

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

**O tratamento com extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) protege o *Caenorhabditis elegans* contra exposição aguda à Acrilamida**

Washington Luiz Caneschi

2014

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

**O tratamento com extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) protege o *Caenorhabditis elegans* contra exposição aguda à Acrilamida**

Washington Luiz Caneschi

*Orientadora*

Riva de Paula Oliveira

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

Ouro Preto

2014

C221tCaneschi, Washington Luiz.

O tratamento com extrato aquoso de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) protege *Caenorhabditiselegans* contra a exposição aguda à Acrilamida.[manuscrito] / Washington LuizCaneschi.- 2014.

xviii, 86f.: il.; color.; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Riva de Paula Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Processos e ao Tratamento de Doenças.

1. Acrilamida- Teses. 2. Stress (Fisiologia) - Teses. 3. Reação de oxidação-redução - Teses. 4. Açai - Teses. I. Oliveira, Riva de Paula. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 661.717.53:613.26

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

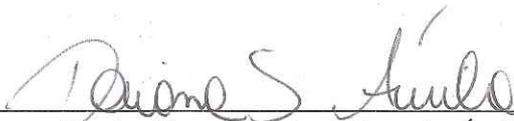
**“O tratamento com extrato aquoso de açaí (*Euterpe Oleracea Mart.*) protege o *Caenorhabditis elegans* contra exposição aguda à Acrilamida”**

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de 2014, às 09h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Washington Luiz Caneschi**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... aprovou ..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

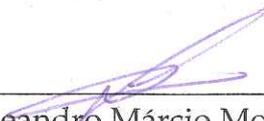
Membros da Banca Examinadora:



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira  
Presidente



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila  
Examinadora (UNIPAMPA)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira  
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 24/02/2014

“Fanático é aquele que não muda de ideia e não muda de assunto”

*Winston Churchill*

## **Agradecimentos**

À professora Dra. Riva de Paula Oliveira, pela valiosa orientação, pelo exemplo de profissionalismo, pela paciência, pela confiança, por modelar meu pensamento científico e por ter me dado oportunidade de participar deste projeto.

Aos professores Ieso de Miranda Castro, Luis Carlos Crocco Afonso e Rogélio Lopes Brandão, Maria Lúcia Pedrosa, pela concessão do uso de seus laboratórios e equipamentos.

Ao laboratório de Multiusuários do NUPEB.

Aos professores, funcionários e colegas dos demais laboratórios do NUPEB.

Ao aluno de iniciação científica, Wagney, que me ajudou em experimentos importantes para a confecção desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica, Alvaro, Daniela, Franciny, Igor, Isabela, Larissa, Renata e Wagney pela excelente e divertida convivência.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade e pelo apoio acadêmico e institucional.

À UFOP/ REUNI, pelo auxílio financeiro concedido.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo incentivo à capacitação e ao desenvolvimento da ciência através de apoio financeiro.

À Ariane, por ter compreendido meus finais de semana de trabalho. Te amo!

À minha família, pelo apoio fundamental.

Ao meu pai Luiz, minha mãe Amélia e meu irmão William pelo apoio e carinho eternos!

## Resumo:

Acrilamida (AAM) é um composto tóxico presente em quantidades relevantes em alimentos ricos em carboidratos que passaram por tratamento térmico a altas temperaturas. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que AAM pode induzir efeitos neurotóxicos, genotóxicos, carcinogênicos, distúrbios reprodução e no desenvolvimento. O uso de compostos naturais provindos da dieta com efeitos antioxidantes pode fornecer uma estratégia de combate à toxicidade causada pela AAM. O Açaí, *Euterpe oleracea* Mart., é um fruto da América do Sul comumente usado em bebidas além de ser usado na medicina popular, sendo rico em compostos fitoquímicos, particularmente antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides. Neste projeto, nós avaliamos o possível efeito protetor do extrato aquoso de Açaí (EAA) 100 mg/ml sobre os efeitos tóxicos provocados pela exposição aguda no *C. elegans* à AAM. Para avaliar a toxicidade da exposição aguda à AAM no *C. elegans*, nós avaliamos parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos. A exposição aguda à AAM reduziu o tamanho corporal dos animais, o número total de progênie, a longevidade, aumentou a produção de EROs e ativou a expressão de genes de detoxificação *gst-4::GFP* e *gcs-1::GFP*, ativou a localização nuclear de *DAF-16::GFP*, mas não ativou a expressão de *sod-3*. Para avaliar se o tratamento com EAA possui algum efeito protetor sob a toxicidade induzida pela AAM, os animais foram previamente tratados com EAA e em seguida expostos à AAM. Nossas análises revelaram que o tratamento com EAA impediu a redução corporal dos animais, aumentou o tempo de vida, reduziu a produção de EROs, e preveniu a ativação de *gcs-1* por AAM. Já foi demonstrado que a ativação de *gst-4::GFP* por AAM é dependente do fator de transcrição SKN-1/Nrf2. Nós observamos uma redução parcial da expressão de *gcs-1::GFP* em animais *skn-1(RNAi)* tratados com AAM, o que não foi observado para animais *daf-16(RNAi)*, sugerindo que a indução de *gcs-1::GFP* pela AAM depende parcialmente de SKN-1. O pré-tratamento com EAA reduziu a expressão de *gcs-1::GFP* nos animais *daf-16(RNAi)* tratados com AAM mas não nos animais *skn-1(RNAi)* sugerindo que SKN-1 não interfere na expressão de *gcs-1* promovido pelo EAA. Por fim, os resultados deste projeto indicam que o pré-tratamento do *C. elegans* com EAA é capaz de reduzir os efeitos tóxicos induzidos pela exposição aguda à AAM.

## Abstract

Acrylamide (AAM) is a neurotoxic, genotoxic, carcinogenic chemical compound that has developmental and reproductive toxic effects. The dietary exposure to AAM is becoming a major concern because it can be formed during the processing of carbohydrate-rich foods at high temperatures such as fried potatoes. The use of natural compounds with antioxidant effects might provide a strategy to reduce AAM toxicity. Açai, (*Euterpe oleraceae Mart*), a fruit from the palm tree native to the Amazon, has been described as a potential source of natural antioxidants particularly, anthocyanins and proanthocyanidins. In this project, we evaluated the possible protective effect of Açai aqueous extract (AAE) 100 mg/ml on the toxic effects mediated by acute exposure to *C. elegans* to AAM. To evaluate the toxicity of acute exposure to AAM in *C. elegans*, we examined biological, biochemical and genetic parameters. Acute exposure to AAM reduced body size, the total number of progeny, longevity, increased ROS production and upregulated the expression of *gst-4::GFP* and *gcs-1::GFP* genes, activated nuclear localization of *DAF-16::GFP*, but did not upregulate *sod-3::GFP*. To assess whether treatment with AAE has some protective effect in the toxicity induced by AAM, the animals were pretreated with AAE and then exposed to AAM. Our results revealed that pretreatment with AAE prevented body size reduction, increased lifespan, reduced ROS production and prevented the upregulation of *gcs-1* by AAM. We observed a partial reduction of the expression of *gcs-1::GFP* in *skn-1(RNAi)* animals exposed to AAM, which was not observed in *daf-16(RNAi)* animals, suggesting that the induction of *gcs-1::GFP* by AAM is partially dependent on SKN-1. The pretreatment with AAE did not alter reduced expression of *gcs-1::GFP* in *skn-1(RNAi)* animals, suggesting that SKN-1 does not interfere in *gcs-1* expression. Finally, these results indicate that pretreatment with AAE is able to reduce the toxic effects induced by acute exposure to AAM in *C. elegans*

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Imagem representativa da fórmula estrutural da Acrilamida.....	5
<b>Figura 2.</b> Figura esquemática do mecanismo de formação da Acrilamida em alimentos processados.....	7
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Esquema simplificado da regulação da expressão de genes de detoxificação por SKN-1/Nrf e DAF-16/FOXO em <i>C. elegans</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Efeito da exposição aguda à AAM sobre o tamanho corporal do <i>C. elegans</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> Efeito da exposição aguda à AAM sobre a reprodução do <i>C. elegans</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> Efeito da exposição aguda à AAM sobre a longevidade do <i>C. elegans</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> Efeito da exposição aguda do <i>C. elegans</i> à AAM na produção de EROs.....	40
<b>Figura 9.</b> Efeito da exposição aguda do <i>C. elegans</i> à AAM sobre a expressão de gene de detoxificação <i>gst-4::GFP</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Imagem representativa da ativação de <i>gcs-1::GFP</i> e <i>sod-3::GFP</i> .....	43

<b>Figura 11.</b> Efeito do pré-tratamento com EAA em <i>C. elegans</i> expostos à AAM sobre o tamanho corporal.....	45
<b>Figura 12.</b> Efeito do EAA sobre a longevidade do <i>C. elegans</i> expostos AAM.....	48
<b>Figura 13.</b> Efeito do pré-tratamento com EAA sobre a produção de EROs em <i>C. elegans</i> expostos à AAM.....	51
<b>Figura 14.</b> Efeito do pré tratamento com EAA em <i>C. elegans</i> expostos à AAM sobre a expressão de <i>gst-4::GFP</i> .....	52
<b>Figura 15.</b> Efeito do pré tratamento com EAA em <i>C. elegans</i> expostos à AAM sobre a expressão de <i>gcs-1::GFP</i> .....	54
<b>Figura 16.</b> Efeito do pré tratamento com EAA em <i>C. elegans</i> expostos à AAM sobre a expressão de <i>sod-3::GFP</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Avaliação da localização nuclear de <i>DAF-16::GFP</i> em animais expostos à AAM.....	57
<b>Figura 18.</b> Efeito do pré-tratamento com EAA sobre a produção de EROs em animais mutantes <i>daf-16</i> expostos à AAM.....	59
<b>Figura 19.</b> Avaliação do envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na ativação de <i>gcs-1::GFP</i> por AAM e proteção do EAA.....	60

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Níveis de Acrilamida em ug/Kg em diferentes tipos de alimentos.....	8
<b>Tabela 2.</b> Composição aproximada da polpa de açaí seca.....	19
<b>Tabela 3.</b> Linhagens de <i>C. elegans</i> utilizadas neste trabalho.....	26
<b>Tabela 4.</b> Longevidade de <i>C. elegans</i> expostos à diferentes tempos em AAM.....	39
<b>Tabela 5.</b> Efeito do pré-tratamento com EAA em <i>C. elegans</i> expostos à AAM sobre o tamanho corporal.....	46
<b>Tabela 6.</b> Efeito do EAA sobre o tempo de vida do <i>C. elegans</i> expostos à AAM.....	49

## **Abreviaturas**

**AAM** - Acrilamida

**AGE** – Fosfoinositol -3- quinase

**ARE** - Elemento Responsivo Antioxidante

**CTL** – Catalase

**EAA** – Extrato Aquoso de Açai

**ERO** - Espécie Reativa de Oxigênio

**FUdR**- 5-Fluoro-2'-Deoxyuridina

**GFP** – Proteína Verde Fluorescente

**GSK** – Glicogênio Sintetase Quinase

**GST** – Glutathione -S- Transferase

**H<sub>2</sub>DCFDA** - 2,7-Diclorofluoresceína – Diacetato

**IgG** – Imunoglobulina G

**JNK** - C.Jun. N. Terminal Quinase

**MAPK** – Proteína Ativada por Mitógeno

**MnSOD** - Manganês Superóxido Dismutase

**NGM**- Nematode Growth Medium

**Nrf**- Fator Nuclear Eritróide

**RNAi** – RNA de Interferência

**SDR** – Desidrogenase de Cadeia Curta

**UGT** – Uridina Difosfato Glucuronosil Transferase

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Estresse Oxidativo .....	2
1.2 Mecanismos Enzimáticos e Não Enzimáticos de combate ao Estresse Oxidativo .....	3
1.3 Acrilamida .....	4
1.4 Toxicidade induzida por Acrilamida .....	9
1.5 Compostos Naturais com propriedades protetoras contra Acrilamida .....	10
1.6 Organismo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	11
1.7 Regulação da Expressão Gênica de Enzimas de Detoxificação em <i>C. elegans</i> por SKN-1/Nrf e DAF-16/FOXO .....	13
1.7.1 Via de Sinalização SKN-1/Nrf .....	13
1.7.2 Via de sinalização DAF-16/FOXO .....	14
1.8 Acrilamida em <i>C. elegans</i> : Efeitos tóxicos e compostos que atenuam toxicidade induzida pela AAM.....	16
1.9 Açai ( <i>Euterpe oleraceae</i> Mart.).....	17
1.9.1 Efeitos anti-lipídicos do Açai .....	18
1.9.2 Efeitos antioxidantes do Açai .....	20
1.10 Justificativa.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	24

3.1 Linhagens .....	25
3.2 Manutenção das cepas .....	25
3.3 Sincronização cronológica do <i>C. elegans</i> .....	25
3.4 Preparo das Placas contendo Extrato Aquoso de Açaí (EAA) .....	27
3.5 Avaliação do efeito do tratamento agudo da AAM e da EAA sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no <i>C. elegans</i> .....	27
3.5.1 Análise do Tamanho Corporal .....	28
3.5.2 Análise da Progênie.....	28
3.5.3 Análise da Sobrevivência.....	29
3.5.4 Análise da produção de EROs.....	30
3.5.5 Análise da Expressão de genes de detoxificação. ....	30
3.5.6. Avaliação da Localização nuclear de <i>DAF-16::GFP</i> .....	31
3.5.7 Silenciamento de <i>skn-1</i> e <i>daf-16</i> .....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Avaliação do efeito do tratamento agudo da AAM sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no <i>C. elegans</i> .....	34
4.1.1 Análise do Tamanho corporal .....	34
4.1.2 Análise da Progênie.....	34
4.1.3 Análise de Sobrevivência.....	37
4.1.4 Análise da Produção de EROs .....	37
4.1.5 Análise da expressão de genes de detoxificação.....	41
4.2 Avaliação do efeito protetor do açaí sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no <i>C. elegans</i> exposto tratamento agudo com AAM. ....	44
4.2.1 Análise do Tamanho Corporal .....	44
4.2.2 Análise da Progênie.....	44
4.2.3 Análise da Sobrevivência.....	47
4.2.4 EAA reduz a produção de Espécies Reativas de Oxigênio em <i>C. elegans</i> expostos á AAM .....	50

4.2.5 Análise da Expressão de genes de detoxificação .....	50
4.3 Avaliação do papel de SKN-1 e DAF-16 na proteção induzida pelo açai em animais transgênicos <i>gcs-1::GFP</i> expostos ao tratamento agudo com AAM. .	53
4.3.1 Envolvimento de DAF-16 na resposta ao estresse agudo por AAM em animais tratados com EAA .....	53
4.3.2 Avaliação do papel de SKN-1 e DAF-16 na ativação de <i>gcs-1::GFP</i> por AAM.....	56
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
5.1 Avaliação do efeito da exposição aguda à AAM sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no <i>C. elegans</i> .....	62
5.2 Avaliação do efeito protetor do EAA sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no <i>C. elegans</i> exposto ao tratamento agudo com AAM .....	66
5.3 Análise da expressão gênica e do envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na proteção induzida pelo EAA em animais expostos ao tratamento agudo com AAM .....	69
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Estresse Oxidativo

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando manter um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbios. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) podem ser formadas intracelularmente podendo funcionar como um mensageiro intracelular para a manutenção da homeostase redox celular; para o controle da proliferação e a regulação de vias de sinalizações específicas (Finkel e Holbrook, 2000; Valko, 2007). Contudo, espécies reativas formadas intracelularmente a partir do oxigênio ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, e podem comprometer processos biológicos importantes (Cerqueira *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é considerado o resultado de um desequilíbrio de duas forças opostas e antagônicas, EROs e antioxidantes, em que os efeitos de EROS sejam mais proeminentes do que a capacidade de compensação dos antioxidantes (Kirkinetzos, 2001). O excesso de EROs danifica biomoléculas celulares como lipídeos, proteínas e DNA (Finkel e Holbrook, 2000), interferindo nos sistemas biológicos dos quais as mesmas fazem parte. Este dano gerado pode causar desnaturação de proteínas com inativação de enzimas, modificação de bases nitrogenadas, mutações, desestruturação de moléculas de lipídeos e conseqüentes ruptura de membranas que podem em conjunto, ou não, culminar em morte celular (Cerqueira *et al.*, 2007; Calkins, 2009). As EROs podem ser provenientes tanto do metabolismo endógeno, sendo produzidos pelas mitocôndrias como subprodutos do metabolismo aeróbico em humanos e em animais (Wei e Lee, 2002). A produção de EROS pode ser ainda acentuada quando as células são expostas a metais pesados, como exemplo do Cádmio, Chumbo, Arsênio e Mercúrio (Flora, 2008) dentre outros compostos. Atualmente tem-se dado atenção a outro composto, a Acrilamida, o qual foi relatado altas concentrações em alimentos processados e que tem demonstrado alta capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio.

## 1.2 Mecanismos Enzimáticos e Não Enzimáticos de combate ao Estresse Oxidativo

Sob condições normais, os efeitos das EROs são neutralizados por uma variedade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

Os sistemas endógenos de defesa antioxidante são formados por compostos de baixo peso molecular, proteínas quelantes de metais, tióis de alto e baixo peso molecular e enzimas (Rossi *et al.*, 2008, Cerqueira *et al.*, 2007). As enzimas de detoxificação envolvidas neste processo são classificadas como enzimas de detoxificação de Fase I e Fase II. A enzima citocromo P450 monooxigenase é a principal envolvida na fase inicial (Fase I) do metabolismo xenobiótico. Uma quantidade de enzimas detoxificadoras, tais como Superóxido dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase e Glutathione transferase fazem parte da classe de enzimas de detoxificação de Fase II. Além das fases I e II de detoxificação, vale ressaltar a Fase III de detoxificação, onde os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (Sarkadi *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2013).

A ativação transcricional das enzimas de Fase II é mediada pelo elemento cis-atuante denominado ARE (*Antioxidant Response Element*) que é reconhecido pelo fator de transcrição do tipo zíper de leucina básico (bZIP) Nrf (Nrf-1 e Nrf-2) (Calkins *et al.*, 2009). Em condições normais, Nrf se localiza no citoplasma ligado a uma proteína chamada Keap1. Durante o estresse oxidativo, Nrf se desliga de Keap1 e se transloca para o núcleo celular ativando a expressão dos genes de detoxificação de Fase I e II (Giudice, 2010). Esta dissociação de Nrf é alcançada através de uma mudança conformacional em Keap1 causada pela oxidação/modificação de cisteínas essenciais ou pela remoção de zinco de cisteínas coordenadoras na sua estrutura (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005).

Assim como os fatores de transcrição Nrf-1 e 2, outra proteína importante com relação à resistência ao estresse oxidativo são as proteínas FOXO. A família dos fatores de transcrição FOXO está relacionada com funções de supressão de tumores, metabolismo energético e à longevidade

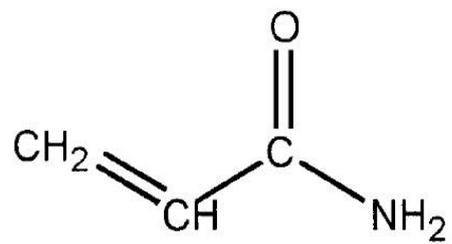
dos organismos. Respostas celulares dependentes de FOXO incluem gliconeogênese, secreção de neuropeptídeos, autofagia, apoptose, ciclo celular e resistência ao estresse (Dervis & Brunet, 2008). Em resposta à via da insulina/IGF-1 e outros fatores de crescimento, as proteínas quinases AKT e SGK fosforilam FOXO em três locais conservados. Esta fosforilação promove a ligação de FOXO às proteínas 14-3-3 no citoplasma e impedindo sua relocalização no núcleo. Em resposta ao estresse oxidativo, a via JNK (c-Jun N-terminal kinase) fosforila diretamente FOXO ativando a sua localização nuclear (Ma, 2010). Os genes alvos dependentes de FOXO mais bem definidos incluem inibidores do ciclo celular p27 e p21, os genes de resposta ao estresse como manganês Superóxido dismutase (MnSOD) e Catalase (CTL), inibidores de crescimento e os fatores pró-apoptóticos mediadora da morte celular.

Além das defesas endógenas de combate a EROS, os organismos ainda dispõem de compostos antioxidantes exógenos para sua proteção ao estresse oxidativo. Estes compostos são obtidos principalmente através da dieta, e podem ser definidos como qualquer substância capaz de evitar ou atenuar a oxidação de moléculas susceptíveis (Cerqueira *et al.*, 2007). O sistema exógeno de defesa inclui substâncias como vitamina E, vitamina C, vitamina A, os carotenóides, catequinas, epicatequina, quercetina, antocianinas dentre outros compostos fenólicos (Cerqueira *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2007).

### **1.3 Acrilamida**

A acrilamida (AAM) (Figura 1) ( $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ , 2-propenamida) é um sólido cristalino, incolor, inodoro, altamente polar, com solubilidade em água de 2g/ml e com ponto de fusão de 84,5°C (Sanganyado *et al.*, 2011). A AAM é produzida em grande escala pela indústria e é muito utilizada para a síntese de poliacrilamida, que possui numerosas aplicações como um condicionador do solo, nas indústrias de cosméticos, de papel, têxteis, flocculantes, aditivos para tratamento de água, e no laboratório, como um suporte sólido para a separação de proteínas por eletroforese (Friedman, 2003, Parzefall, 2007).

