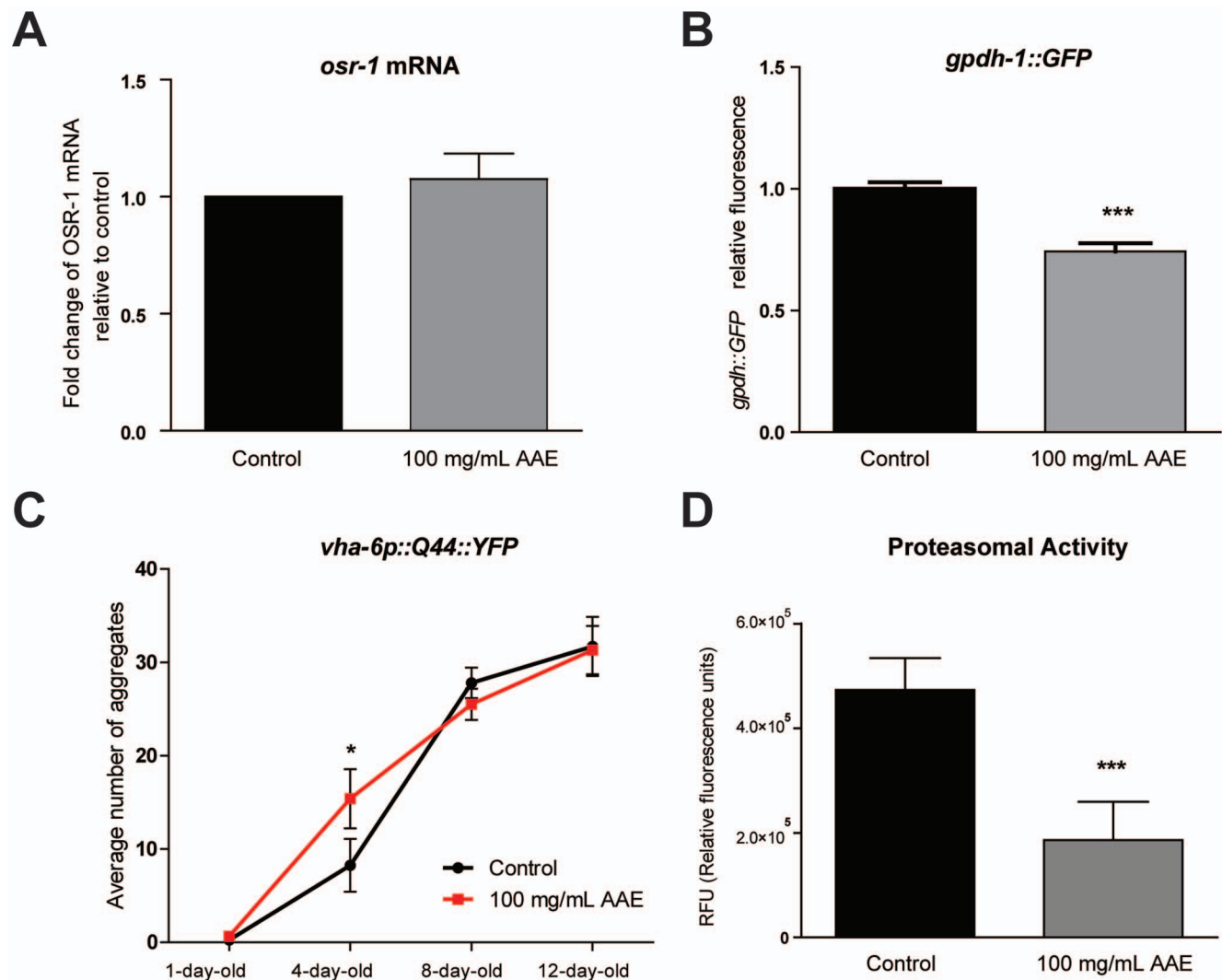


Figure 7. Effect of açai aqueous extract (AAE) on protein homeostasis. **A)** mRNA level of *osr-1* in wild-type animals treated or not with 100 mg/mL AAE for 48 h. **B)** Transgenic worms carrying the reporter gene *gpdh-1::GFP* were treated or not with 100 mg/mL AAE for 48 h and then photographs were taken on a fluorescent microscope. GFP fluorescence signals were measured using NIH Image J software. ****p* < 0.001 by a two-tailed Student's *t*-test. **C)** Transgenic worms carrying the reporter gene *vha-6::Q44::YFP* were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE starting at L1. Photographs of one-, four-, eight- and twelve-day-old animals were taken on a fluorescence microscope, and the numbers of aggregates were counted. **p* < 0.05 by a one-tailed Student's *t*-test. **D)** Animals were treated with 100 mg/mL AAE or control solution (S basal) from L1 until L4. Proteasome chymotrypsin-like activity was monitored by SLLVY-MCA digestion in L4 worm extracts containing equal amounts of total protein. ****p* < 0.001 by a two-tailed Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g007