No Brasil, a Portaria MS nº. 518, de 25 de março de 2004, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e



**Figura 1. Imagem representativa da Fórmula estrutural da Acrilamida.  
Adaptado de Granath, 2001.**

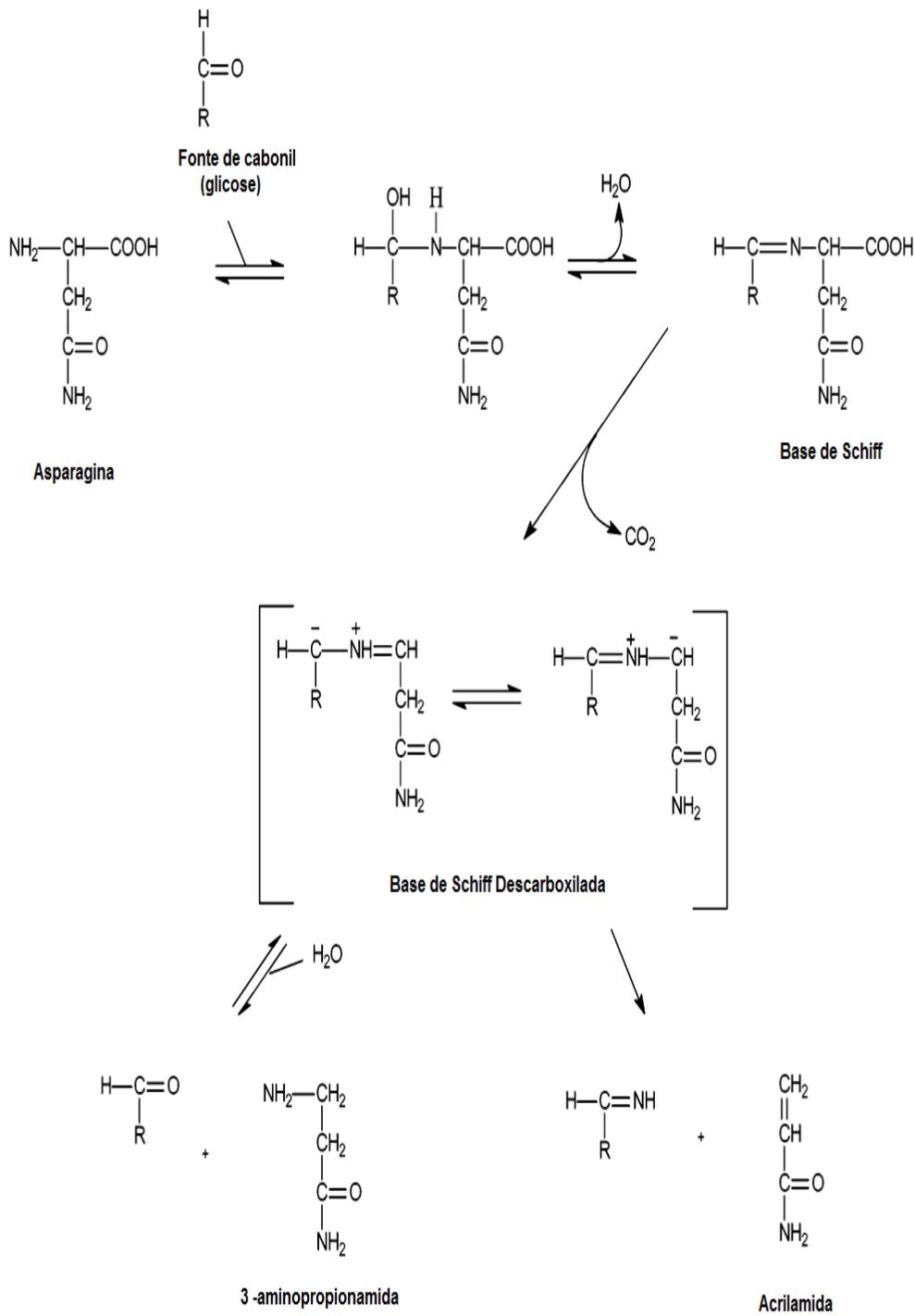
vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece o limite de 0,5 µg/L para a presença de AAM na água potável, o mesmo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011).

Além da produção industrial, este composto ainda pode ser encontrado nos alimentos processados. Açúcares redutores, tais como glicose e frutose, reagem com os aminoácidos livres presentes nos alimentos durante processos a altas temperaturas (100°C) como fritura, cozimento e torrefação. Através de uma série de reações não enzimáticas, dado o nome Reação de Maillard, há a formação de grande número de produtos que conferem cor e aroma aos alimentos processados. Durante este processo, também dá origem a contaminantes indesejáveis, incluindo a AAM (Mottram, 2002; Muttucumar, 2013; Rydberg, 2005).

Durante a Reação de Maillard, o primeiro processo para a formação da AAM é a reação do aminoácido asparagina e um composto carbonil, normalmente a D-glicose, resultando no correspondente conjugado N-Glicosil asparagina. Este conjugado em altas temperaturas desidrata gerando uma base de Schiff. A base de Schiff então formada pode seguir duas vias. Na primeira via, a base pode se hidrolisar para formar 3- aminopropionamida, que pode continuar se degradando e formar acrilamida quando aquecida. Já na segunda via, a base de Schiff pode se decompor diretamente para formar acrilamida e uma imina (Figura 2) (Zyzak, 2003).

Pesquisadores da Universidade de Estocolmo (Suécia) informaram que altos níveis de AAM foram encontrados em alimentos comumente consumidos que são preparadas em altas temperaturas, variando de 30 a 2300 µg/kg (Svensson, 2003). Este achado também foi confirmado por outros autores, onde foi detectado acrilamida em um conjunto diversificado de alimentos, como mostrado na tabela 1, incluindo pães, cereais, bolos e outros alimentos, chamando a atenção, que os maiores valores encontrados foram nas amostras de batatas fritas (Wilson, 2009; Svensson, 2003; Chen *et al.*, 2012).

Como resultados de diversos autores mostram que, alta quantidade de acrilamida é encontrada em alimentos de alta frequência de ingestão pela



**Figura 2. Figura esquemática do mecanismo de formação da acrilamida em alimentos processados. Adaptado de Zyzak, 2003.**

**Tabela 1. Níveis de acrilamida em ug/Kg em diferentes tipos de alimentos.  
Adaptado de Chen *et al.*, 2012.**

Categoria	Amostras Testadas	Amostras Positivas	Níveis de Acrilamida (ug/kg)			
			Média	SD	Min	Máx
Pasta de Soja	4	4	13.70	8.39	4.08	24.40
Carne Processada	6	6	22.62	20.10	2.31	49.06
Macarrão	11	9	23.22	15.19	9.12	52.09
Pão	5	5	36.72	26.54	10.50	67.19
Biscoito Wafer	6	5	44.92	33.86	10.36	86.76
Bolo	6	6	68.34	65.75	16.82	196.46
Panqueca	8	7	70.33	127.86	1.88	352.90
Biscoito assado	24	23	97.57	103.71	0.41	484.17
Chips	11	9	137.91	119.68	17.39	398.23
Lanche frito	8	8	131.73	122.75	39.12	432.92
Batata Frita	9	9	604.27	1,327.87	58.40	4,126.26

população, vários estudos, foram realizados para avaliar a toxicidade deste composto.

#### **1.4 Toxicidade induzida por Acrilamida**

Estudos realizados em culturas do tipo HepG2 (Cao *et al.*, 2008; (Zang *et al.*, 2009) e do tipo Caco-2 (Ramiro *et al.*, 2010) demonstraram que a exposição à AAM causa efeitos tóxicos como redução da viabilidade celular e aumento da genotoxicidade. A observação desses efeitos estão ainda associados a aumento de produção de EROs, redução dos níveis de glutathione (Zang *et al.*, 2009, Zang *et al.*, 2012), além de níveis elevados da enzima  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase, enzima de fase limitante da síntese de glutathione (Ramiro *et al.*, 2010), e redução da atividade da enzima Superóxido dismutase (Zang *et al.*, 2012).

Pesquisadores usando ratos como modelo, demonstraram que o tratamento com AAM induziu danos a células germinativas como diminuição do número de espermatozoides e destruição dos túbulos seminíferos (Rahangadale *et al.*, 2012). Também foram observados danos ao sistema nervoso pela desmielinização, degeneração neuronal, liquefação da matéria branca (Rahangale *et al.*, 2012). Mohamed (2012) mostrou que ratos que fizeram ingestão de água contaminada com AAM apresentaram níveis diminuídos de glutathione, assim como diminuição da atividade enzimática da Superóxido dismutase e Catalase. Além desses resultados, o grupo tratado apresentou redução dos níveis de Imunoglobulina G (IgG) e um leve aumento na agregação e viscosidade sanguínea (Arihan *et al.*, 2011). Esses dados em conjunto têm sido usados como base explicar os altos índices de aparecimento de tumores de glândulas mamárias, tireóide e escrotal em ratos (Hogervorst *et al.*, 2010).

Estudo epidemiológico realizado na Holanda mostrou correlação entre ingestão de AAM e neoplasias linfáticas, podendo aumentar o risco de mieloma múltiplo e linfoma folicular (Bongers *et al.*, 2012). Foi demonstrado ainda em estudo comparativo entre homens e mulheres, não existir relação entre ingestão de AAM e câncer de pulmão em homens, entretanto esta relação é

inversamente associada em mulheres, sendo mais correlacionado com adenocarcinoma (Hogervorst, 2009).

## **1.5 Compostos Naturais com propriedades protetoras contra Acrilamida**

A capacidade antioxidante de moléculas presentes em compostos naturais tem se tornado uma boa alternativa a fim de amenizar os efeitos tóxicos induzidos pela AAM.

Já foi observado que vários compostos tais como a curcumina, polifenol presente no Açafrão da Índia, o hidroxitirosol, presente em óleo de oliva, o extrato polifenólico de cacau, a procianidina B2, e a miricitrina, foram capazes de diminuir a produção de EROs, a citotoxicidade, a genotoxicidade além de elevar os níveis de  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase (Zhang *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2013) e inibir o consumo de glutathione (Ramiro *et al.*, 2010). O tratamento com alicina, composto presente no alho, causou aumento da atividade da enzima Superóxido dismutase assim como o aumento dos níveis de glutathione em cultura de células de hepatócitos (Zhang *et al.*, 2012).

A exposição de ratos à AAM gera efeitos danosos aos testículos e ao sistema nervoso. A administração de extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) reverteu os danos causados aos testículos, demonstrando ser um composto natural com potente capacidade de protetora (Yassa *et al.*, 2013). O tratamento com eugenol e isoeugenol causou proteção ao sistema nervoso de córtex de ratos tratados com AAM, onde foi observado que o tratamento impediu a redução dos níveis de glutathione e causou diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (Prasad e Mularidhara, 2013).

Muitos são os modelos de estudo utilizados para avaliação de toxicidade de compostos, e um modelo que já vem sendo muito utilizado pela comunidade científica é o *Caenorhabditis elegans*, que possui várias características que o torna um excelente modelo para ensaios de toxicidade e avaliação de compostos com propriedades antioxidantes.

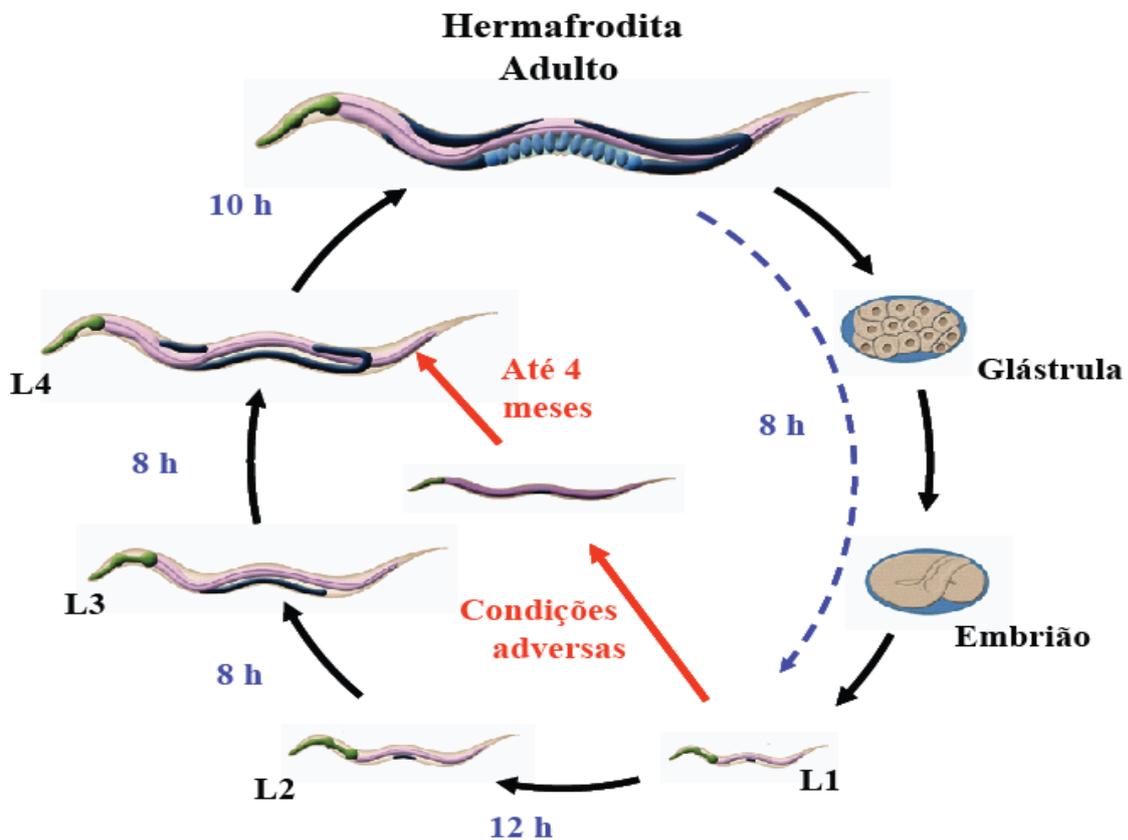
## 1.6 Organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

No início dos anos 1970, Sydney Brenner introduziu na comunidade científica o nematodo de solo *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudos de desenvolvimento de animais e do sistema nervoso. Brenner argumentou que para tais fins, seria necessário um organismo mais simples e diferenciado, suficientemente pequeno para ser tratados em grande número, de fácil cultivo, com um breve ciclo de vida e passível de análise genética. Desde então, *C. elegans* tem se mostrado um organismo modelo fundamental para uma melhor compreensão de processos bioquímicos, apoptose, função neuronal, sinalização, envelhecimento, regulação gênica, dentre outros (Artal-Sanz *et al.*, 2006; Kaletta & Hengartner, 2006).

Este nematodo possui várias características que o torna uma excelente ferramenta de estudo. *C. elegans* pode ser facilmente cultivado em laboratório em placas de petri com ágar ou meio líquido contendo *Escherichia coli* como fonte de comida para os animais. O *C. elegans* é um nematodo pequeno e no estágio adulto atinge aproximadamente 1 mm de comprimento e 80 µm (micrômetros) de diâmetro. O ciclo de vida do nematodo é curto e tempo de vida máximo à 20°C é de aproximadamente 3 semanas. Por serem hermafroditas, cada animal, é capaz de produzir aproximadamente 300 ovos por autofecundação. A fertilização cruzada também é possível de ocorrer entre um hermafrodita e um macho, que ocasionalmente aparece numa frequência de 0.1% da população

O hermafrodita grávido expõe o ovo que, após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Sob condições adversas, como superpopulação ou escassez de alimento, animais no estágio larval 1 podem entrar e permanecer em diapausa por até quatro meses, retomando seu desenvolvimento quando retornarem as situações ideais (Figura 3) (Disponível em [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).

Apesar da sua aparente simplicidade, o *C. elegans* possui um alto nível de diferenciação celular. Na fase adulta, os vermes possuem 959 células somáticas, diferenciadas em músculo, hipoderme, sistema nervoso, intestino, gônadas, glândulas e sistema excretor (Artal-Sanz *et al.*, 2006).



**Figura 3. Ciclo de vida do *C. elegans*:** o hermafrodita grávido expele o ovo que, após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Os hermafroditas adultos se autofecundam, iniciando um novo ciclo de vida. Sob condições adversas, L1 pode entrar em diapausa (Disponível em [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).

Outra vantagem do *C. elegans*, é que diferentes linhagens de mutantes e transgênicos podem ser estocadas á -80°C, o que permite que laboratórios de pesquisa possam adquirir e manter várias cepas por tempo indeterminado (Artal-Sanz *et al.*, 2006). Por ser um verme transparente, marcadores fluorescentes, genes repórteres, podem ser observados nos animais ao vivo e *in vivo*. Estas várias características citadas torna este organismo modelo uma excelente ferramenta para estudos de substâncias benéficas e tóxicas aos processos biológicos, bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas (Kaletta & Hengartner, 2006).

## **1.7 Regulação da Expressão Gênica de Enzimas de Detoxificação em *C. elegans* por SKN-1/Nrf e DAF-16/FOXO**

No *C. elegans*, a resistência ao estresse oxidativo por enzimas de detoxificação de fase II são controladas principalmente por duas vias de sinalização em *C. elegans* bem conservadas em mamíferos: SKN-1/Nrf-2 e DAF-16/ FOXO.

### **1.7.1 Via de Sinalização SKN-1/Nrf**

A proteína ortóloga de Nrf em *C. elegans*, SKN-1, desempenha um papel crucial na resistência ao stress oxidativo e xenobióticos e em várias outras vias (Cutter-Glover *et al.*, 2013). SKN-1 é um fator de transcrição do tipo zíper de Leucina (bZIP) que ativa genes de detoxificação de fase II (An e Blackwell, 2003). Sob condições normais, SKN-1 é fosforilado pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3), o que impede que este fator de transcrição internalize no núcleo, prevenindo a ativação da expressão de genes alvos (An *et al.*, 2005). Já sob condições de estresse, SKN-1 acumula-se no núcleo das células do intestino, o maior órgão de detoxificação no *C. elegans*, e ativa genes alvos em resposta a vários estresses (An e Blackwell, 2003; Oliveira *et al.*, 2009). A entrada de SKN-1 em condições de estresse no núcleo requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente da via de sinalização da p38 MAPK (MAPK -Mitogen-Activated Protein Kinase). SEK-1, a

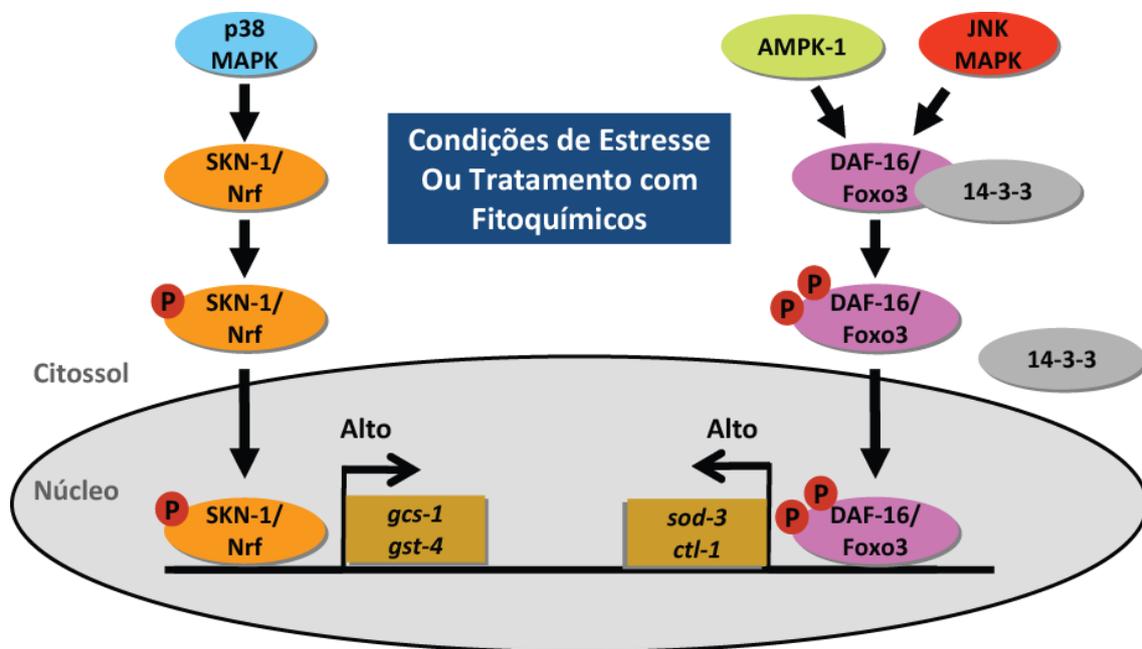
MAPK quinase responsável por fosforilar PMK-1 é necessária para ativar a relocalização de SKN-1 no núcleo e ativar a expressão de *gcs-1* (Inoue *et al.*, 2005). Mutantes com perda de função de *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo (An e Blackwell, 2003; Inoue *et al.*, 2005) Além disso, mutantes *skn-1* possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25-30%, o que é consistente com associações feitas entre estresse oxidativo e longevidade (An & Blackwell, 2003).