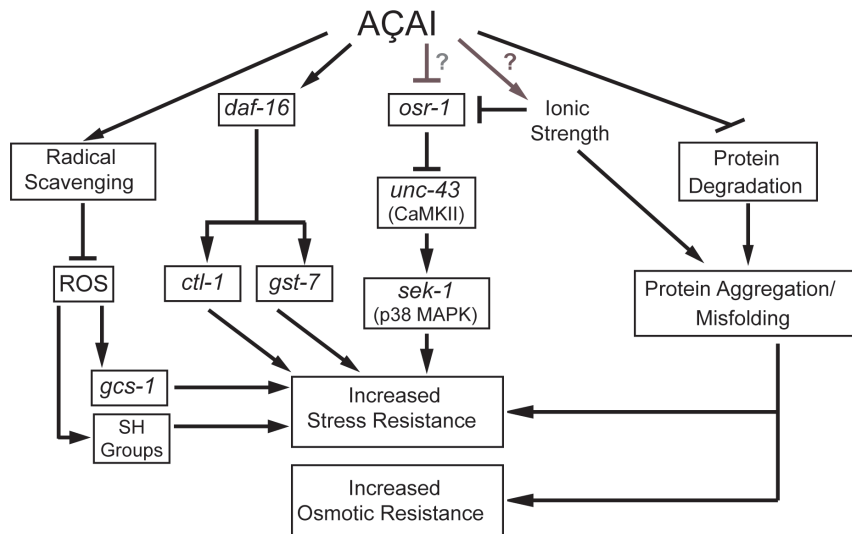


Figure 8. Hypothetical model of the mode of action of açai aqueous extract (AAE) on *C. elegans*. Text marked within a rectangle represents modulators or data observed experimentally in this manuscript. AAE modulates oxidative stress resistance by direct and indirect mechanisms. AAE removes ROS directly and prevents *gcs-1* activation and SH level reduction which in turn increases oxidative stress resistance. AAE also promotes oxidative stress resistance indirectly through DAF-16/OSR-1/UNC-43/SEK-1. In addition, AAE increases osmotic stress resistance, possibly as a result of impaired protein homeostasis and/or increased ionic strength. doi:10.1371/journal.pone.0089933.g008

These results can be partially explained by the high levels of polyphenols present in açai. In this scenario, the radical-scavenging properties of AAE's polyphenols, demonstrated both *in vitro* and *in vivo*, directly neutralize ROS produced under stress condition. The depletion of sulfhydryl groups, the most abundant and important nonenzymatic defense molecules, especially GSH, reflects intracellular oxidation. Thus, a reduction of the cellular stress environment promoted by AAE is able to avert the oxidation of sulfhydryl groups and the activation of *gcs-1*, the limiting enzyme of glutathione (GSH) synthesis (Figure 8).

We have demonstrated that AAE treatment also increases acute osmotic stress resistance in *C. elegans*. This activity can be explained not only by the radical-scavenging properties of AAE but also by an indirect activity through the activation of protective signaling pathways. Our genetic analysis indicates that stress resistance mediated by AAE is dependent on the DAF-16 and OSR-1/UNC-43/SEK-1 osmotic stress pathways.