Foi também demonstrado que a via da IIS (via de sinalização da insulina) regula diretamente o fator de transcrição SKN-1. DAF-2 é homólogo ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. DAF-2 ativa as enzimas fosfatidilinositol 3-quinase AGE-1 (PI3K), PDK-1, e AKT-1/2, quinases que antagonizam o fator de transcrição SKN-1 (Tullet *et al.*, 2008), assim como DAF-16, o fator ortólogo de FOXO (Henderson e Johnson, 2001; Hertweck *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). A deleção de *skn-1* em mutantes *daf-2* suprime os fenótipos da resistência ao estresse oxidativo e a longevidade, associados a este último. Além disso, o envelhecimento é retardado nos animais quando *skn-1* é super expresso transgenicamente, e quando possuem o sítio de fosforilação para AKT-1/2 mutados na ausência de *daf-16*.

Além de estresse térmico e estresse oxidativo, a ativação de SKN-1 pode se dar através de fitoquímicos, como compostos presentes no alho (Powolny *et al.*, 2011), baicaleína, derivado de *Scutellaria baicalensis Lamiaceae* (Havermann *et al.*, 2013), assim como extrato da casca de salgueiro (Ishikado *et al.*, 2013), promovendo a translocação para o núcleo e ativando genes alvos como *gst-4* e *gcs-1*(Figura 4).

### **1.7.2 Via de sinalização DAF-16/FOXO**

Em *C. elegans*, o fator de transcrição DAF-16/FOXO, é controlado pelo receptor de insulina DAF-2. Quando a via de DAF-2 é ativada, a enzima fosfoinositol-3-quinase (AGE-1) é fosforilada, resultando na formação de PIP3, o



**Figura 4. Esquema simplificado da Regulação da expressão de genes de detoxificação por SKN-1/Nrf e DAF-16/FOXO em *C. elegans*.** A figura ilustra a ativação de genes de detoxificação pelos fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16. Sob condições de estresse ou tratamento com fitoquímicos, estes fatores de transcrição são ativados, se deslocando para o núcleo ativando genes como *gcs-1* e *gst-4*, alvos de SKN-1, e *sod-3* e *ctl-1*, alvos de DAF-16.

qual recruta outras quinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 ativa AKT e SGK-1 através de fosforilação. AKT e SGK-1 então por sua vez, fosforila DAF-16, mantendo-o no citoplasma, impedindo que se transloque para o interior do núcleo celular e regule genes alvos (Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Braeckman, 2007; Murphy *et al.*, 2003). Entretanto, ausência de qualquer fator da cascata citado acima, DAF-16 se desloca para o interior do núcleo celular. Uma vez dentro no núcleo, DAF-16 pode tanto ativar quanto reprimir genes envolvidos na regulação do tempo de vida, metabolismo e resposta ao estresse, como por exemplo enzimas de detoxificação tais como Catalase (*ctl-1* e *ctl-2*) e Superóxido dismutase (*sod-3*) (Murphy *et al.*, 2003).

Além da via de DAF-2, DAF-16 pode também ser regulado pela interação com as proteínas 14-3-3 AMPK-1 e JNK-1. As proteínas 14-3-3 regulam sua distribuição nuclear. A proteína quinase ativada por AMP (AMPK-1) ativa DAF-16 por fosforilação direta (Landis & Murphy, 2010). JNK-1, um membro da família MAPK ativado por estresse, aumenta o tempo de vida e está relacionado ao aumento da resistência ao calor e ao estresse oxidativo. JNK-1 fosforila diretamente DAF-16 *in vitro*. Dados bioquímicos e genéticos sugerem que a JNK-1 atua em paralelo com a via de sinalização da insulina para regular DAF-16, mas de uma maneira oposta, isto é, a fosforilação de DAF-16 por JNK-1 promove sua localização nuclear e sua subsequente ativação (Landis & Murphy, 2010). Assim como o SKN-1, fitoquímicos podem atuar sobre DAF-16 ativando a sua localização nuclear, como quercetina e miricetina (Kampkotter *et al.*, 2008; Buchter *et al.*, 2013).

## **1.8 Acrilamida em *C. elegans*: Efeitos tóxicos e compostos que atenuam toxicidade induzida pela AAM.**

Hasegawa *et al.* (2004), observaram que a exposição contínua do *C. elegans* a concentrações de 500 mg/l de AAM reduz o tamanho corporal, a progênie assim como a longevidade dos animais.

Análise gênica realizada por microarranjos de DNA mostrou que a exposição de *C. elegans* durante 48 horas em AAM aumentou a expressão de um grande número de enzimas de detoxificação como GST (Glutathione-S-Transferase), UGT (Uridina Difosfato Glucuronosil Transferase) e SDR (desidrogenases de cadeia curta) (Hasegawa *et al.*, 2007). Dentre os genes identificados, *gst-4* foi o gene mais ativado. Este gene foi selecionado para a construção de uma linhagem transgênica com gene repórter *gst-4::GFP* onde o promotor de *gst-4* foi fundido como o gene da proteína fluorescente verde GFP. Esta linhagem transgênica foi utilizada para transformar o *C. elegans* em um biosensor para compostos tóxicos. As análises realizadas com este animal transgênico mostraram que a expressão de *gst-4::GFP* é ativada pela acrilamida de maneira dose e tempo dependente (Hasegawa *et al.*, 2007).

Este mesmo transgênico foi utilizado para encontrar compostos com possíveis propriedades que reduzem sua ativação por AAM. Dentre os compostos testados os que mais se destacaram nos testes foram chá verde e solução isotônica comercialmente disponível. Observaram que o tratamento dos animais transgênicos com AAM aumentou os níveis de GFP, enquanto este efeito não foi observado com o chá verde e o isotônico individualmente. Entretanto, quando os animais são co-tratados com AAM e chá verde ou isotônico, os níveis de fluorescência para *gst-4::GFP* diminuíram, sugestivo de detoxificação de AAM ou prevenção da indução do gene *gst-4* (Hasegawa *et al.*; 2007).

Diante desses resultados observados e sugestivos de que compostos naturais possuem capacidade protetora contra AAM, se torna interessante a investigação de novos compostos com possíveis propriedades antioxidantes, como por exemplo, o Açaí.

### **1.9 Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)**

Dentro da família de plantas Arecaceae e do gênero *Euterpe*, as espécies *Euterpe oleracea*, *Euterpe edulis* e *Euterpe precatoria* são referidas como açaí. *Euterpe oleracea* Mart. é uma espécie exótica de fruto nativa da região amazônica, podendo ser encontrada desde a América central até a

América do sul (Fragoso *et al.*, 2013). O fruto apresenta coloração roxo escuro quando maduro, composta de uma semente e uma pequena quantidade de polpa, o qual representa aproximadamente 13 a 15%. Estudo realizado avaliando a composição da polpa seca açai mostrou que, o fruto contém aproximadamente 71 % de fibras e 20 % de óleo (tabela 2) além de outros compostos como açúcares, proteínas e polifenóis (Rufino *et al.*, 2011).

Com o passar dos anos, açai tem ganhado popularidade como alimento funcional que pode ser consumido *in natura* ou em diversas variedades de bebidas ou preparado de comidas. Vale destacar que sua exportação para países não tropicais vem aumentando, se mostrando uma boa fonte de renda para a população que faz o manejo do açai. Sua popularidade se dá principalmente pelas grandes quantidades de polifenóis em sua composição, especialmente antocianinas e proantocianinas, se destacando a cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo (Rufino *et al.*, 2011, Schauss *et al.*, 2010), apresentando propriedades anti-inflamatória e antioxidante.

### **1.9.1 Efeitos anti-lipídicos do Açai**

Recentes evidências demonstram que mosca *Drosophila melanogaster*, tratadas com dieta hiperlipídica e suplementada com açai, tiveram seu tempo de vida médio e máximo aumentado significativamente, quando comparada somente aquelas submetidas á dieta hiperlipídica (Sun *et al.*, 2010). A suplementação de açai promove o aumento de sobrevivência em mosca da fruta, *Anastrepha ludens*, submetidas a dietas com alto teor de gordura e alto teor de açúcar, enquanto diminui a vida reprodutiva (Liedo *et al.*, 2012).

Oliveira *et al.* (2009) observou melhora nas defesas antioxidantes e redução do estresse oxidativo em ratos suplementados com polpa de açai submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Foi observado que, no grupo hipercolesterolêmico com açai na alimentação apresentou redução dos níveis de Superóxido dismutase, diminuição de proteínas carboniladas, aumento de grupos tióis no soro além de redução de colesterol total e das frações LDL e VLDL.

**Tabela 2. Composição aproximada da polpa de açaí seca. Fonte: Rufino, 2011.**

<b>Componente</b>	<b>g/100 g de Matéria seca</b>
<b>Proteína</b>	<b>6,27 ± 0,31</b>
<b>Cinzas</b>	<b>1,99 ± 0,17</b>
<b>Açúcares solúveis</b>	<b>7,93 ± 2,11</b>
<b>Lipídios totais</b>	<b>20,82 ± 1,60</b>
<b>Fibras solúveis</b>	<b>2,75 ± 0,16</b>
<b>Fibras insolúveis</b>	<b>68,49 ± 1,21</b>
<b>Fibras totais</b>	<b>71,22 ± 1,22</b>
<b>Polifenóis</b>	
<b>Polifenóis extraíveis</b>	<b>1,50 ± 0,05</b>
<b>Taninos hidrolizáveis</b>	<b>1,59 ± 0,18</b>
<b>Taninos condensados</b>	<b>1,24 ± 0,14</b>

Pesquisas envolvendo humanos têm demonstrado resultados bem promissores quanto á ingestão de açaí. Foi observado que, pessoas que fizeram a ingestão de açaí na forma de suco ou na forma de polpa, apresentaram uma redução da peroxidação lipídica no soro e aumento da capacidade antioxidante do plasma (Jensen, 2008). Em outro estudo, os participantes apresentarem uma redução da glicemia de jejum, dos níveis de insulina e dos níveis de LDL e HDL (Udani *et al.*, 2011).

### **1.9.2 Efeitos antioxidantes do Açaí**

Estudo realizado por Spada (2009) utilizando células de córtex, hipocampo e cerebelo de ratos submetidos ao estresse oxidativo, mostrou que o pré-tratamento com polpa de açaí, foi capaz de retornar a níveis normais marcadores de estresse oxidativo como TBARS e proteínas carboniladas, assim como atividade de enzimas de detoxificação como Superóxido dismutase e Catalase. Essa atuação está relacionada a uma possível propriedade de remoção direta de radicais livres, uma vez que o tratamento apenas com açaí, não seguido de situação de estresse oxidativo, não alterou os marcadores avaliados.

Foi demonstrado que moscas tipo selvagem quando expostas á estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, e em seguida suplementadas com açaí, apresentaram aumento no tempo de vida médio aproximadamente 3 vezes superior quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento com açaí aumentou o tempo de vida em moscas mutantes para o gene da p38 MAPK (Mortmer *et al.*, 2012), e aumentou a sobrevivência de moscas tratadas com RNAi para *sod1* (Superóxido dismutase) (Sun *et al.*, 2010; Laslo *et al.*, 2013).

A melhora à condição de estresse oxidativo também pode ser observados em ratos que tiveram suplementação de açaí na dieta. Os resultados mostram a capacidade do açaí em sumprimir a produção de EROs, de aumentar os níveis de mRNA de enzimas  $\gamma$ -glutamyl cisteína sintetase e glutathione peroxidase, além de melhorar o perfil de marcadores de estresse oxidativo como TBARS e proteínas carboniladas (Guerra, 2011).

Já tem sido demonstrado que o tratamento com açaí apresenta também melhorias quanto ao perfil anti-inflamatório. O tratamento com extrato de açaí em células da microgila inibiu a ativação de NF- $\kappa$ B, e diminuiu a expressão das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 (Xie *et al.*, 2012) fator de necrose tumoral, (Shibu *et al.*, 2012), assim causou a redução dos níveis de leucócitos, macrófagos e neutrófilos em camundongos expostos à fumaça. Estes dados foram relacionados com diminuição dos níveis de glutathiona e atividade das enzimas glutathiona peroxidase e mieloperoxidase (enzima marcadora do influxo de neutrófilos) (Moura *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o tratamento com açaí diminuiu a expressão de interleucinas 6 e 8 a níveis de mRNA e proteínas induzidas pelo estresse causado por glicose (Noratto *et al.*, 2011)

Outro modelo já bem utilizado para estudos *in vivo* é o *C. elegans*. Foi demonstrado que a suplementação de açaí na alimentação de vermes aumentou a resistência ao estresse oxidativo. Este aumento da resistência foi correlacionada com diminuição da produção de EROs, prevenção dos níveis de sulfidrilas e prevenção da ativação do gene de detoxificação *gcs-1* (Bonomo *et al.*, 2014).

## 1.10 Justificativa

Em *C. elegans* já foi demonstrado que a exposição crônica à AAM gera diversos efeitos tóxicos como diminuição da progênie, da longevidade, a redução corporal dos vermes assim como e ativação da enzima de detoxificação *gst-4*. Entretanto, ainda não foram demonstrados quais os efeitos da exposição aguda à AAM em *C. elegans*. Sabendo do potencial tóxico da AAM e das propriedades antioxidantes do Açaí, o *C. elegans* foi utilizado neste projeto para avaliar o efeito da exposição aguda da AAM e do possível efeito protetor do Extrato Aquoso de Açaí (EAA), como uma possível alternativa de combate ou prevenção dos efeitos tóxicos induzidos pela AAM.

## **2. Objetivos**

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso de Açaí (EAA) contra a toxicidade promovida pela exposição aguda à acrilamida em no *C. elegans*

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento agudo da AAM sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans*
- Avaliar o efeito protetor do açaí sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans* exposto ao tratamento agudo com AAM.
- Avaliar o papel de SKN-1 e DAF-16 na proteção induzida pelo açaí em animais transgênicos *gcs-1::GFP* expostos ao tratamento agudo com AAM.

# **3. Metodologia**

### **3.1 Linhagens**

As linhagens utilizadas neste projeto (Tabela 3) foram cedidas pelo *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>) ou pelo Dr. T. Keith Blackwell do Joslin Diabetes Center, Boston, EUA

### **3.2 Manutenção das cepas**

As linhagens foram mantidas congeladas até o momento de uso. O congelamento é feito transferindo animais L1 para uma solução 1:1 de M9 (22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 42 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 85,5 mM NaCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ) 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 no freezer – 80°C. Quando necessário, as linhagens utilizadas foram descongeladas e transferidas para o meio NGM (Nematode Growth Medium) (Brenner, 1974) semeados com *E. coli* OP50 como alimento e incubada a 20°C, o que permitiu o desenvolvimento do ciclo de vida normal. A manutenção das linhagens foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas à medida que a camada de bactéria ficava escassa.

### **3.3 Sincronização cronológica do *C. elegans***

A sincronização das cepas foi feita através da lise alcalina ou por ovoposição. A lise alcalina se baseia no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% de hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Os embriões resistentes a este tratamento foram coletados e colocados em meio líquido M9 de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 contendo ou não EAA 100mg/ml por 36h a 20°C. A ovoposição consiste em

**Tabela 3. Linhagens de *C. elegans* utilizadas neste trabalho**

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Descrição Geral</b>
<b>N2</b>	-	Tipo Selvagem
<b>CF1038</b>	<i>daf-16(mu86)</i>	Mutante de deleção para o gene <i>daf-16</i>
<b>CL2166</b>	dvls19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]	Animal transgênico carregando o gene da proteína GFP sob controle do promotor do gene <i>gst-4</i>
<b>CF1553</b>	muls84[pAD76( <i>sod-3::GFP</i> )]	Animal transgênico carregando o gene da proteína GFP sob controle do promotor do gene <i>sod-3</i>
<b>LD1171</b>	ldls3 [gcs-1p::GFP + pRF4( <i>rol-6(su1006)</i> )]	Animal transgênico carregando o gene da proteína GFP sob controle do promotor do gene <i>gcs-1</i>
<b>TJ356</b>	zls356[pGP30( <i>DAF-16::GFP</i> )+pRF4( <i>rol-6</i> )	Animal transgênico com o gene da proteína GFP integrada ao gene de <i>daf-16</i>

colocar hermafroditas grávidos nas placas de NGM e deixados por 6 a 8 horas. Após esse tempo, os animais foram retirados deixando somente os ovos colocados por estes animais.

### **3.4 Preparo das Placas contendo Extrato Aquoso de Açáí (EAA)**

Neste projeto foi utilizado extrato de açáí liofilizado cedido pela empresa Liotécnica Alimentos LTDA (Embu, SP). O tratamento do *C. elegans* com açáí foi feito de acordo com Bonomo *et al.* (2014) com o extrato na concentração de 100 mg/ml. Para tal, 2 g de extrato foram ressuspensos com 20 ml de solução basal e esterilizados por filtração, obtendo-se no final 5 ml de extrato líquido. A este volume foi acrescido 50 µl de solução estéril de 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Essas misturas foram utilizadas para ressuspender o *pellet* de *E. coli* OP50 OD 1 que foi então semeado em placas contendo meio NGM. Para as placas de controle do tratamento, foi utilizada apenas *pellet* de *E. coli* OP50 OD 1, ressuspensa em quantidade proporcional de solução basal e MgSO<sub>4</sub>. Em caso das placas não serem usadas imediatamente, elas foram mantidas a 4°C por no máximo 1 semana.

### **3.5 Avaliação do efeito do tratamento agudo da AAM e da EAA sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans***

A primeira etapa deste projeto foi padronizar as condições em que os efeitos tóxicos da exposição aguda à AAM pudessem ser observados no *C. elegans*. Para isso, nós expusemos os animais em diferentes tempos e concentrações de AAM (Sigma Aldrich) a fim de estabelecer um menor tempo e uma menor concentração de exposição. Nós avaliamos os parâmetros progênie, tamanho corporal, longevidade, produção de EROs e expressão de genes de detoxificação. Após as padronizações estabelecidas, avaliamos o

efeito do extrato aquoso de açaí (EAA) frente os efeitos tóxicos induzidos pela AAM.

### **3.5.1 Análise do Tamanho Corporal**

Animais tipo selvagem em estágio larval L1 foram incubados por 36 a 38 horas a 20°C em condições normais em placas NGM semeadas com *E. coli* OP50. Em seguida os animais foram expostos às concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mM de acrilamida em meio líquido M9 por 3, 6 e 9 horas. Após o tempo de exposição, os animais foram retirados do estresse e colocados novamente em placas NGM semeadas com *E.coli*. Após 15 horas, cerca de 20 animais por grupo foram colocados em lâmina contendo 1% de agarose e anestesiados com 0,5 mM azida sódica. Em seguida os animais foram fotografados no microscópio Axio Imager Z2 (Zeiss, NY, USA) e o tamanho corporal de cada animal foi avaliado individualmente utilizando software Axion Vision 4.8.

Para avaliação do efeito do EAA, animais em estágio larval L1 foram crescidos por 36 a 38 horas a 20°C em condições normais em placas NGM semeadas com *E. coli* contendo ou não EAA 100 mg/ml. Em seguida, os grupos controle e tratados foram expostos ou não a 10 mM de AAM por 3 horas em meio líquido M9. Em seguida, as análises foram realizadas como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **3.5.2 Análise da Progenie**

Para determinar o número total de progênie, animais tipo selvagem em estágio larval L1 foram incubados por 36 a 38 horas em condições normais em placas NGM semeadas com *E. coli* a 20°C. Em seguida os animais foram expostos às concentrações de 10 mM AAM em meio líquido M9 por 3 e 6 horas. Após o tempo de exposição, os animais foram retirados do estresse e colocados novamente em placas NGM semeadas com *E. coli*. Dez animais de cada grupo foram colocados em placas individuais e durante o tempo de

ovoposição, os animais foram transferidos a cada 24 horas para novas placas e o número de progênie de cada placa foi contado após 2 dias. O número total de animais foi calculado e dividido pelo número de animais. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo

### **3.5.3 Análise da Sobrevivência**

Animais tipo selvagem foram incubados por 36 a 38 horas em condições normais em placas NGM semeadas com *E. coli* a 20°C e expostos á 10 mM AAM por 3, 6 e 9 horas em meio líquido M9. Após o tempo de exposição, os animais foram colocados em placas de NGM contendo 10 mM FUdR (5-Fluoro-2'-deoxyuridine) a 25°C. FUdR é normalmente fosforilado nas células em fluorodeoxiuridilato, um inibidor competitivo da enzima timidilato sintetase que converte deoxiuridilato em timidilato. Desta forma a replicação do DNA é rapidamente interrompida uma vez esta é a única via de síntese de timidilato nas células. Uma vez que as únicas células que se dividem em animais adultos são as células germinativas da gônada feminina, animais adultos mantidos em placas contendo FUdR não produzem nenhuma progênie e quaisquer embriões produzidos nesta condição não se desenvolvem. A sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente longevidade até que todos os animais de todos os grupos se encontrassem mortos.

Para avaliação do efeito do EAA, animais tipo selvagem em estágio larval L1 foram crescidos por 36 a 38 horas a 20°C em condições normais em placas NGM semeados com *E.coli* contendo ou não EAA 100 mg/ml. Em seguida, os grupos controle e tratados foram expostos ou não á 10 mM AAM por 6 horas em meio líquido M9. Após o tempo de exposição, os animais foram retirados do estresse e colocados novamente em meio NGM com FUdR à 25°C semeados com *E.coli* contendo ou não tratamento com EAA. Os ensaios de longevidade foram iniciados com 90 animais em cada grupo, sendo divididos em 3 placas contendo 30 animais em cada. A sobrevivência dos vermes foi verificada diariamente. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Log Rank (Mantel-Cox) considerando  $p \leq 0,05$  estatisticamente significativo.

### 3.5.4 Análise da produção de EROs

A produção de EROS foi mensurada utilizando a sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Animais tipo selvagem foram incubados por 36 a 38 horas a 20°C e expostos a diferentes concentrações variando de 0,1; 1 a 10 mM AAM em PBS por 3 horas de exposição, e 1 mM de Peróxido de Hidrogênio como controle positivo. Em seguida os animais foram lavados duas vezes com PBS e incubados em 50 uM de H<sub>2</sub>DCFDA por 1 hora. Após o tempo de exposição, 30 animais de cada grupo foram transferidos para os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 200 ul de PBS em triplicata. A quantificação de fluorescência foi realizada no leitor de placas X3™ multilabel VICTOR (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), utilizando excitação a 485 nm e emissão a 535 nm.

Para avaliação do efeito do EAA, animais tipo selvagem ou animais mutantes para o gene *daf-16*, em estágio larval L1 foram crescidos por 36 a 38 horas a 20°C em meio NGM contendo ou não EAA 100 mg/ml. Em seguida análises foram realizadas como descrito anteriormente. Os Experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 4.5.5 Análise da Expressão de genes de detoxificação.

Animais transgênicos *gst-4::GFP* em estágio larval L1 foram incubados por 36 a 38 horas a 20°C em meio NGM contendo *E.coli* como fonte de alimento. Em seguida os animais foram expostos às concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mM AAM em meio líquido M9 por 3, 6 e 9 horas. Após o tempo de exposição, os animais foram retirados do estresse e colocados novamente em meio NGM semeados com *E.coli* por 1 hora como tempo de recuperação. Em seguida, 20 animais de cada grupo foram colocados em uma lâmina contendo 1% agarose e anestesiados com 0,5 mM azida sódica. Fotomicrografias de fluorescência foram tiradas no microscópio Axio Imager Z2 (Zeiss, NY, USA) e os níveis de fluorescência avaliados utilizando o software NIH Image J. Para o gene de *gst-4::GFP* foi utilizada a concentração de 1 mM AAM e para os

genes de *gcs-1::GFP* e *sod-3::GFP* foi utilizada a concentração de 10 mM AAM por 3 horas.

Após estipulada a concentração e o tempo de exposição à AAM para cada linhagem, animais transgênicos *gst-4::GFP*, *gcs-1::GFP* e *sod-3::GFP* em estágio larval L1 foram crescidos por 36 a 38 horas em meio NGM semeados ou não com EAA 100 mg/ml. Em seguida análises foram realizadas como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **3.5.6. Avaliação da Localização nuclear de *DAF-16::GFP***

Para analisar o envolvimento do fator de transcrição DAF-16 na resposta ao estresse, animais transgênicos *DAF-16::GFP* foram incubados por 36 a 38 horas em condições normais ou contendo EAA 100 mg/ml. Os animais foram expostos à 10 mM AAM por 3 horas. 20 animais de cada grupo foram colocados em lâminas cobertas com 1% agarose, anestesados com 0,5 mM azida sódica e foram fotografados com microscópio de fluorescência microscópio Axio Imager Z2 (Zeiss, NY, USA). A localização nuclear de *DAF-16::GFP* foi classificada como citosólica, intermediária ou nuclear. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **3.5.7 Silenciamento de *skn-1* e *daf-16***

Os animais transgênicos *gcs-1::GFP* foram submetidos a *controle(RNAi)*, *skn-1(RNAi)* e *daf-16(RNAi)*. O plasmídeo pL4440 sem nenhum inserto foi usado como controle negativo do RNAi. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* HT115 e a cultura foi então semeada em placas de *petri* com NGM contendo IPTG. Os animais transgênicos em estágio L1 foram incubados por 36 a 38 horas nessas placas contendo ou não EAA 100 mg/ml e depois expostos à 10 mM AAM por 3 horas. Após o tempo de exposição, os

animais foram retirados do estresse e colocados novamente em meio NGM por 1 hora como tempo de recuperação. Em seguida fotomicrografias de fluorescência foram tiradas de aproximadamente 20 animais de cada grupo utilizando o microscópio Zeiss e a fluorescência foi analisada usando o software NIH Image J. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student's, sendo que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Para confirmar redução da expressão de *skn-1*, embriões foram semeados em placas *skn-1(RNAi)*. Na ausência de *skn-1*, os embriões colocados não eclodem, uma vez que este é um gene de efeito materno, essencial para o desenvolvimento embrionário. Para confirmação da redução de *daf-16*, animais transgênicos *DAF-16::GFP* foram semeados em placas *daf-16(RNAi)* e a redução da fluorescência foi avaliada.

# 4. Resultados

## **4.1 Avaliação do efeito do tratamento agudo da AAM sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans***

### **4.1.1 Análise do Tamanho corporal**

Uma vez que já foi demonstrado que animais expostos à AAM de maneira crônica apresentaram redução do tamanho corporal (Hasegawa *et al.*, 2004), nós avaliamos se a exposição aguda à AAM também seria capaz de alterar o tamanho corporal do *C. elegans*. Para realizar este experimento, os animais tipos selvagem foram crescidos até o estágio larval L3 e em seguida expostos à 0,1; 1; 10 e 100 mM de AAM por 3, 6 ou 9 horas.

O tratamento do *C. elegans* com 0,1 mM e 1 mM AAM nos tempos testados não afetou o desenvolvimento uma vez que o tamanho dos animais não foi alterado (Figura 5B). Os animais tratados com 10 mM AAM apresentaram redução significativa no tamanho corporal nos tempos de 3 e 9 horas, mas não onde não foi observada redução no tempo 6 horas (Figura 5B). O tamanho corporal dos animais tratados com 100 mM AAM foi significativamente reduzido com 3 e 6 horas (Figura 5A e 5B). Não foi possível realizar as medições com 9 horas, pois esta concentração foi extremamente tóxica onde todos os animais estavam mortos. Estes dados sugerem que a exposição aguda à AAM no *C. elegans* é capaz de prejudicar o desenvolvimento dos animais.

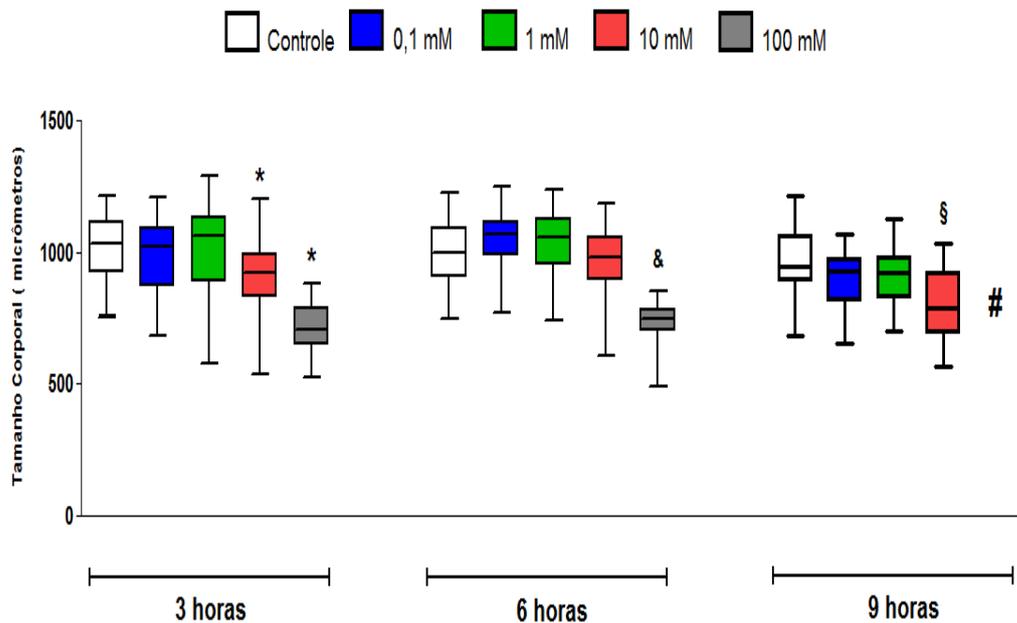
### **4.1.2 Análise da Progênie**

O próximo parâmetro avaliado quanto à exposição aguda do *C. elegans* à AAM foi a reprodução dos animais tipo selvagem foram expostos à 10 mM de AAM por 3 e 6 horas e o número total de progênie foi avaliada. De acordo com a Figura 6, não foi observada redução do número de progênie em animais expostos à AAM por 3 horas, entretanto, existe redução significativa do número total quando os animais são expostos pelo tempo de 6 horas. O número médio

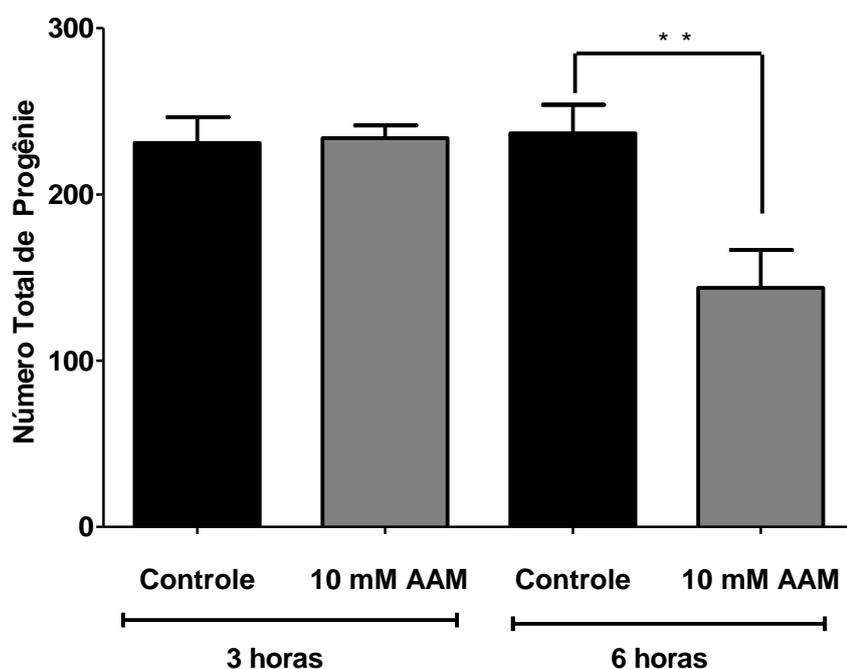
A)



B)



**Figura 5. Efeito da exposição aguda à AAM sobre o tamanho corporal do *C. elegans*.** A) Figura representativa do tamanho corporal dos animais em estágio de adulto-1-dia expostos à AAM pelo tempo de 3 horas. B) Animais foram crescidos por 36 horas e expostos ou não à diferentes concentrações de AAM por diferentes tempos. A barra de erros representa o SEM. (#) Indica que todos animais se encontravam mortos no tempo de 9 horas expostos a 100 mM AAM. (\*), (&) e (\$) indicam resultados para  $p < 0,05$  em relação ao controle nos respectivos tempos de 3, 6 e 9 horas de exposição através do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.



**Figura 6. Efeito da exposição aguda à AAM sobre a reprodução do *C. elegans*.** Animais tipo selvagem foram incubados por 36 a 38 horas à 20°C e expostos ou não á AAM por 3 e 6 horas. O número de embriões colocados foi avaliado por 10 animais de cada grupo. A barra de erros representa o SEM. (\*\*) indica resultado para  $p < 0,005$  em relação ao controle através do teste t de Student's. Experimento realizado em duplicata.

de embriões no grupo controle foi de  $236,8 \pm 76,8$  enquanto que no grupo tratado foi de  $143,9 \pm 22,72$ , o que corresponde à uma redução de 39,18 %. Esses resultados sugerem que a exposição aguda à AAM interfere no sistema reprodutor do *C. elegans*

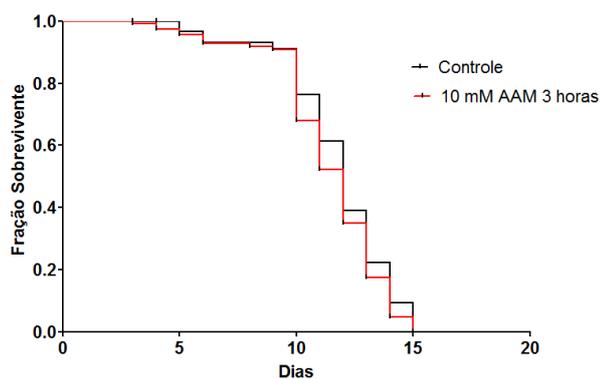
#### **4.1.3 Análise de Sobrevivência**

A seguir, nós verificamos se a exposição aguda à AAM teria algum efeito sobre a longevidade do *C. elegans*. Os animais foram incubados por 36 a 38 horas e expostos por 3, 6 ou 9 h com à 10 mM AAM. Como observado na figura 7 e na tabela 4, os animais expostos à AAM por 3 horas, não apresentaram redução do tempo de vida médio (11,42 dias) quando comparado ao grupo controle (11,64 dias). Para os animais expostos por 6 horas, já foi observado uma redução de 11,60 % do tempo de vida médio onde o tempo de vida médio dos animais do grupo controle foi de 12,08 dias e do grupo tratado com AAM foi de 10,66 dias. A redução do tempo de vida também pode ser observada no grupo de animais expostos pelo tempo de 9 horas, sendo que o tempo de vida médio do grupo controle foi de 11,7 dias e o do grupo tratado com 10 mM AAM foi de 9,96 dias, o que corresponde a uma redução de 10,02%. Esses dados sugerem que a exposição aguda à AAM gera toxicidade afetando o tempo de vida do *C. elegans*.

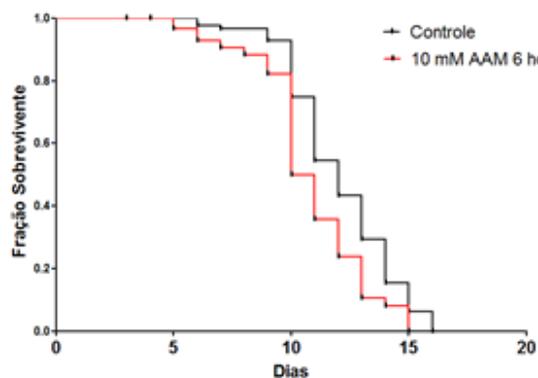
#### **4.1.4 Análise da Produção de EROs**

Para avaliar os efeitos da exposição aguda à AAM no estado redox do *C. elegans* nós avaliamos a produção de EROs nos animais expostos à AAM, uma vez que já é bem conhecido que as EROs podem causar danos à moléculas importantes para a homeostase dos organismos. Para tal objetivo, animais tipo selvagem foram expostos por 3 horas à 0,1, 1 e 10 mM AAM. Os animais foram depois expostos por 1 hora à 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA para avaliar os níveis de EROs.

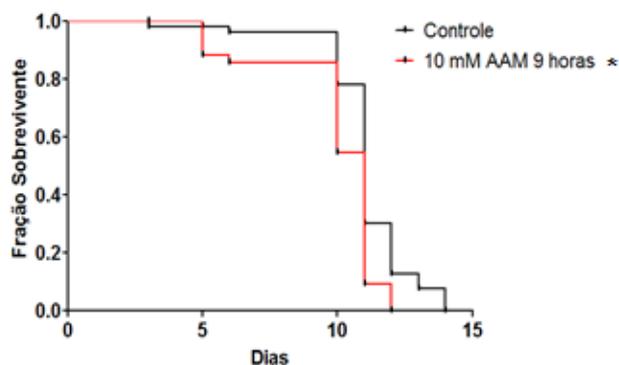
A)



B)



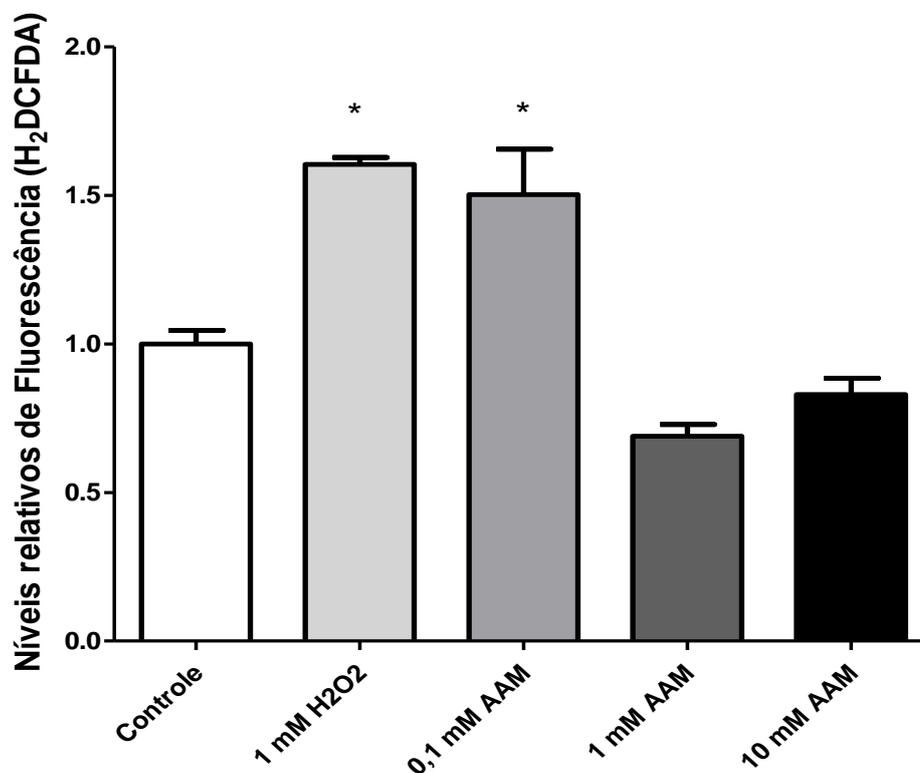
C)



**Figura 7. Efeito da exposição aguda à AAM sobre a longevidade do *C. elegans*.** Animais tipo selvagem foram crescidos por 36 horas e expostos por 3 (A), 6 (B) ou 9 horas (C) com 10 mM AAM. A longevidade foi avaliada diariamente. (\*) indica resultado significativamente diferente do grupo controle. Análise estatística pelo teste de Log Rank onde foi considerado  $p < 0,05$  estatisticamente significativo.

**Tabela 4. Longevidade de *C. elegans* expostos á diferentes tempos em AAM**

Grupos	Sobrevivência Média (Dias)	Sobrevivência Máxima (Dias)	Porcentagem de Redução da Sobrevivência Média relativa ao Controle	Log Rank <i>p value</i>	Número de Experimentos
Controle 3 h	11,64	15	-		2
10 mM 3 h	11,42	15	-	0,2621	2
Controle 6 h	12,08	16	-		2
10 mM 6 h	10,66	15	- 11,60	0,0006	2
Controle 9 h	11,07	14	-		1
10 mM 9 h	9,96	12	- 10,02	0,0028	1



**Figura 8. Efeito da exposição aguda do *C. elegans* à AAM na Produção de EROs .** Animais tipo selvagem foram crescidos por 36 horas e expostos à diferentes concentrações de AAM por 3 horas e depois incubados com sonda H<sub>2</sub>DCFDA por 1 hora. Em seguida os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*) indica resultado para  $p < 0,05$  em relação ao controle através do teste t de Student's. Experimento realizado em duplicata.

Nossos resultados mostram que animais expostos à 0,1 mM AAM produzem mais EROs. Por outro lado, animais tratados com 1 e 10 mM AAM por 3 horas não mostraram aumento na produção de EROs (Figura 8) Diante desses dados, a concentração de 0,1 mM AAM por 3 horas de exposição foi capaz de causar aumento na produção de EROs em *C. elegans*.