The DAF-16/FOXO transcription factor is regulated by the insulin signaling pathway and is considered a key regulator of many important biological processes, including lifespan, metabolism and stress responses [57]. The nuclear translocation of DAF-16 and *sod-3* expression were reported for different extracts and polyphenols such as cranberry extract [23] and *Monascus*-fermented dioscorea [31], quercetin [58], myricetin and kaempferol [59]. Our results showed that AAE treatment does not increase oxidative stress resistance in *daf-16(mu86)* mutant animals, suggesting that AAE treatment protects against oxidative stress in a DAF-16-dependent manner. Nevertheless, AAE treatment does not increase DAF-16 nuclear localization or *sod-3* expression under normal conditions. One possible explanation for the requirement of DAF-16 on AAE-induced oxidative stress resistance without nuclear localization is that AAE might modify DAF-16 to increase its activity but not its concentration. Furthermore, DAF-16 activation by AAE in the nucleus might upregulate specific subsets of genes other than *sod-3*. In fact, AAE treatment increased the gene expression of *ctl-1* and *gst-7* in a DAF-16-dependent manner.

OSR-1 is a master regulator of *C. elegans* survival in hyperosmotic environments [48]; OSR-1 couples with SEK-1/MAPKK through UNC-43/CaMKII to promote resistance to chronic osmotic stress. The requirement of UNC-43 has been reported for the extended lifespan induced by blueberry [21], cranberry [23] and quercetin [44]. However, the longevity effect induced by these phytochemicals depends differently on OSR-1 and SEK-1. For example, SEK-1, but not OSR-1, is required for quercetin-induced longevity [44], whereas OSR-1, but not SEK-1, is required for cranberry-induced longevity [23]. Our genetic study indicates that OSR-1 is required for AAE-induced oxidative stress resistance as well as UNC-43 and SEK-1. Wilson *et al.* [21] found that blueberry polyphenol-induced longevity is dependent on the OSR-1/UNC-43/SEK-1 pathway. These results suggest that the OSR-1/UNC-43/SEK-1 pathway is a key target for anthocyanins, the predominant polyphenols present in açai and blueberry.

Notably, longevity and thermotolerance are common features observed in *C. elegans* exposed to phytochemical interventions [21,23,44,54]. The ability of these phytochemicals to increase resistance to heat stress may be due to their similar polyphenol content. Despite this similarity, neither of these effects were observed in the animals treated with AAE. Although blueberry and açai extracts have similar polyphenol content, other bioactive metabolites are found in açai extract. These compounds include peonidin 3-rutinoside and peonidin 3-glucoside, cyanidin 3-arabinosylarabinoside, cyanidin 3-arabinoside and cyanidin 3-acetyl hexose [2,60]. As a number of experiments have shown that different phytochemicals may interact and synergize to exert their biological functions, it is not unexpected that AAE treatment does not increase thermotolerance in *C. elegans*.

Guha *et al.* [23] observed that CBE treatment decreases osmotic stress resistance in *C. elegans*. The authors explained this susceptibility through a depression of CaMKII/p38 MAPK signaling by CBE, based on the observation that *osr-1* mRNA is upregulated by CBE treatment. *osr-1* upregulation by flavonoids was also demonstrated by Xue *et al.* [61]. In our study, we

demonstrated that AAE treatment increases acute osmotic stress resistance in *C. elegans*. However, the AAE treatment did not modify *osr-1* gene expression under normal conditions and reduced *gpdh-1::GFP* expression. These results did not support our hypothesis that the mechanism of AAE-increased osmotic stress resistance requires neither *osr-1* downregulation nor glycerol synthesis.

As stress resistance mediated by AAE treatment was dependent on OSR-1, we hypothesize that açaí might act directly by blocking OSR-1 protein activity or may function as a mild stressor (Figure 8). OSR-1 inhibition by AAE in turn activates UNC-43 and SEK-1 and consequently promotes oxidative stress resistance. If AAE treatment generates a hypertonic environment, we could expect increased protein aggregation and proteasomal activity. In agreement with our hypothesis, we observed that AAE treatment increased the number of Q44::YFP protein aggregates. However, proteasomal activity was significantly reduced, which might also contribute to the increased polyglutamine aggregation.

Our study highlights the *in vivo* antioxidant and stress resistance properties of AAE, supporting previous *in vitro* experiments on cultured cells and short-term rodent studies. This work also helps to reveal the underlying molecular mechanisms by which AAE modulates stress responses. We propose that AAE modulates oxidative stress resistance by direct and indirect mechanisms. AAE removes ROS directly and prevents *gcs-1* activation and SH level reduction, which in turn protects against oxidative stress. AAE also promotes oxidative stress resistance indirectly through DAF-16 and OSR-1/UNC-43/SEK-1. In addition, AAE increases osmotic stress resistance, possibly as a result of increased ionic strength and/or protein homeostasis impairment (Figure 8). Regardless of the specific mechanism involved, our findings indicate that the natural compounds available in AAE can improve the antioxidant status of a whole organism under certain conditions.