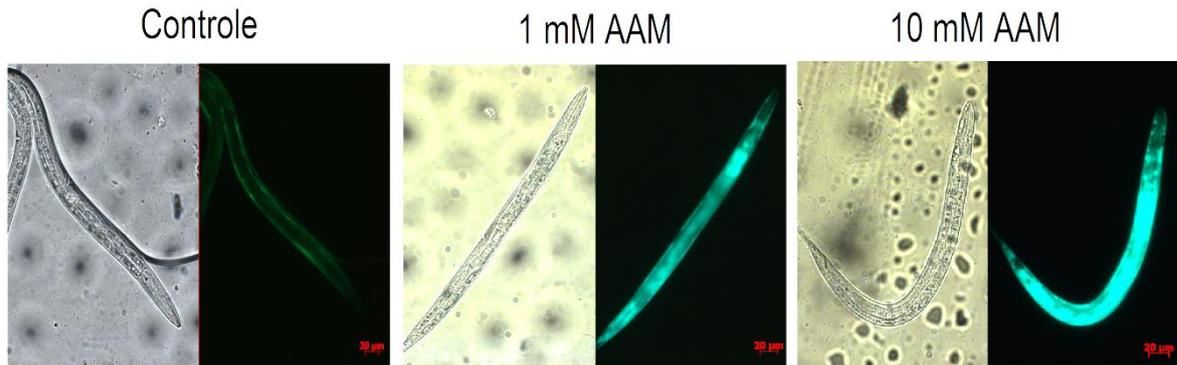
#### 4.1.5 Análise da expressão de genes de detoxificação

Nossos resultados obtidos sugerem que a exposição aguda à AAM no *C. elegans* promove toxicidade, e que essa toxicidade possa estar relacionada com aumento do estresse oxidativo. Desse modo, nós também investigamos a ativação de genes de detoxificação no *C. elegans* submetidos exposição aguda à AAM. Inicialmente nós avaliamos os níveis de fluorescência de animais expressando *gst-4::GFP* expostos a 0,1, 1, 10 e 100 mM AAM por 3, 6 ou 9 horas

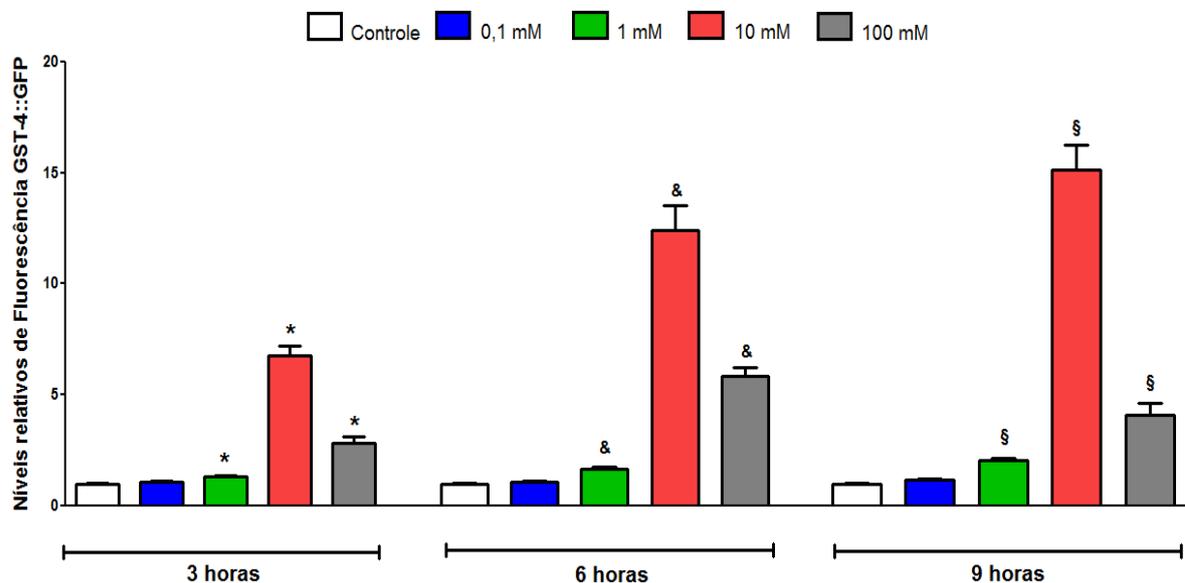
Nós observamos que para todos os tempos de exposição analisados, os animais *gst-4::GFP* expostos à concentrações de 1, 10 e 100 mM apresentaram fluorescência significativamente superior em relação ao grupo controle (Figura 9). Observamos também que os grupos expostos com 10 mM AAM apresentam a maior indução de *gst-4::GFP* todos os tempos analisados. Outra tendência observada em todos os tempos analisados foi que os grupos expostos com 100 mM AAM apresentam a menor indução de *gst-4::GFP* em relação ao grupo exposto com 10 mM AAM. A partir desses dados nós decidimos utilizar a concentração de 1 mM AAM pelo tempo de 3 horas de exposição. Entretanto, para realizarmos nossas análises com outros genes (*gcs-1::GFP* e *sod-3::GFP*), utilizamos a concentração de 10 mM por 3 horas, pois foi a que apresentou melhores resultados de indução de GFP.

Para a análise dos genes *gcs-1::GFP* e *sod-3::GFP*, nós testamos apenas a concentração de 10 mM AMM por 3 horas (Figure 10). Nós observamos que a expressão de *gcs-1::GFP* foi significativamente maior com o tratamento de 10 mM AMM (Figure 10A). Entretanto, a expressão de *sod-3::GFP* não foi alterada (Figura 10B).

A)

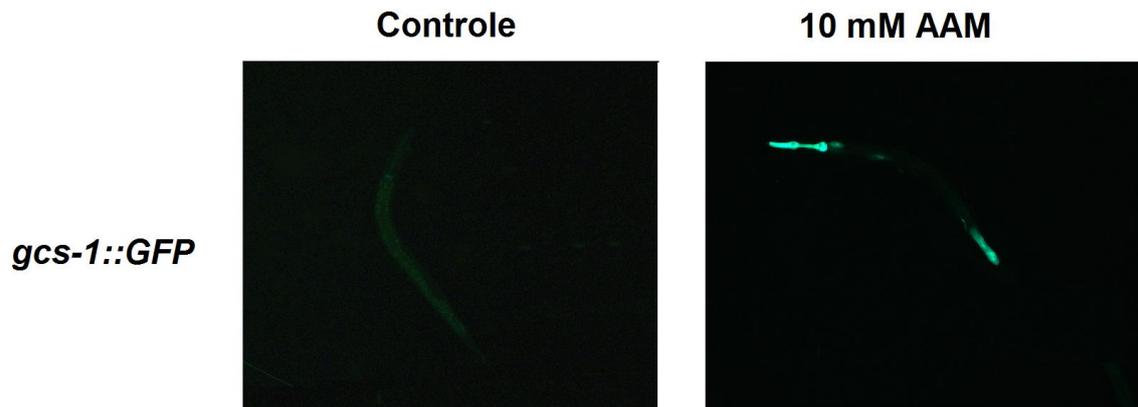


B)

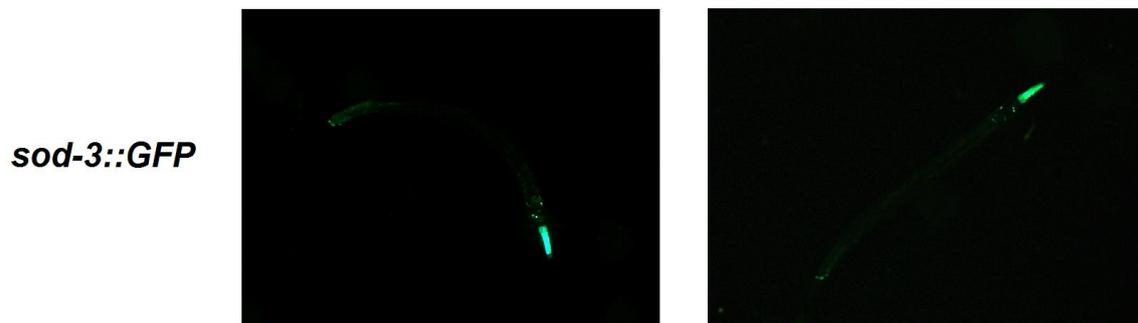


**Figura 9. Efeito da exposição aguda de *C. elegans* à AAM sobre expressão de gene de detoxificação *gst-4::GFP*.** A) Imagem representativa da indução de *gst-4::GFP* em AAM por 3 horas. B) Animais transgênicos foram crescidos por 36 horas e expostos ou não á diferentes concentrações de AAM por diferentes tempos. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*), (&) e (§) indica resultado para  $p < 0,05$  em relação ao controle no tempo nos respectivos tempos de 3, 6 e 9 horas de exposição através do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.

A)



B)



**Figura 10.** Imagem representativa da ativação de *gcs-1::GFP* e *sod-3::GFP*. Animais transgênicos *gcs-1::GFP* (A) ou *sod-3::GFP* (B) foram crescidos por 36 horas e expostos ou não à 10 mM AAM por 3 horas. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescências foram analisados.

## **4.2 Avaliação do efeito protetor do açaí sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans* exposto tratamento agudo com AAM.**

O próximo objetivo deste projeto foi de avaliar se o extrato aquoso de açaí (EAA) tem efeito protetor em relação aos efeitos tóxicos da exposição aguda da AAM no *C. elegans*

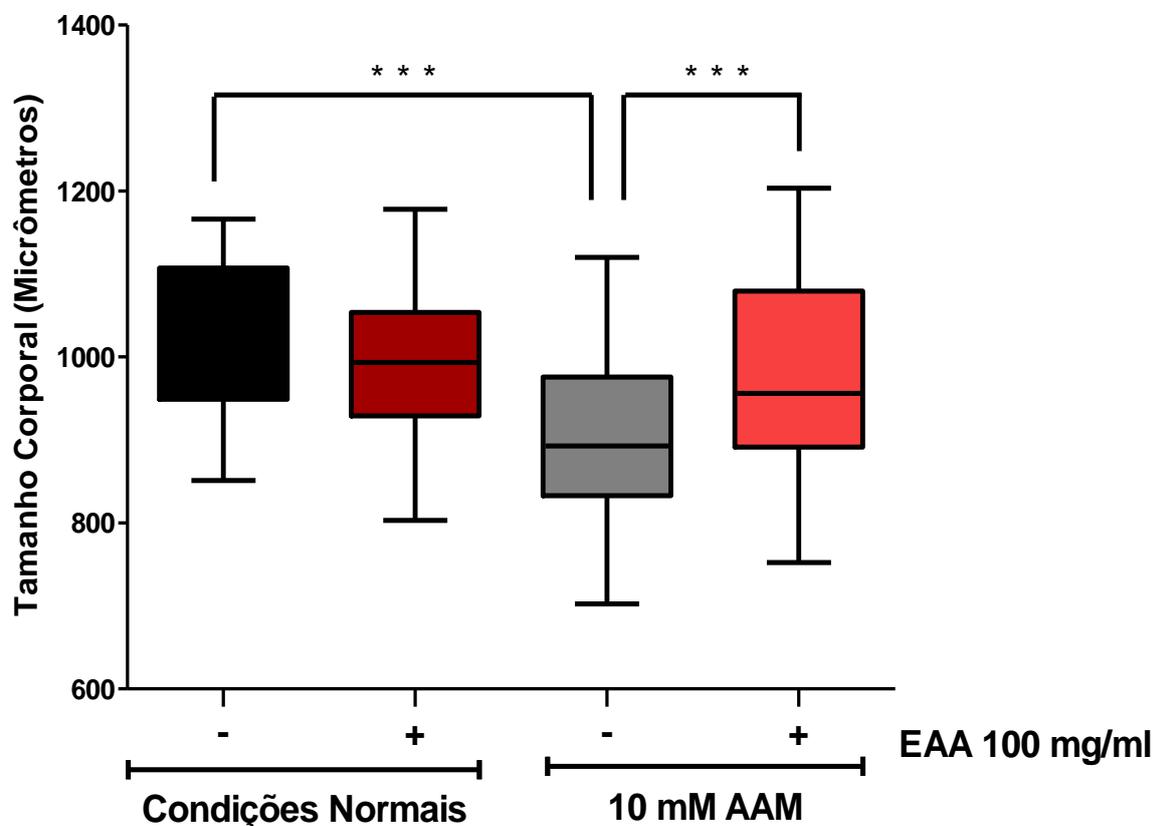
### **4.2.1 Análise do Tamanho Corporal**

Para avaliarmos o efeito do EAA sobre a redução corporal causada pela exposição aguda à AAM, animais tipo selvagem foram tratados ou não com EAA 10mg/ml por 36 horas e então foram expostos à 10 mM AAM por 3 horas.

Foi observado que o pré-tratamento com EAA não causa diminuição do tamanho dos animais, sugerindo não ser tóxico a estes (Figura 11). Os resultados ainda nos mostram que a exposição à AAM causou uma redução significativa do tamanho dos animais de 11,36 % em relação ao grupo controle (Tabela 5). Os animais que receberam o pré- tratamento com EAA e logo em seguida expostos à AAM, apresentaram uma redução de 3,45 % em relação ao grupo controle não sendo estatisticamente diferente do grupo controle. Mais interessante é que este grupo pré-tratado com EAA e depois com AAM apresentou uma recuperação do tamanho corporal de aproximadamente 8 % quando comparado com o grupo exposto somente à AAM (Figura 11). Estes dados apresentados sugerem que o EAA reduz os efeitos tóxicos da AAM sob o desenvolvimento do *C. elegans*.

### **4.2.2 Análise da Progenie**

Nossos dados mostram que a exposição aguda à AAM no *C. elegans* gera toxicidade afetando a o número de embriões colocados pelos animais. Nosso intuito era de avaliar se o EAA teria algum efeito protetor quanto à reprodução dos animais. Entretanto, estes experimentos utilizando animais



**Figura 11. Efeito do pré-tratamento com EAA em *C. elegans* expostos á AMM sobre tamanho corporal.** Animais tipo selvagem foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não á AAM por 3 horas. Fotomicrografias foram tiradas de 20 animais de cada grupo e avaliado o tamanho corporal. (\*) indica resultado para  $p < 0,05$ , (\*\*) indica resultado para  $p < 0,005$  e (\*\*\*) indica resultado para  $p < 0,0001$  através de do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.

**Tabela 5. Efeito do pré- tratamento com EAA em *C. elegans* expostos à AAM sobre o tamanho corporal.**

	Controle	EAA 100mg/ ml	10 mM AAM	EAA 100mg/ml + 10 mM AAM
Tamanho Corporal (um)	1020 ± 90,49	994,30 ± 84,88	904,10 ± 96,73 <sup>a</sup>	984,80 ± 107,60 <sup>b</sup>
Redução corporal %	-	2,5	11,36	3,45

a > Estatisticamente diferente do grupo controle

b > Estatisticamente diferente do grupo 10 mM AAM

**Análise estatística pelo teste t de Student's**

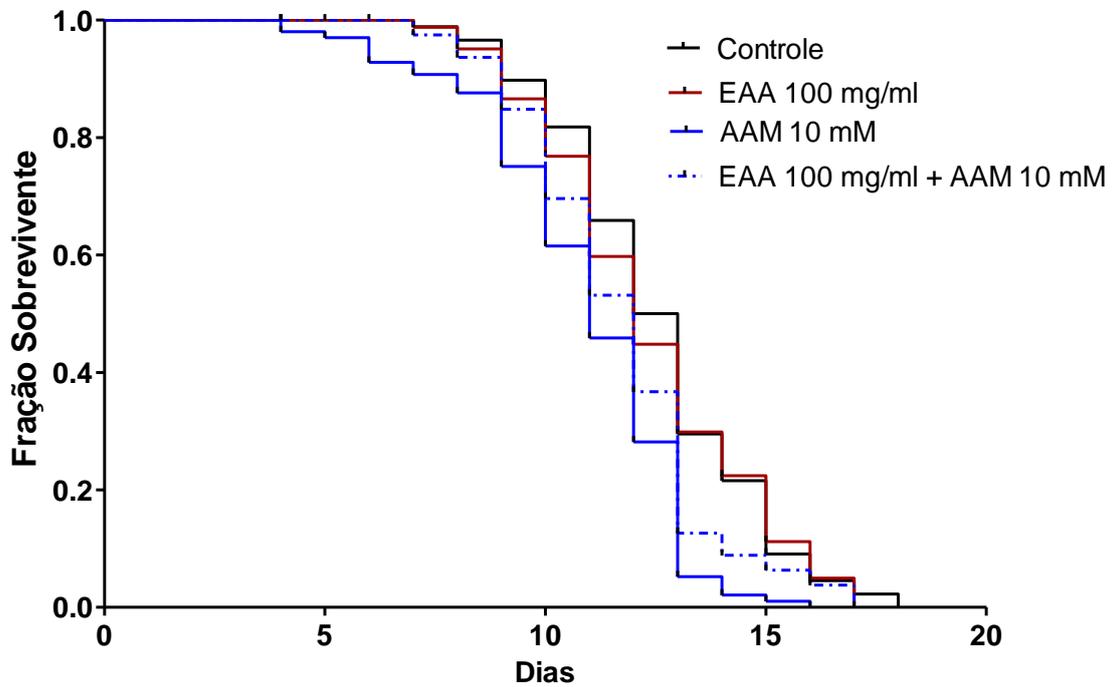
tratados com EAA ainda não foram conduzidos.

### 4.2.3 Análise da Sobrevivência

Uma vez que a exposição aguda dos animais à AAM mostrou que o tempo de vida dos animais expostos é reduzido significativamente a partir do tempo de 6 horas de exposição, nós avaliamos se o tratamento com EAA possui algum efeito protetor no tempo de vida do *C. elegans* sobre exposição aguda à AAM (Figuras 12).

Animais tipo selvagem incubados sob condições normais à 25°C apresentaram tempo de vida médio de 12,48 dias e tempo máximo de 18 dias (Figura 12; Tabela 6). Os animais tratados com EAA não apresentaram diferença significativa sobre o grupo controle, apresentando tempo de vida média de 12,26 dias e tempo máximo de 17 dias (Tabela 6). Entretanto, o grupo de animais expostos à 10 mM AAM apresentou tempo de vida médio de 11 dias, o que representa uma redução de 11,86 % do tempo de vida médio comparado ao grupo controle. Os animais tratados com EAA e depois expostos à AAM, apresentou tempo de vida médio de 11,58 dias e tempo máximo de 17 dias, apresentando uma redução do tempo de vida médio de 7,21 % quando comparado ao grupo controle. Houve também diferença significativa quando comparado ao grupo exposto à AAM, onde foi observado um aumento de 3 % no tempo de vida médio (Figura 12; Tabela 6).

Os dados sugerem que o tratamento com EAA não aumenta o tempo de vida dos animais em condições normais, entretanto, aumenta a longevidade do *C. elegans* exposto à 10 mM AAM por 6 horas.



**Figura 12. Efeito do EAA sobre a longevidade de *C. elegans* expostos à AAM.** Animais tipo selvagem foram incubados por 36 a 38 horas tratados ou não com EAA 100 mg/ml e expostos à 10 mM AAM por 6 horas. O número de animais mortos foi contado diariamente até que todos os animais estivessem mortos.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente diferente pelo teste de Log Rank. Experimento realizado uma vez.

**Tabela 6. Efeito do EAA sobre o do tempo de vida *C. elegans* tipo selvagem expostos à AAM.**

Grupos	Sobrevivência Média (Dias)	Sobrevivência Máxima (Dias)	Porcentagem de Redução da Sobrevivência Média relativa ao Controle	Log Rank <i>p</i> value	n
Controle	12,48	18	-	-	88
EAA 100 mg/ml	12,26	17	- 1,76	0,682	81
AAM 10 mM	11,00	16	- 11,86	$p < 0,0001$ <sup>a</sup>	96
EAA 100 mg/ml + AAM 10 mM	11,58	17	- 7,21	0,032 <sup>a, b</sup>	79

a > Estatisticamente diferente do grupo controle

b > Estatisticamente diferente do grupo AAM

#### **4.2.4 EAA reduz a produção de Espécies Reativas de Oxigênio em *C. elegans* expostos à AAM**

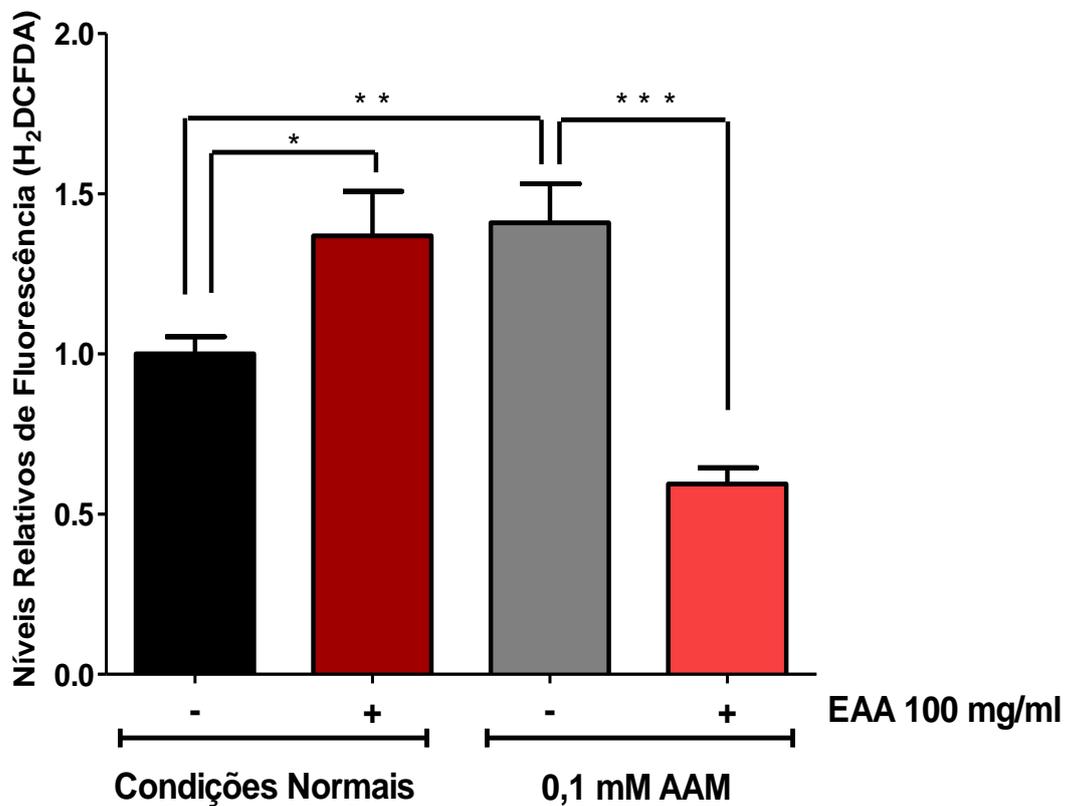
Para investigar se o EAA possui capacidade antioxidante direta sobre a produção de EROs induzida por AAM, nós medimos os níveis de produção emissão de fluorescência da sonda H<sub>2</sub>DCFDA.

Nós observamos que houve aumento significativo dos níveis de fluorescência tanto para o grupo tratado com EAA quanto com o grupo somente expostos à AAM (Figura 13). O tratamento dos animais com EAA foi capaz de reduzir os níveis de EROs em animais expostos à AAM ( $p < 0,0001$ ). Esses dados sugerem que o EAA possa atuar neutralizando os EROs diretamente, diminuindo o estresse oxidativo causado ao organismo.

#### **4.2.5 Análise da Expressão de genes de detoxificação**

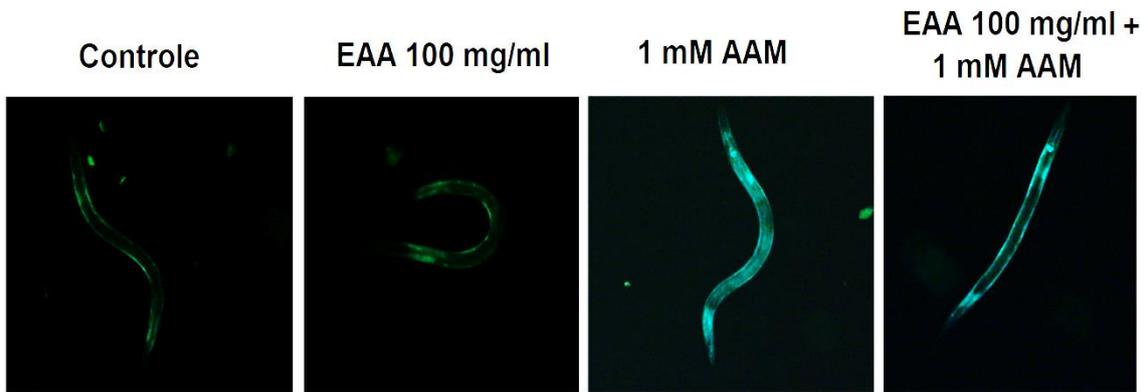
Nós também investigamos o perfil de expressão de genes de detoxificação em animais pré-tratados com EAA e expostos à AAM. Para avaliar o efeito do EAA sobre a expressão gênica de animais transgênicos *gst-4::GFP*, os animais foram pré-tratados com EAA 100 mg/ml por 36 a 38 horas aproximadamente e em seguida expostos à 1 mM de AAM por 3 horas. Nossos resultados mostram o tratamento com EAA reduziu os níveis de expressão de *gst-4::GFP* em condições normais em relação ao grupo controle ( $p < 0,005$ ), e os níveis de expressão aumentaram com a exposição à AAM ( $p < 0,0001$ ) (Figura 14). Entretanto, quando analisamos o grupo previamente tratado com EAA e logo em seguida expostos à AAM, observa-se uma tendência em redução dos níveis de *gst-4::GFP*, sendo estes dados não significativamente estatísticos em relação ao grupo somente tratado com AAM. Esses dados sugerem que o tratamento com açaí atenua o estresse oxidativo intracelular, não sendo necessária uma elevada expressão de *gst-4*.

Outro gene de detoxificação analisado foi o *gcs-1::GFP*, gene que codifica para enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase, enzima de fase limitante da

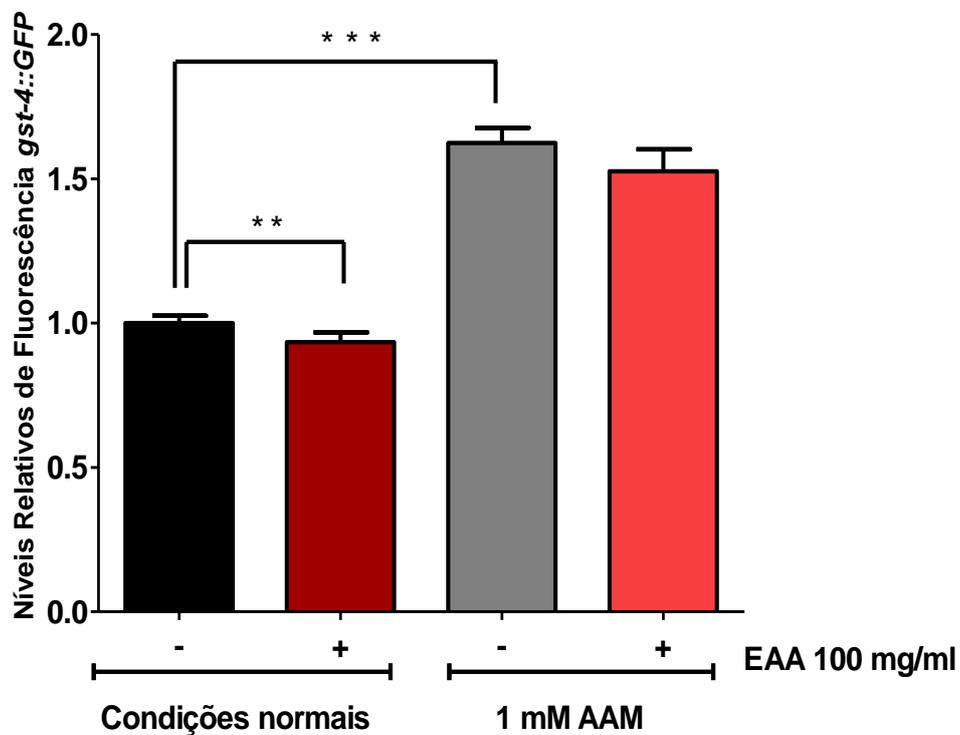


**Figura 13. Efeito do pré-tratamento com EAA sobre a produção de EROs em *C. elegans* expostos à AMM.** Animais tipo selvagem foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não à 0,1 mM AAM por 3 horas. Em seguida os níveis de fluorescência foram analisados. . A barra de erros representa o SEM. (\*) indica resultado para  $p < 0,05$ , (\*\*) indica resultado para  $p < 0,005$  e (\*\*\*) indica resultado para  $p < 0,0001$  através de do teste t de Student's. Experimento foi realizado em triplicata.

A)



B)



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento com EAA em *C. elegans* expostos à AMM sobre a expressão de *gst-4::GFP*. Animais transgênicos foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não à AAM por 3 horas. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*\*) indica resultado para  $p < 0,005$  e (\*\*\*) indica resultado para  $p < 0,0001$  através de do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.

formação de glutathiona. O grupo pré-tratado com EAA apresentou aumento nos níveis de fluorescência em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos também nos mostram que a exposição somente à AAM causou aumento da expressão de *gcs-1::GFP* ( $p < 0,0001$ ) e o pré- tratamento com EAA seguido de exposição à AAM, preveniu significativamente ( $p < 0,005$ ) o aumento da expressão gênica em relação ao grupo somente exposto à AAM (Figura 15).

Para o gene da Superóxido dismutase (*sod-3::GFP*), não observamos nenhum efeito sobre condições normais com tratamento com EAA, e a exposição de 10 mM AAM pelo tempo de 3 horas não foi capaz de ativar a expressão deste gene de detoxificação (Figura 16) pela metodologia utilizada.

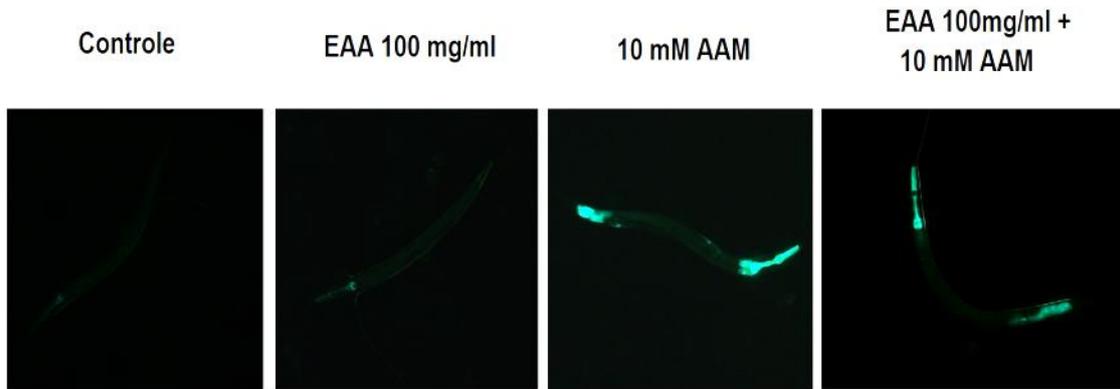
### **4.3 Avaliação do papel de SKN-1 e DAF-16 na proteção induzida pelo açai em animais transgênicos *gcs-1::GFP* expostos ao tratamento agudo com AAM.**

No *C. elegans* as vias de sinalização SKN-1/p38 MAPK e DAF-16/FOXO, são responsáveis pela ativação de genes de Fase II de detoxificação que aumentam a longevidade e a resistência ao estresse oxidativo (Tullet *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2003). Nós avaliamos o envolvimento destes fatores de transcrição em animais tratados com EAA e expostos à AAM.

#### **4.3.1 Envolvimento de DAF-16 na resposta ao estresse agudo por AAM em animais tratados com EAA**

Primeiramente nós avaliamos se DAF-16 estaria envolvido na resposta induzida pelo EAA e AAM. Nós utilizamos os animais transgênicos *DAF-16::GFP* para avaliar se EAA e AAM induzem a localização nuclear deste fator de transcrição. Sozinho, o tratamento com EAA não afeta a localização de *DAF-16::GFP* e o tratamento com AAM aumenta a localização nuclear de *DAF-*

A)



B)

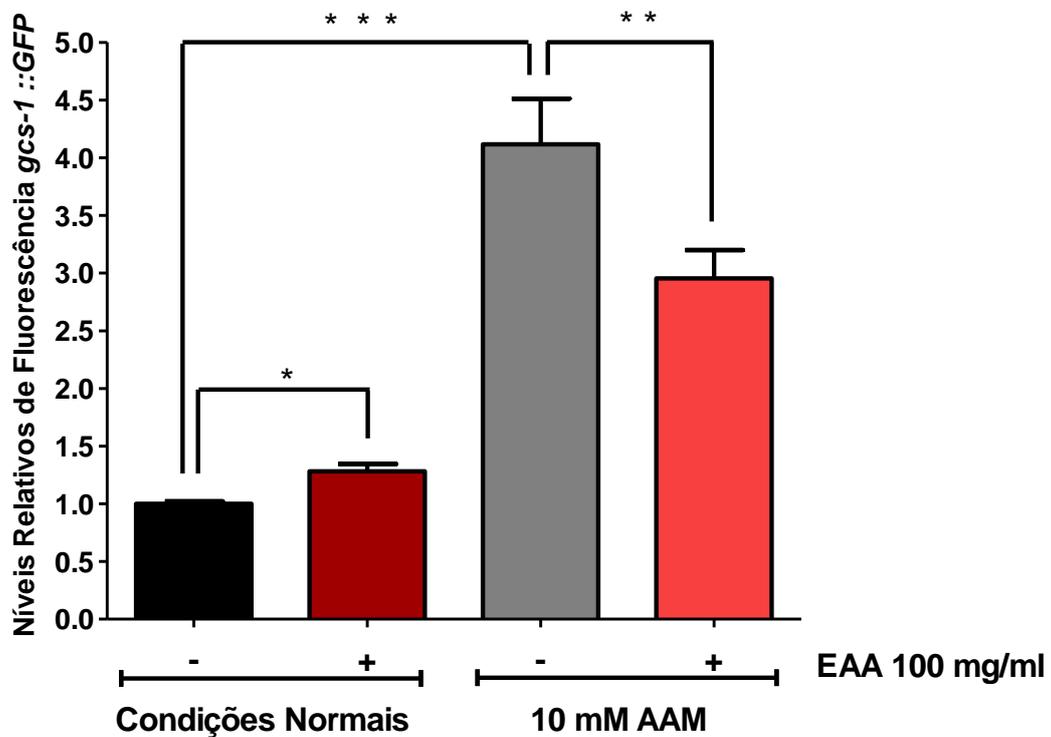
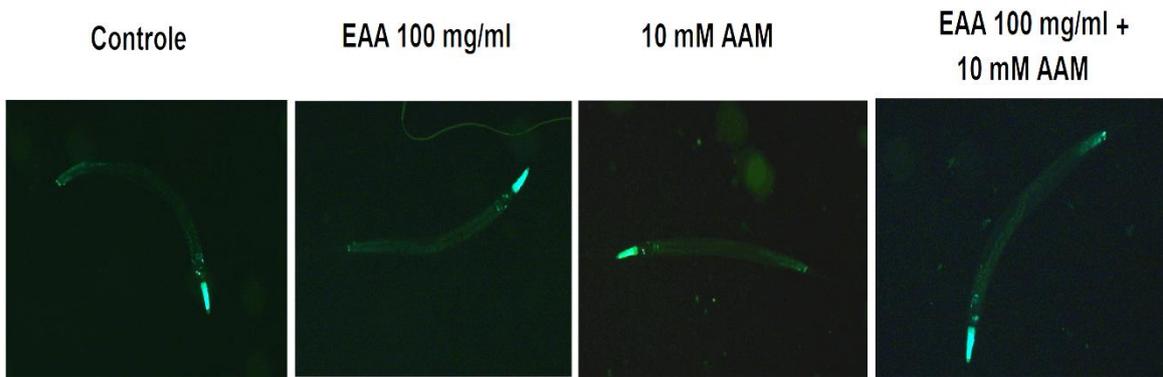


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com EAA em *C. elegans* expostos á AMM sobre a expressão de *gcs-1::GFP*. Animais transgênicos foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não à AAM por 3 horas. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*) indica resultado para  $p < 0,05$ , (\*\*) indica resultado para  $p < 0,005$  e (\*\*\*) indica resultado para  $p < 0,0001$  através de do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.

A)



B)

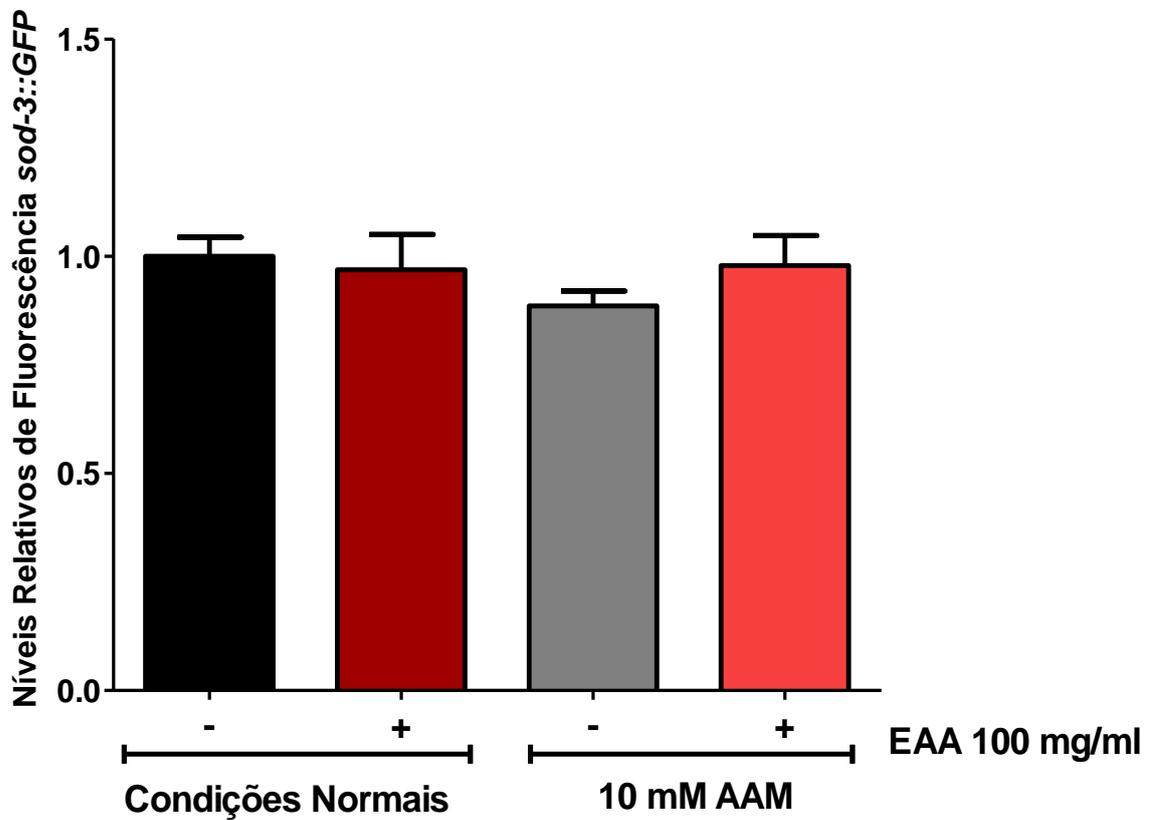


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com EAA em *C. elegans* expostos à AMM sobre a expressão de *sod-3::GFP*. Animais transgênicos foram pré-tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não à AAM por 3 horas. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. Experimento realizado em triplicata.

16::*GFP* (Figura 17). O pré-tratamento com EAA e depois a exposição à AAM não é significativamente diferente do grupo tratado com AAM.

Nós também avaliamos a produção de EROs em animais mutantes para *daf-16*. As mesmas condições para avaliar a produção EROs em animais tipo selvagem foram utilizadas para os mutantes. Observamos na figura 18 que o pré-tratamento com EAA também reduziu a produção de EROs nos mutantes *daf-16* expostos à 0,1 mM AAM assim como observados nos animais tipo selvagem (Figura 13). Estes resultados sugerem que a redução na produção de EROs promovida pelo tratamento com EAA não depende de DAF-16

#### **4.3.2 Avaliação do papel de SKN-1 e DAF-16 na ativação de *gcs-1::GFP* por AAM**

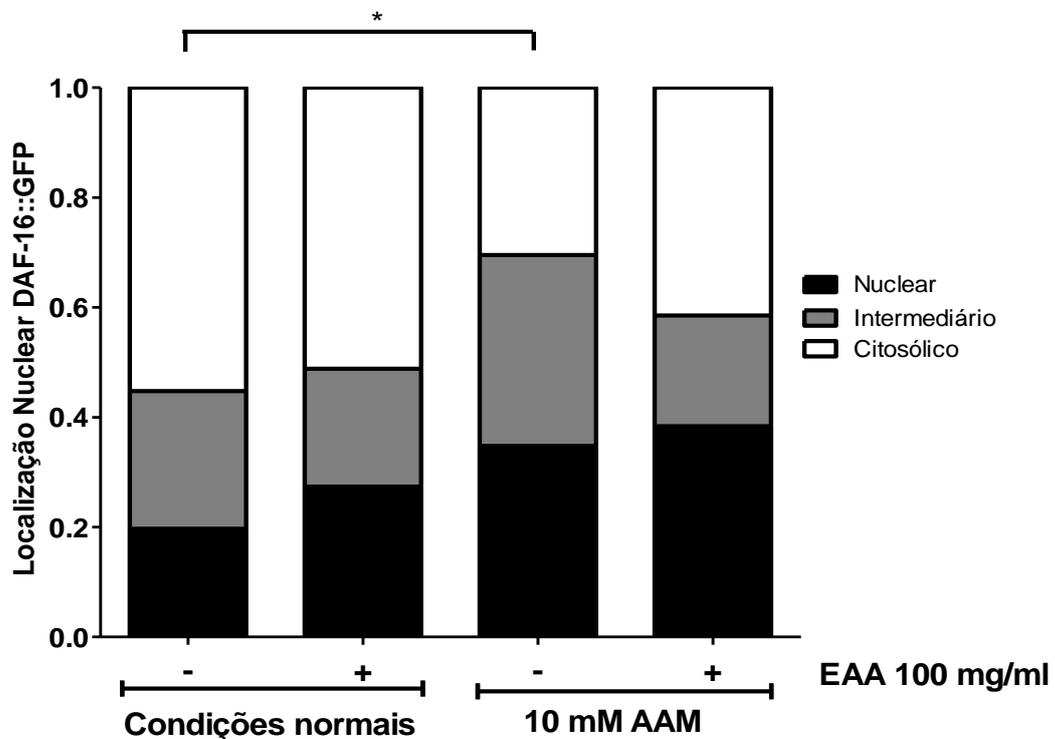
O fator de transcrição SKN-1 possui como alvos os genes *gst-4* e *gcs-1* (Hasegawa *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a ativação de *gst-4* por acrilamida também dependente de SKN-1 (Hasegawa *et al.*, 2008). Entretanto nenhum trabalho ainda realizado demonstrou que a ativação de *gcs-1* por acrilamida se dá dependente deste fator de transcrição. Desse modo, para avaliar o envolvimento deste fator de transcrição na regulação de *gcs-1*, animais transgênicos *gcs-1::GFP* foram incubados em placas para *skn-1(RNAi)*, *daf-16(RNAi)* ou placas *controle(RNAi)*, contendo ou não o tratamento com EAA 100 mg/ml.