References

- Muñiz-Miret NVR, Hiraoka M, Montagnini F, Mendelsohn RO (1996) The economic value of managing the açaí palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary, Pará, Brazil. *Forest Ecology and Management* 87: 163–173.
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, et al. (2006) Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acaí). *J Agric Food Chem* 54: 8598–8603.
- Kang J, Xie C, Li Z, Nagarajan S, Schauss AG, et al. (2011) Flavonoids from açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry* 128: 152–157.
- Heinrich M, Dhanji T, Casselman I (2011) Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) — A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters* 4: 10–21.
- Girones-Vilaplana A, Valentao P, Moreno DA, Ferreres F, Garcia-Viguera C, et al. (2012) New beverages of lemon juice enriched with the exotic berries maqui, açaí, and blackthorn: bioactive components and *in vitro* biological properties. *J Agric Food Chem* 60: 6571–6580.
- Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, et al. (2010) Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí. *Food Chemistry* 118: 208–214.
- Rufino MdSM, Pérez-Jiménez J, Arranz S, Alves RE, de Brito ES, et al. (2011) Açaí (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International* 44: 2100–2106.
- Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG, et al. (2008) *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* 56: 8326–8333.
- Honzel D CS, Redman KA, Schauss AG, Endres JR, Jensen GS (2008) Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8319–8325.
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, et al. (2006) Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acaí). *J Agric Food Chem* 54: 8604–8610.

Supporting Information

Figure S1 Effect of açaí aqueous extract (AAE) on *sod-3::GFP* expression. Transgenic worms carrying the reporter gene *sod-3::GFP* were treated with control solution (S basal) or 100 mg/mL AAE for 48 h from L1 and then with or without the oxidative stress condition. After a 1-h recovery period, photographs were taken on a fluorescence microscope. GFP fluorescence signals were measured using NIH Image J software. Different letters correspond to significant differences by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. AAE treatment alone nor the exposure to 10 mM t-BOOH for 1 h significantly upregulated *sod-3::GFP* expression.

(TIF)

Table S1 List of primers for qPCR.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Céline Leridon for helping with anthocyanin quantification. We also thank the *Caenorhabditis* Genetics Centre (CGC), which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR), and Dr. T. Keith Blackwell for supplying the *C. elegans* strains.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RPO EB MLP. Performed the experiments: LFB DNS PFB FAP JFCG TAFM AGJT ITBRP WLC PJ. Analyzed the data: LFB DNS PFB FAP JFCG TAFM AGJT ITBRP WLC PJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: NG FT EB MES MLP. Wrote the paper: LFB RPO.

- Wu GS (2004) The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 3: 156–161.
- Spada PD, Dani C, Bortolini GV, Funchal C, Henriques JA, et al. (2009) Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *J Med Food* 12: 1084–1088.
- Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML (2011) Dietary açaí modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr* 49: 188–194.
- Jensen GS, Ager DM, Redman KA, Mitzner MA, Benson KF, et al. (2011) Pain reduction and improvement in range of motion after daily consumption of an açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp-fortified polyphenolic-rich fruit and berry juice blend. *J Med Food* 14: 702–711.
- Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML (2011) Effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J* 10: 45.
- Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, et al. (2010) Açaí palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol* 45: 243–251.
- Liedo P, Carey JR, Ingram DK, Zou S (2012) The interplay among dietary fat, sugar, protein and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp in modulating lifespan and reproduction in a Tephritid fruit fly. *Exp Gerontol* 47: 536–539.
- Murphy CT (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol* 41: 910–921.
- Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, et al. (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132: 1025–1038.
- Wu Z, Smith JV, Paramasivam V, Butko P, Khan I, et al. (2002) *Ginkgo biloba* extract EGB 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48: 725–731.
- Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, Ingram DK, Joseph JA, et al. (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5: 59–68.
- Yu YB, Dosanjh L, Lao L, Tan M, Shim BS, et al. (2010) *Cinnamomum cassia* bark in two herbal formulas increases life span in *Caenorhabditis elegans* via insulin signaling and stress response pathways. *PLoS One* 5: e9339.

23. Guha S, Cao M, Kane RM, Savino AM, Zou S, et al. (2012) The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1. *Age (Dordr)* 5: 1559–1574.
24. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
25. Boulanger E, Gossin N, Wautier MP, Taamma R, Wautier JL (2007) Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney Int* 71: 126–133.
26. Giusti MMWR (2001) Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE AT, An H, et al., editor. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley. pp. Unit F1.2.1–13.
27. Gordon AGCA, Corrêa Cabral LM, Cordeiro de Freitas S, Araujo Dib Taxi CM, Marino Donangelo C, et al. (2012) Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food Chemistry* 133 256–263.
28. Brand-Williams WCM, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25–30.
29. Reinson K, Lehtonen M, Storvik M, Jantson T, Lakso M, et al. (2011) Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant fat-3. *J Biochem Mol Toxicol* 25: 269–279.
30. Oliveira RP, Porter Abate J, Dilks K, Landis J, Ashraf J, et al. (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 8: 524–541.
31. Shi YC, Yu CW, Liao VH, Pan TM (2012) Monascus-fermented dioscorea enhances oxidative stress resistance via DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 7: e39515.
32. Montiel-Davalos A, Ibarra-Sanchez Mde J, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, Lopez-Marure R (2010) Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. *Toxicol In Vitro* 24: 135–141.
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
34. Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192–205.
35. Kisselev AF, Goldberg AL (2005) Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* 398: 364–378.
36. Song J, Zhao M, Liu X, Zhu Y, Hu X, et al. (2013) Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells. *Food Chem Toxicol* 58: 306–310.
37. Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU (2011) Polyphenolics from acai (*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* 59: 7999–8012.
38. Hasegawa K, Miwa S, Tsutsumiuchi K, Taniguchi H, Miwa J (2004) Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Lett* 152: 183–189.
39. Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, et al. (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161: 1101–1112.
40. Gems D, Riddle DL (2000) Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: B215–219.
41. An JH, Blackwell TK (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* 17: 1882–1893.
42. Hasegawa K, Miwa J (2010) Genetic and cellular characterization of *Caenorhabditis elegans* mutants abnormal in the regulation of many phase II enzymes. *PLoS One* 5: e11194.
43. Hasegawa K, Miwa S, Isomura K, Tsutsumiuchi K, Taniguchi H, et al. (2008) Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Sci* 101: 215–225.
44. Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10: 565–578.
45. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, et al. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277–283.
46. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, et al. (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4494–4499.
47. Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, et al. (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* 19: 2278–2283.
48. Solomon A, Bandhakavi S, Jabbar S, Shah R, Beitel GJ, et al. (2004) *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. *Genetics* 167: 161–170.
49. Wheeler JM, Thomas JH (2006) Identification of a novel gene family involved in osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 174: 1327–1336.
50. Lamitina T, Huang CG, Strange K (2006) Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12173–12178.
51. Choe KP, Strange K (2007) Molecular and genetic characterization of osmosensing and signal transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J* 274: 5782–5789.
52. Gonzalez-Manzano S, Gonzalez-Paramas AM, Delgado L, Patianna S, Surco-Laos F, et al. (2012) Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *J Agric Food Chem* 60: 8911–8916.
53. Kampkotter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, et al. (2007) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234: 113–123.
54. Kampkotter A, Pielarski T, Rohrig R, Timpel C, Chovolou Y, et al. (2007) The *Ginkgo biloba* extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Res* 55: 139–147.
55. Buchter C, Ackermann D, Havermann S, Honnen S, Chovolou Y, et al. (2013) Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* Is Modulated by DAF-16. *Int J Mol Sci* 14: 11895–11914.
56. Ishikado A, Sono Y, Matsumoto M, Robida-Stubbs S, Okuno A, et al. (2012) Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*.
57. Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA (2006) Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp Gerontol* 41: 928–934.
58. Kampkotter A, Timpel C, Zurawski RF, Ruhl S, Chovolou Y, et al. (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149: 314–323.
59. Grunz G, Haas K, Soukup S, Klingenspor M, Kulling SE, et al. (2012) Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech Ageing Dev* 133: 1–10.
60. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST (2004) Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 52: 1539–1545.
61. Xue YL, Ahiko T, Miyakawa T, Amino H, Hu F, et al. (2011) Isolation and *Caenorhabditis elegans* lifespan assay of flavonoids from onion. *J Agric Food Chem* 59: 5927–5934.