Os animais *skn-1(RNAi)* em condições normais, apresentaram redução da expressão de *gcs-1::GFP* em relação aos animais *controle(RNAi)*. Os animais *controle(RNAi)* apresentaram aumento dos níveis de *gcs-1::GFP* quando expostos à AAM e o pré-tratamento com EAA foi capaz de prevenir o aumento da expressão do gene sob condições de estresse (Figura 19). Os animais *skn-1(RNAi)* tratados com AAM apresentaram uma expressão de *gcs-1::GFP* significativamente maior comparado aos animais *skn-1(RNAi)* do grupo controle. Porém os níveis de fluorescência dos animais *skn-1(RNAi)* tratados com AAM é significativamente menor comparado aos animais *controle(RNAi)* do mesmo grupo sugerindo que a expressão de *gcs-1::GFP* induzida por AAM

A)



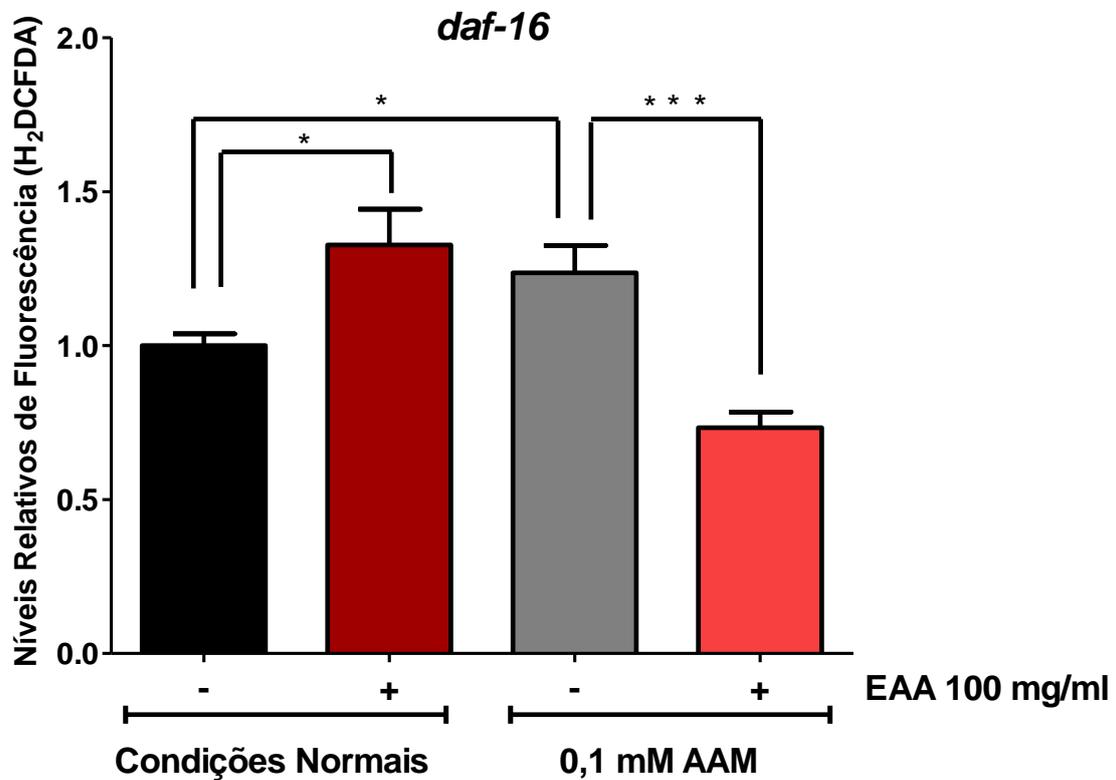
B)



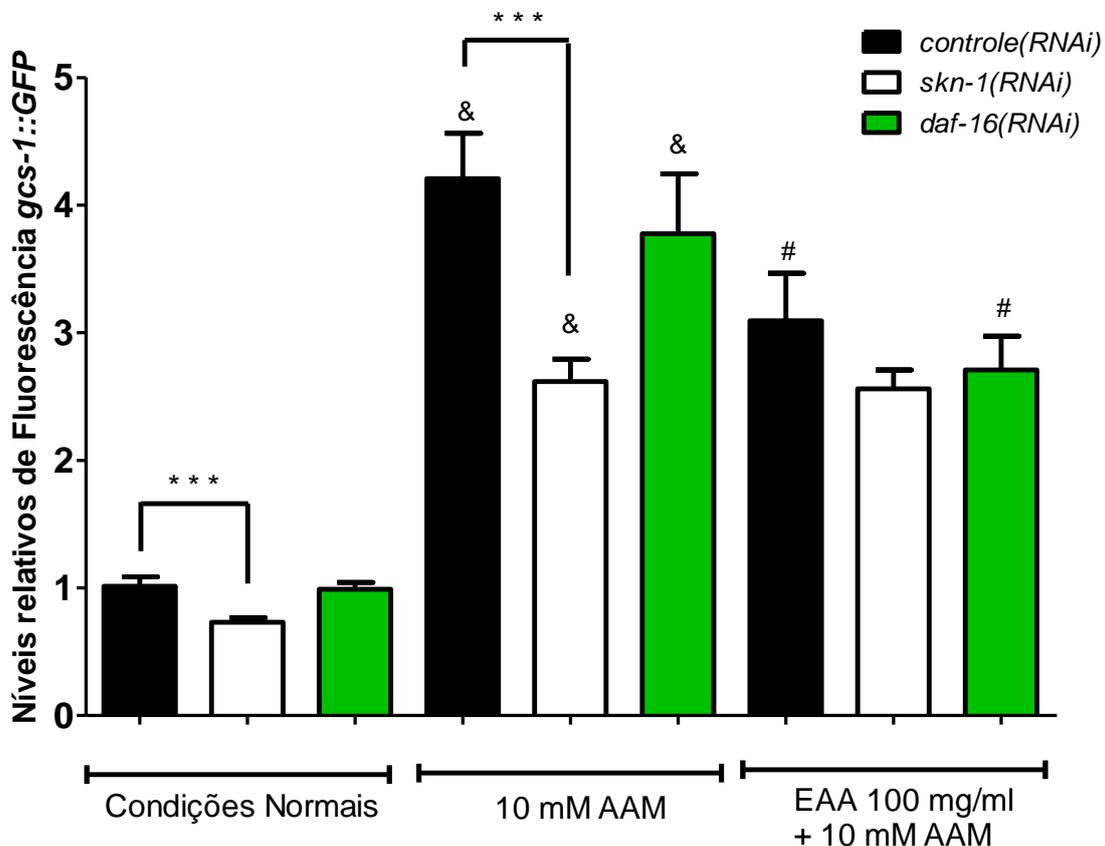
**Figura 17. Avaliação da localização nuclear de *DAF-16::GFP* em animais expostos à acrilamida. A)** Imagem representativa da localização nuclear de *DAF-16::GFP*. **B)** Animais transgênicos foram incubados por 36 a 38 horas em condições normais ou contendo EAA 100 mg/ml. Os animais foram expostos ou não à 10 mM AAM por 3 horas e a localização nuclear foi avaliada. (\*) indica resultado para  $p \leq 0,05$  através de do teste t de Student's. Experimento realizado em triplicata.

depende parcialmente de SKN-1. A expressão de *gcs-1::GFP* nos animais *skn-1(RNAi)* pré-tratados com EAA e depois AAM não foi diferente dos animais *controle(RNAi)* do mesmo grupo sugerindo que SKN-1 não está envolvido na redução da expressão de *gcs-1::GFP* promovida pelo EAA.

Em condições normais, a expressão de *gcs-1::GFP* nos animais *daf-16(RNAi)* não é diferente quando comparado aos animais *controle(RNAi)* do (Figura 19). A expressão de *gcs-1::GFP* nos animais *daf-16(RNAi)* é significativamente maior no grupo tratado com AAM em relação aos animais *daf-16(RNAi)* do grupo controle porém este nível de expressão não é diferente da expressão dos animais *controle(RNAi)* do grupo tratado com AAM. Este resultado sugere que a expressão de *gcs-1::GFP* induzida pela AAM não é dependente de DAF-16. Assim como nos animais *controle(RNAi)*, o pré-tratamento dos animais *daf-16(RNAi)* com EAA reduziu a expressão de *gcs-1::GFP* promovida por AAM sendo que est não é estatisticamente diferente dos níveis de fluorescência observada nos animais *controle(RNAi)* do mesmo grupo.



**Figura 18. Efeito do pré-tratamento com EAA sobre a produção de Eros em animais mutantes *daf-16* expostos à AMM.** Animais foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não á AAM por 3 horas. Em seguida os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*) indica resultado para  $p \leq 0,05$  e (\*\*\*) indica resultado para  $p < 0,0001$  através de do teste t de Student's. Experimento foi realizado em triplicata.



**Figura 19. Avaliação do envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na ativação de *gcs-1::GFP* por AAM e proteção por EAA.** Animais transgênicos *gcs-1::GFP* tratados com *skn-1(RNAi)* e *daf-16(RNAi)* foram pré tratados por 36 horas ou não com EAA e expostos ou não à 10 mM AAM por 3 horas. Após uma hora de recuperação os níveis de fluorescência foram analisados. A barra de erros representa o SEM. (\*\*\*) indica resultado para  $p \leq 0,001$ , (&) indica resultado significativamente diferente do grupo controle correspondente. (#) indica resultado significativamente diferente do grupo exposto à AAM correspondente. Análises estatísticas realizadas pelo teste t de Student's. Experimento realizado duas vezes para *skn-1(RNAi)* e uma vez para *daf-16(RNAi)*.

# 5. Discussão

Ultimamente têm sido revelados dados de que alimentos processados de grande consumo pela população mundial como batatas fritas, bolos, pães, café e biscoito dentre outros possuem um alto índice de acrilamida em sua composição (Chen *et al.*, 2012; Wilson, 2009; Svensson, 2003). Devido à sua toxicidade e a capacidade de induzir danos a moléculas importantes, vários estudos ainda devem ser realizados a fim de melhor elucidar os mecanismos pelo qual a acrilamida causa danos.

O *C. elegans* é um organismo modelo, pequeno bastante para ser manuseado em grandes quantidades, de fácil cultivo em laboratório, que possui um curto período de vida, e que possui homologia em cerca de 80 % com genoma humano. Diante de várias características interessantes deste verme, este se faz um excelente organismo modelo para estudar compostos que possam trazer um efeito benéfico à saúde, quanto para estudar compostos que apresentem toxicidade (Artal *et al.*, 2006). Até o momento, poucos trabalhos utilizando o *C. elegans* foram realizados para avaliar a toxicidade da acrilamida, assim como para investigar novos compostos com propriedades protetoras contra acrilamida. Neste trabalho, nós propomos utilizar o *C. elegans* para avaliar os efeitos da exposição aguda e os possíveis efeitos protetores do Açai contra a toxicidade induzida pela acrilamida.

## **5.1 Avaliação do efeito da exposição aguda à AAM sob parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans***

Dentro dos parâmetros biológicos avaliados pela exposição aguda, o tamanho dos animais foi o primeiro analisado. O tamanho dos animais foi afetado pela exposição aguda à AAM na concentração de 10 mM nos tempos de 3 e 9 horas (Figura 5). Também houve redução corporal nos animais expostos à 100 mM AAM nos tempos de 3 e 6 horas, sendo que no tempo de 9 horas, todos os animais se encontraram mortos. Os resultados mostram uma “dose – resposta” bifásica, onde se pode observar que para a concentração de 10 mM, no menor tempo de exposição (3 horas) e no maior tempo (9 horas), os efeitos tóxicos da acrilamida foram proeminentes, não sendo observado algum efeito no tempo de 6 horas.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Hasegawa (2004) ao analisar o tempo de vida de *C. elegans* sob exposição crônica. Neste trabalho, o autor observou pequenas doses de AAM (5 ug/l), reduz o tempo de vida do *C. elegans*. Entretanto, nenhum efeito aparente foi observado nos animais tratados com doses moderadas (5 mg/l). A redução da longevidade é observada novamente quando os animais são tratados com altas doses de AAM (500 mg/l). Os autores sugerem que baixas concentrações ou rápidas exposições, como no caso dos nossos experimentos, a AAM é tóxica o bastante para causar efeitos prejudiciais no *C. elegans*, mas não é capaz de induzir o sistema de defesa eficiente nos animais. Entretanto, doses ou tempo de exposição moderada, são capazes de ativar o sistema de defesa contra acrilamida, o que não ocorreria em altas doses ou exposições muito prolongadas (Hasegawa *et al.*, 2004).

Nós também avaliamos os efeitos tóxicos da acrilamida sobre a reprodução dos animais. Os resultados mostram que animais expostos por 3 horas não apresentaram diferenças quanto à reprodução enquanto os animais expostos por 6 horas apresentaram redução significativa do número de embriões colocados (Figura 6). Resultados similares foram encontrados por Hasegawa (2004), onde relatou que animais tipo selvagem crescidos em meio contendo 0,5 ug/l a 5 mg/l AAM não foi capaz de reduzir a progênie, entretanto animais crescidos em meio com 500 mg/l AAM, houve redução significativa da progênie.

Os efeitos na reprodução causados pela acrilamida também têm sido relatados em mamíferos. Ratos tratados com AAM, tem demonstrado através de histopatologia lesões nas células testiculares (Ma *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007), além de apresentarem redução de peso dos testículos e epidídimos. Células em apoptose foram encontradas próximas aos túbulos seminíferos (Wang *et al.*, 2007), assim como redução no número total de espermatozóides, da motilidade e aumento do número de espermatozóides mortos (Ma *et al.*, 2011; Rahagadale *et al.*, 2012). Estes dados servem de base para ajudar a explicar a redução de progênie observada em nossos resultados, onde danos ao sistema reprodutor do *C. elegans* possam estar ocorrendo e conseqüentemente prejudicando sua proliferação.

Já existem várias evidências que mostram correlação entre tempo de vida do *C. elegans* e a resistência a múltiplos estresses. Pelo fato da exposição dos animais à AAM ter causado uma redução do tamanho corporal e redução da progênie, foi também avaliado o efeito da AAM na longevidade do *C. elegans*. Apesar de causar diminuição do tamanho corporal dos animais, a exposição por 3 horas a 10 mM AAM não reduziu do tempo de vida dos animais (Figura 7). Uma possível explicação para estes resultados é que o efeito tóxico promovido pela AAM sobre o tamanho corporal seria neutralizado pelos sistemas de defesa do *C. elegans* com o passar do tempo. Esta possibilidade poderia ser avaliada medindo o tamanho corporal dos animais tratados por 3 horas com 10 mM AAM depois de 2, 4 e 8 dias. Se for observado que o tamanho dos animais mais velhos tratados com AAM é semelhante aos animais do grupo controle, isto indicaria que o efeito tóxico do AAM sobre o desenvolvimento do *C. elegans* foi diminuído com o tempo.

Já nos tempos de 6 e 9 horas de exposição à 10 mM AAM foi observada uma redução significativa na longevidade (Figura 7). Curiosamente, apesar de não termos observado redução no tamanho dos animais pelo tempo de 6 horas em 10 mM AAM, redução na longevidade foi verificada. Os ensaios de avaliação do tamanho dos animais se diferem da longevidade quanto à duração dos experimentos. Uma possível explicação seria que os efeitos tóxicos apareçam ao longo do passar do tempo em *C. elegans* sobre a longevidade, o que não é observado em um curto tempo de análise para o tamanho corporal.

A produção de EROs intracelular em excesso pode prejudicar biomoléculas importantes no organismo (Finkel e Holbrook, 2000). Para avaliar a produção de EROs em *C. elegans*, os animais foram expostos à 0,1; 1 e 10 mM AAM por 3 horas (Figura 8). Os resultados mostraram que houve aumento da produção de EROs pela exposição à 0,1 mM AAM, o que não foi observado pelas outras concentrações testadas. Apesar da aparente contradição destes resultados, a diminuição na produção de EROs nos animais expostos à 1 e 10 mM AAM pode ser também explicada pela ativação do sistema de detoxificação e antioxidante do *C. elegans*.

No trabalho de Hasegawa *et al.* (2008) foi observado em análise de microarranjo que os genes mais ativados foram da família de GSTs, enzimas de fase I de detoxificação como desidrogenases e uma enzima citocromo P450 (*cyp13A12*), sendo esta homóloga de CYP2E1, encontradas em mamíferos (Hasegawa *et al.*, 2008). No trabalho de análise de expressão gênica ativada por AAM, Hasegawa *et al.* (2008) identificaram que *gst-4* é o gene mais induzido em *C. elegans*. Estes dados suportam a hipótese de que a redução de EROs endógenos observada nos animais tratados com 1 e 10 mM AAM pode ser um consequência da super ativação do sistema de detoxificação. No nosso projeto, a análise da expressão de *gst-4::GFP* mostrou que existe aumento dos níveis de fluorescência em todos os tempos testados para as concentrações de 1, 10 e 100 mM AAM (Figura 9). A expressão de *gst-4::GFP* após 3 horas aumentou aproximadamente 2 vezes com 1 mM AAM e 7 vezes com 10 mM AAM.

A exposição dos animais em todos o tempos na concentração de 100 mM, apresentou níveis de fluorescência inferior a 10 mM. Uma explicação possível para este achado seria que, uma alta concentração de AAM poderia estar aumentando a oxidação de moléculas intracelulares, até mesmo danos á enzima, o que explicaria níveis mais baixos de fluorescência encontrados. É sabido que a metabolização de compostos pode gerar outros ainda mais tóxicos. A AAM é metabolizada pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1), o qual gera um epóxido como metabólito, a glicidamida, que é mais potente em causar genotoxicidade e citotoxicidade quando comparado à AAM. (Martins *et al.*, 2007). Os dados poderiam ser explicados por uma alta produção de glicidamida, um metabólito mais tóxico que o composto original, o que poderia explicar este efeito tóxico com maiores concentrações de AAM no *C. elegans*.

Nós demonstramos pela primeira vez que a expressão de *gcs-1::GFP* também é ativada pela AAM (Figura 10A). A *gcs-1*, que é a enzima limitante da síntese da glutathiona, é importante para a reação de conjugação realizada pelas *gst-4*. Nós observamos que a expressão de *gcs-1::GFP* aumentou cerca de 4 vezes com 10 mM AAM após 3 horas. Por outro lado, nós não observamos a indução de *sod-3::GFP* por 3 horas de exposição a 10 mM AAM (Figura 10B).

## **5.2 Avaliação do efeito protetor do EAA sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e genéticos no *C. elegans* exposto ao tratamento agudo com AAM**

Após as análises de padronização em qual tempo e em qual concentração dos animais expostos à AAM causaram redução no tamanho dos animais, nosso próximo passo foi de avaliar o possível efeito protetor do açaí sobre a toxicidade induzida pela AAM. Para avaliar o efeito protetor da suplementação do açaí no *C. elegans* expostos à AAM, nós utilizamos a concentração de 100 mg/ml, pois já foi demonstrado pelo nosso grupo, que esta foi a melhor concentração que causou proteção ao *C. elegans* quanto ao estresse oxidativo (Bonomo *et al.*, 2014).

Os resultados mostram que o efeito tóxico induzido pela AAM sobre o tamanho corporal dos animais foi perdido quando os animais foram suplementados com EAA. Os dados sugerem que o EAA confere proteção ao *C. elegans* ao atenuar os efeitos tóxicos causados pela AAM retornando o tamanho dos animais à valores similares ao grupo controle (Tabela 5). Os resultados ainda mostram que o tratamento com EAA não causou redução significativa sob condições normais, o que mostra que a concentração utilizada não se mostrou tóxica aos animais. Resultados similares foram encontrados por Bonomo *et al* (2014), onde também não foi relatado efeitos tóxicos referentes ao tratamento com açaí.

A avaliação de citotoxicidade em células tem demonstrado que exposição à AAM reduz a viabilidade celular. Estudo realizado por Chen *et al* (2013) mostrou que o composto polifenólico miricitrina foi capaz de diminuir a citotoxicidade das células de uma maneira dose dependente. O tratamento de ratos com alicina, composto presente no alho, se mostrou capaz de prevenir hepatotoxicidade induzida por AAM tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os autores argumentam que existem duas possibilidades para a proteção causada pela alicina. O primeiro mecanismo envolve o bloqueio da epoxidação da AAM em glicidamida, metabólito mais tóxico que AAM, pelo citocromo P450. Já foi demonstrado que a alicina pode inibir a citocromo P450 2E1, impedindo a metabolização de AAM em glicidamida (Taubert *et al.*, 2006). Uma alternativa

para ajudar a explicar a proteção causada pelo açaí seria avaliar se o açaí inibe a enzima citocromo P450 2E1. A outra possibilidade seria de que a alicina estaria causando redução do estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2012).

Até o momento só temos os dados do efeito tóxico da AAM sobre a progênie do *C. elegans*. Os experimentos com o tratamento com açaí ainda estão em andamento para avaliar uma possível melhora na progênie dos animais sob estresse da AAM. Apesar de ainda não termos resultados com animais tratados com açaí, alguns estudos mostram que a administração de compostos com capacidade antioxidante melhora a toxicidade testicular em ratos. A administração de vitamina C e E atenuaram a toxicidade sobre os testículos de ratos, onde foi observado melhoras na contagem total e na motilidade dos espermatozoides. Entretanto, danos aos túbulos seminíferos ainda puderam ser observados, mostrando que a proteção causada pelos compostos antioxidantes é parcial (Uzun *et al.*, 2009). A administração concomitante de vitamina E com AAM em ratos não se mostra capaz de reverter os danos causados pela AAM. Quando a ingestão de AAM é cessada nos animais, a administração de vitamina E mostra melhoras na contagem de esperma, e na estrutura dos túbulos seminíferos (Rahagadale *et al.*, 2012). Estes são resultados interessantes que mostram o potencial de compostos antioxidantes na melhora do sistema reprodutor de ratos. Sabendo da capacidade antioxidante do EAA, nossa hipótese é de que o tratamento com EAA possa causar alguma melhora no perfil de ovoposição dos animais sob efeitos tóxicos da AAM.

Assim como observado por Bonomo *et al.* (2014), nós não observamos nenhum efeito pró-longevidade do EAA sob condições normais. Entretanto o pré-tratamento dos animais com EAA aumentou o tempo de vida dos vermes sob condições de estresse induzido pela AMM (Tabela 6). Dados da literatura se assemelham aos nossos em relação à proteção que o açaí confere em condições de estresse. Bonomo *et al.* (2014) mostrou que vermes tratados com EAA aumentam o tempo de vida sob condições de estresse oxidativo. Moscas expostas a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio e logo em seguida suplementadas com açaí, apresentaram aumento de 3 vezes no tempo de vida médio em relação às moscas com dieta normal. O tratamento com açaí ainda

aumentou o tempo de vida de moscas mutantes para o gene da p38 MAPK. (Mortmer *et al.*, 2012).

Recentes evidências demonstram que compostos como curcumina e extrato de mistura de ervas possuem capacidade de prolongar o tempo de vida do *C. elegans* sob condições de estresse oxidativo (Liao *et al.*, 2011; Takahito *et al.*, 2013) e estresse térmico (Liao *et al.*, 2011). Já foi mostrado que o pré-tratamento de vermes com quercetina, resultou no aumento do tempo de vida médio dos animais sob estresse oxidativo induzido por juglone, demonstrando que a quercetina aumenta a resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans* (Kampkotter *et al.*, 2008). Apesar de ser desejável que o tratamento com um composto promova a resistência a diferentes estresses, nem sempre isso é observado. O extrato de mirtilo aumenta a longevidade e a resistência ao estresse térmico, mas não ao estresse oxidativo em *C. elegans* (Wilson *et al.*, 2006). Até o momento, não encontramos trabalhos publicados em que compostos com capacidade antioxidante aumentasse o tempo de vida do *C. elegans* sob a toxicidade induzida por AAM. Nossos resultados preliminares sugerem que o pré- tratamento com açaí reduz a toxicidade da AAM no *C. elegans*.

Sabendo que EROs podem reagir com moléculas importantes como DNA, proteínas e lipídeos para a homeostase da célula, os organismos fazem uso de mecanismos não enzimáticos e enzimáticos para neutralizar EROs (Kampkotter *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2007). Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e já é bem estabelecido que compostos antioxidantes obtidos através da dieta são indispensáveis para uma defesa apropriada contra oxidação, e portanto, possuem papel importante no combate ao estresse oxidativo (Cerqueira *et al.*, 2007). Compostos como a curcumina (Cao *et al.*, 2008), hidroxitirosol (Zhang *et al.*, 2009) e miricitrina (Chen *et al.*, 2013) foram capazes de diminuir os níveis a produção de EROs induzidas por AAM em culturas de células. Bonomo *et al.* (2014) mostrou que o tratamento de vermes com açaí reduziu os níveis de EROs induzidos por peróxido de hidrogênio tanto no *C. elegans* quanto em células do cordão umbilical humano (HUVECs).

Uma vez que a exposição dos animais à AAM foi capaz de induzir a produção de EROs, nós também avaliamos se o tratamento com EAA era capaz de diminuir o estresse oxidativo promovido pelo AAM em *C. elegans*. Inicialmente, os resultados mostram que o tratamento com EAA aumentou a produção de EROs assim como a exposição à AAM. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com EAA seguida da exposição à AAM reduziu estes níveis (Figura 13).

Apesar de vários compostos fitoquímicos apresentarem propriedades antioxidantes, existe relatos de compostos que apresentam tanto uma capacidade antioxidante quanto propriedade pró-oxidante. Estudo recente avaliou a atividade antileishmania da quercetina contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* em macrófagos. O tratamento com quercetina diminuiu a infecção celular além de causar aumento da produção de EROs de maneira dose dependente (Fonseca *et al.*, 2013). Diante dos resultados apresentados, é sugestivo de que o EAA possa ter uma atividade tanto pró-oxidante quanto uma atividade antioxidante. Sob condições normais foi observado que os efeitos pró-oxidantes se sobressaem. Já sob condições de estresse induzido por AAM os efeitos antioxidantes são mais proeminentes.

### **5.3 Análise da expressão gênica e do envolvimento de SKN-1 e DAF-16 na proteção induzida pelo EAA em animais expostos ao tratamento agudo com AAM**

Pelo fato do tratamento com EAA ter propiciado um significativo efeito protetor *in vivo* no *C. elegans* e uma capacidade de neutralizar EROs, nós investigamos qual seria o efeito do tratamento com EAA sobre a regulação de enzimas de detoxificação em animais expostos à AAM.

Primeiramente nós avaliamos a expressão de *gst-4::GFP*. Os resultados mostram que sob condições normais, o tratamento com EAA reduziu a expressão de *gst-4*. O tratamento com AAM causou aumento dos níveis de fluorescência e o tratamento com EAA não foi capaz de reduzir expressão de

*gst-4*, apesar de apresentar uma tendência de diminuição (Figura 14). Kampkotter *et al* (2007) avaliou a influência do extrato de *Ginko biloba* no *C. elegans* sob condições normais e de estresse oxidativo. Foi observado que em ambas as situações o tratamento com extrato de *Ginko biloba* reduziu a expressão de *gst-4::GFP*. Essa redução da expressão foi associada à diminuição do estresse oxidativo. A redução do estresse oxidativo poderia estar ocorrendo nos animais tratados com EAA e AMM uma vez que foi observado a redução de EROs.

Outro gene avaliado foi o *gcs-1::GFP*. O tratamento com açaí aumentou os níveis de fluorescência sob condições normais. Ishikado *et al* (2013) verificou que *C. elegans* tratados com extrato da casca de salgueiro, também apresentaram aumento nos níveis de expressão de *gcs-1*, assim como também foi observado o mesmo aumento em ratos (DeFeudis, 2002). O pré-tratamento dos animais com EAA seguido de exposição à AAM causou redução dos níveis de fluorescência de *gcs-1::GFP* (Figura 15). Bonomo *et al* (2014) também verificou que sob condições de estresse oxidativo, o tratamento com açaí reduziu a expressão de *gcs-1::GFP*.

Já é bem estabelecido na literatura que em *C. elegans* os genes *gst-4* e *gcs-1* são ativados pelo fator de transcrição SKN-1 (An e Blackwell, 2003; Hasegawa *et al.*, 2008). Para avaliar o envolvimento de SKN-1 na expressão de *gcs-1::GFP* sob o tratamento de EAA e AAM, animais transgênicos foram tratados com *skn-1(RNAi)*. Foi observado que animais *skn-1(RNAi)* expostos à AAM apresentaram redução significativa dos níveis de fluorescência em relação aos animais *controle(RNAi)* expostos à AAM (Figura 19). Esses dados sugerem que ativação de *gcs-1* por AAM é parcialmente dependente de SKN-1. Para confirmar estes resultados seria interessante analisar a localização nuclear de SKN-1 em animais transgênicos *SKN-1::GFP*. Na realidade, duas tentativas foram realizadas, entretanto, nenhuma localização nuclear foi observada nos animais *SKN-1::GFP* tratados com AAM. Estes dados não foram apresentados aqui, pois nestes experimentos os controles positivos para localização nuclear de SKN-1 (estresse oxidativo com azida sódica e estresse térmico) também não funcionaram. Outra alternativa seria avaliar os níveis de

mRNA de *skn-1* nos animais tipo selvagem e mutantes tratados com EAA e/ou AMM através da PCR quantitativa em tempo real.

Outro resultado observado foi de que o tratamento com EAA não alterou os níveis de expressão de *gcs-1::GFP* nos animais *skn-1(RNAi)* expostos à AAM em comparação aos animais *controle(RNAi)* do mesmo grupo. Estes resultados sugerem que na ausência de SKN-1, EAA não interfere na expressão de *gcs-1* em condições de estresse induzida pela AAM. Neste ponto, estes resultados sugerem que o tratamento com EAA teria uma ação indireta sobre a expressão de *gcs-1*. Neste cenário, o tratamento com AAM é capaz de ativar uma ampla resposta antioxidante e de detoxificação para neutralizar tanto as EROs produzidas e minimizar seus efeitos tóxicos sobre vários parâmetros biológicos. O açaí e/ou seus compostos polifenólicos em condições de estresse induzido pela AAM atuariam antagonizando seus efeitos e neutralizando diretamente as EROs produzidas pela AAM. Esta redução de EROs poderia diminuir a ativação de SKN-1 e conseqüentemente a expressão de *gcs-1* e de outras enzimas de detoxificação. A decorrência da combinação dos efeitos do AAM e do EAA seria um balanceamento no estado redox do *C. elegans* que por sua vez poderia promover uma melhoria no padrão de desenvolvimento e longevidade dos animais tratados com AAM. Um experimento que poderia apoiar esta hipótese seria avaliar se o tratamento com EAA continuaria diminuindo os níveis de EROs e aumentando o tempo de vida médio em mutantes *skn-1* ou animais *skn-1(RNAi)* tratados com AAM assim como foi observado nos animais tipo selvagem.

Nós também avaliamos o envolvimento de DAF-16 na proteção induzida pelo EAA em animais expostos ao tratamento agudo com AAM. Para tal, nós avaliamos a localização nuclear de *DAF-16::GFP* e expressão do seu gene alvo *sod-3::GFP*. Os resultados mostram que não houve aumento da localização nuclear em animais tratados com açaí, mas aumento de localização foi verificado em animais expostos à AAM (Figura 17). Em relação à *sod-3::GFP*, não foi observada nenhuma alteração da sua expressão nos grupos tratados com EAA, AMM ou em combinação. Estes resultados também foram semelhantes aos encontrados por Bonomo *et al.* (2014), porém estes autores observaram que apesar do EAA não induzir a localização nuclear e nem

aumentar os níveis de mRNA para *daf-16*, o tratamento com EAA induziu a expressão da catalase *clt-1* e da glutathione-S-transferase *gst-7* de maneira DAF-16 dependente. Kampkotter *et al* (2008) descreveram resultados similares quando analisaram os efeitos de quercetina no *C. elegans*. Eles observaram a indução de DAF-16, sem ativação de *sod-3*. Os autores sugerem que somente a localização de DAF-16 não é suficiente para a ativação de genes alvos. Outros fatores são conhecidos por influenciarem a habilidade de DAF-16 e proteínas FOXO em ativarem genes alvos como: ligação ao DNA, associação com co-fatores, estado de fosforilação e acetilação.

Outra estratégia utilizada para verificar se a presença de DAF-16 era necessária no combate ao estresse oxidativo foi avaliar a produção de EROs em mutantes com perda de função para *daf-16*. Os resultados obtidos mostram que mesmo nos mutantes *daf-16* o tratamento com EAA diminuiu a produção de EROS induzida pela AAM (Figura 18). Porém esta redução foi significativamente menor (40,42 %) que a observada nos animais tipo selvagem (57,85 %). Estes dados sugerem que DAF-16 pode estar contribuindo para ativação de uma resposta antioxidante contra AAM.

Finalmente, nós também avaliamos a expressão de *gcs-1::GFP* em animais *daf-16(RNAi)* tratados ou não com EAA e seguidos de exposição ou não à AAM. Os resultados obtidos para animais *daf-16(RNAi)* mostram que não houve redução dos níveis de expressão nos animais expostos à AAM, e que o tratamento com EAA reduziu a expressão de *gcs-1::GFP*. Os resultados ainda mostram que ativação de *gcs-1* por AAM não é dependente de DAF-16 e que o efeito do EAA também não depende deste fator de transcrição.

# **6. Conclusões**

- A exposição aguda do *C. elegans* à 10 mM AAM reduz o tamanho corporal, a progênie e a longevidade dos animais.
- A exposição aguda do *C. elegans* à 0,1 mM AAM aumenta a produção de EROs em animais tipo selvagem e mutantes *daf-16*.
- A exposição aguda do *C. elegans* aumenta a expressão de *gst-4::GFP* em 1, 10 e 100 mM AAM; aumenta a expressão de *gcs-1::GFP* com 10 mM AAM mas nenhum aumento de fluorescência foi observado para *sod-3::GFP*.
- O tratamento do *C. elegans* com EAA 100 mg/ml previne a redução do tamanho corporal e da longevidade induzida pela AAM.
- O tratamento do *C. elegans* com EAA 100 mg/ml sozinho aumenta a produção de EROs e causa redução dos porém reduz os níveis de EROS em animais tipo selvagem e mutantes *daf-16* expostos à AAM.
- O tratamento do *C. elegans* com EAA 100 mg/ml diminui a expressão de *gst-4::GFP* em condições normais, mas não reduz em animais expostos à AAM;
- o tratamento aumenta a expressão de *gcs-1::GFP* em condições normais e reduz a expressão em animais expostos à AAM; nenhum efeito foi observado para *sod-3::GFP*.
- A localização nuclear de *DAF-16::GFP* aumenta pela exposição à AAM e nenhum efeito é observado pelo tratamento com EAA.
- A indução de *gcs-1::GFP* por AAM é parcialmente dependente de SKN-1.

# **7. Referências Bibliográficas**

Abe, L. T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, 394 – 400, 2007.

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

Arihan, O. Effects of oral acrylamide intake on blood viscosity parameters in rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.47, p.45-52, 2011.

Artal-Sanz, M.; de Jong, L.; Tavernarakis, N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Biotechnol J**, v. 1, p. 1405–1418, 2006.

Bongers, M. *et al.* Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Lymphatic Malignancies: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. **PlosOne**, v. 7, 2012.

Bonomo, L. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. **PlosOne**, doi: 10.1371/journal.pone.0089933, 2014.

Braeckman, B. P.; Vanfleteren, J. R. Genetic control of longevity in *C. elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 90-98, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 518/GM de 25 de Março de 2004 Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 25 de Março de 2004.

Buchter, C. *et al.* Myricetin- Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. **Int Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 11895-11914, 2013.

Calkins, M.J. Johnson, D.A. *et al.* The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. **Free Radic Biol Med**. v. 10, p. 1375- 1383. 2008.

Cao, J. *et al.* Curcumin Attenuates Acrylamide-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in HepG2 Cells by ROS Scavenging. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, p. 12059-12063, 2008.

Cerqueira, F. M.; Helena, M.; Medeiros, G. D. *et al.* Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

Chen, W. *et al.* Myricitrin inhibits acrylamide- mediated cytotoxicity in human Caco-2 cell by preventing oxidative stress. **Biomed Res Int**. doi: 10.1155/2013/724183. 2013.

Choi, Y. H.; Yu, A. M. Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. **Curr Pharm Des**, 2013.

Cutter-Glover, K. M.; Lin, S.; Blackwell, T. K. Integration of the Unfolded Protein and Oxidative Stress Responses through SKN-1/Nrf. **Plos Genetics**, v. 9, 2013.

DeFeudis, F. V. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on gene expression: possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. **Drug Development Research**, v. 57, p. 214-235, 2002.

Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

Flora, S. J. *et al.* Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. **Indian J Med Res**, v. 4, p. 501-523, 2008.

Fonseca, F. S. *et al.* Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **J Nat Prod**, v. 76, n. 8, p. 1505-1508, 2013.

Fragoso, M. F. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 68-76, 2013.

Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 4504–4526, 2003.

Granath, F. *et al.* The multiplicative model for cancer risk assessment: applicability to acrylamide. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 817-819, 2001.

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

Guerra, J. F. C. *et al.* Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188-194, 2011.

Handerson, S. T. *daf-16* Protects the Nematode *Caenorhabditis elegans* During Food Deprivation. **The journals of Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 444-460, 2006.

Hasegawa, K. *et al.* Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. **PlosOne**. doi:10.1371/journal.pone.0009267. 2010.

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. **Toxicology Letters**, v. 175, p. 82-88, 2007.

Hasegawa, K. *et al.* Acrylamide-Responsive Genes in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicological Sciences**, v. 101, p. 215-225, 2008.

Hasegawa, K. *et al.* Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 183-189, 2004.

Havermann, S. *et al.* Molecular effects of baicalein in Hct116 cells and *Caenorhabditis elegans*: activation of the Nrf2 signaling pathway and prolongation of lifespan. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 9, p. 2158- 2164, 2013.

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

Ishikado, A. *et al.* 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**, v. 65, p. 1506-1515, 2013.

Jensen, G. S. *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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8326-8333, 2008.

Kampkotter, A. *et al.* Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 314-323, 2008.

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*. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 139-147, 2007.

Kukoski, E. M.; Asuero, A. G. Frutos tropicais e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1283-1287, 2006.

Laslo, M. *et al.* A botanical containing freeze dried açai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in *sod1* knockdown flies. **Age**, v. 35, p.1117-1132, 2013.

Landis, J. N.; Murphy, C. T. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 5, p. 1405-1412, 2010.

Liao, V. H. *et al.* Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 480-487, 2011.

Lichtenthaler, R. *et al.* Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

Liedo, p. *et al.* The interplay among dietary fat, sugar, protein and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp in modulating lifespan and reproduction in a Tephritid fruit fly. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 536-539, 2012.

Noratto, G. D. *et al.* Polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. **Journal Agricultural Food and Chemical**, v. 59, p. 7999-8012, 2011.

Ma, Y. *et al.* Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats. **Toxicol and Health**, v. 27, p. 617-627, 2011.

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

Martins, C. *et al.* Cytogenetic Damage Induced by Acrylamide and Glycidamide in Mammalian Cells: Correlation with Specific Glycidamide-DNA Adducts. **Toxicological Sciences**, v. 95, p. 383-390, 2007.

Mohamed S. K. Antioxidant and immunostimulant effect of *carica papaya* linn. Aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. **Acta Inform Med**, v. 3, p. 180-185, 2012.

Mottram, D. Acrylamide is formed in Maillard Reaction. **Nature**, v. 419, p. 448-449, 2002.

Moura, R. S. *et al.* Addition of açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 855-863, 2011.

Mukhopadhyay, A. *et al.* Warming pathways to and from DAF-16/FOXO. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 928- 934, 2006.

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

Muttucumaru, N. *et al.* Effects of Nitrogen and Sulfur Fertilization and Free Amino Acids, Sugar, and Acrylamide Forming potential in potato. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 6734–6742, 2013.

Oliveira de Souza, M, *et al.* Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, doi: 10.1016/j.nut.2009.09.007, 2009.

Parzefall, W. Minireview on the toxicity of dietary acrilamide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1360-1364, 2008.

Powolny, A. A. *et al.* The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via *skn-1* activation. **Exp. Gerontol.**, v. 46, p. 441- 452, 2011.

Prasad, S. N. *et al.* Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. **Neurochem Res.**, v. 38, p. 330- 345, 2013.

Rahangadale, S. *et al.* Evaluation of Protective Effect of Vitamin E on Acrylamide Induced Testicular Toxicity in Wister Rats. **Toxicology International**, v. 19, p. 158-161, 2012.

Rahangadale, S. *et al.* Neuroprotective Effect of Vitamin E supplementation in Wistar Rat Treated with Acrylamide. **Toxicology International**, v. 19, p. 1-8, 2012.

Ramiro, I. R. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.22, p 1186- 1194, 2010.

Rufino, M. S. M. *et al.* Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100-2106, 2011.

Ruzza, P.; Calderan, A. Glutathione Transferase (GST)- Activated Prodrugs. **Pharmaceutics**, v. 5, p. 220-231, 2013.

Rydberg, P. *et al.* Factor that Influence Acrylamide Content of Heated Foods. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 561, p. 317-328, 2005.

Sanganyado, E. *et al.* Analysis of acrylamide in traditional foodstuffs in Zimbabwe. **African Journal of food Science**, v. 5, p. 910-913, 2011.

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

Schauss, A. G., X. Wu, *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006.

Shibu, M. *et al.* Anthocyanin-rich Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Pulp Fractions Attenuate Inflammatory Stress Signaling in Mouse Brain BV-2 Microglial Cells. **J. Agric. Food Chem**, v. 60, p. 1084-1093.

Spada, P. D. S. *et al.* Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 5, p. 1084-8, 2009.

Svensson, k. *et al.* Dietary intake of Acrylamide in Sweden. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1581-1586, 2003.

Takahito, M. *et al.* Extension of lifespan and protection against oxidative stress by an antioxidant herb mixture complex (KPG7) in *Caenorhabditis elegans*. **J. Clin.Biochem. Nutr.**, v. 53, n. 2, p. 81-88, 2013.

Taubert, D. *et al.* The garlic ingredient diallyl sulfide inhibits cytochrome P450 2E1 dependent bioactivation of acrylamide to glycidamide. **Toxicology Letters**, v. 164, p.1-5, 2006.

Udani, J. K. *et al.* Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

Uzun, F. G. *et al.* Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. **Food Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1903-1908, 2009.

Valko, M. *et al.* Free Radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.44-84, 2007.

Wang, C. H. *et al.* Oxidative stress response elicited mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. **Exp Biol Med.**, v. 5, p. 450- 460, 2013.

Wang, H. *et al.* Oral acrylamide affects the development and reproductive performance of male rats. **National journal of andrology**, v. 13, p. 492-497, 2007.

Wang, H. *et al.* Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. **Reprod Toxicol.**, v, 29. P. 225-230, 2010.

Wang, J. *et al.* RNAi Screening Implicates a SKN-1–Dependent Transcriptional Response in Stress Resistance and Longevity Deriving from Translation Inhibition. **PlosGenetics**, v. 6, 2010.

Wei, Y. H.; Lee, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidants enzymes in aging. **Exp Biol Med.**, v. 9, p. 671- 682. 2002.

Wilson, M. A. *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 5, p. 59-68, 2006.

Yassa, H. A. *et al.* *Camellia sinensis* (green tea) extract attenuate acrylamide induced testicular damage in albino rats. **Environ Toxicol.** doi: 10.1002/tox.21846, 2013.

Zhang, X. *et al.* Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 664, p. 64-68, 2009.

Zhang, L. *et al.* Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3306-3312, 2012.

WHO. Acrylamide in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2011. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acesso em 08 de fev. 2014.