

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Micheli Lamberti Jobim

PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824) E AVALIAÇÃO DO DESBALANÇO OXIDATIVO RELACIONADO AO GENÓTIPO DA SOD2 EM CÉLULAS SAUDÁVEIS

Santa Maria, RS
2019

Micheli Lamberti Jobim

**PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824) E
AVALIAÇÃO DO DESBALANÇO OXIDATIVO RELACIONADO AO GENÓTIPO DA
SOD2 EM CÉLULAS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Liliane Bauermann

Co-orientadora: Verônica Farina Azzolin

Santa Maria, RS

2019

Jobim, Micheli

PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO AÇAÍ (Euterpe oleracea, Mart., 1824) E AVALIAÇÃO DO DESBALANÇO OXIDATIVO RELACIONADO AO GENÓTIPO DA SOD2 EM CÉLULAS SAUDÁVEIS / Micheli Jobim.- 2019.

131 p.; 30 cm

Orientadora: Liliane Bauermann

Coorientadora: Verônica Azzolin

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Carcinogênese 2. Cultura celular 3. Frutos amazônicos 4. Açaí 5. Antitumoral I. Bauermann, Liliane II. Azzolin, Verônica III. Título.

Micheli Lamberti Jobim

**PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824) E E
AVALIAÇÃO DO DESBALANÇO OXIDATIVO RELACIONADO AO GENÓTIPO DA
SOD2 EM CÉLULAS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 28/08/2019:

Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Rômulo Barcelos, Dr. (UFP)- Parecer

Michele Sagrillo, Dra. (UFN)

Francine Carla Cadoná (UFN)- Parecer

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado me guiando para o bem e dando-me forças a vencer todas as batalhas.

À minha mãe Elizabete, por ter me apoiado e estar sempre ao meu lado em todos os momentos e principalmente nessa longa e árdua trajetória. Obrigada pelo apoio de sempre, e me estender a mão nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo, te amo!

Aos meus irmãos Alex e Alan, por também estarem ao meu lado, me apoiando e mostrando as melhores alternativas e opiniões. Amo vocês!

Ao meu marido Alinsson, por todo amor, carinho e compreensão principalmente nos momentos difíceis, onde você esteve por todo tempo me apoiando e incentivando a seguir em frente. Obrigada por tudo, te amo!

À minha filha Alice, que foi a minha grande inspiração a não desistir nessa caminhada. Filha, obrigada por você existir em minha vida, te amo mais que tudo!

À professora Liliane Bauermann, por ter me acolhido e aceito me orientar no final do doutorado. Obrigada pela orientação e carinho de sempre!

À Francine Cadoná, pela amizade, orientação e ajuda, que mesmo a distância estava ali presente no que fosse preciso e torcendo por mim.

Ao Charles Elias Asmmann, pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento do terceiro manuscrito.

À Verônica Azzolin, pela co-orientação e ajuda no desenvolvimento desta tese.

À Fernanda Barbisan, pela ajuda no desenvolvimento do primeiro e segundo manuscritos.

Ao programa de Pós Graduação em Farmacologia, pela formação e ensino.

À CAPES pela bolsa concedida.

Àqueles que não foram citados mas contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

RESUMO

PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824) E AVALIAÇÃO DO DESBALANÇO OXIDATIVO RELACIONADO AO GENÓTIPO DA SOD2 EM CÉLULAS SAUDÁVEIS

AUTORA: Micheli Lamberti Jobim
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

O câncer configura-se um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo que na maioria dos casos ocorre em células de origem epitelial, já que as mesmas possuem uma alta taxa proliferativa e apresentam características limitadas de senescência celular. Estas células sofrem constantemente com agressões intrínsecas e extrínsecas, gerando o estresse oxidativo e conseqüentemente a perda da sua integridade física, que é fundamental para a homeostase dos tecidos e a prevenção de doenças deletérias, como o câncer. Uma dieta rica em antioxidantes poderia minimizar os efeitos causados pelo estresse oxidativo ajudando no tratamento e na prevenção de diferentes tipos de câncer. O fruto *Euterpe oleracea* (açai) amplamente consumido no Brasil, possui substâncias bioativas (orientina, ácido p-cumárico, apigenina) que possuem propriedades antitumoral, antioxidante, dentre outros. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açai) em células de câncer de próstata (DU 145) e células de câncer colorretal (HT-29), além do efeito genoprotetor em células de queratinócitos (HaCat) submetidas a um desbalanço farmacológico superóxido- peróxido de hidrogênio (S-HP). Primeiramente utilizamos células de queratinócitos saudáveis expostos ao paraquat e porfirina, causando um desbalanço S-HP para verificar o possível mecanismo causal, sendo avaliados os parâmetros de viabilidade e proliferação celular, marcadores do estresse oxidativo e dano de DNA. Após utilizamos o extrato hidroalcoólico do açai em diferentes concentrações frente a linhagem de câncer de próstata (DU145) onde foram analisados os parâmetros de viabilidade e proliferação celular, alterações no ciclo celular e ativação da via apoptótica e genes associados a apoptose e ciclo celular. Já a linhagem de câncer colorretal (HT-29) foi exposta a diferentes concentrações do extrato de açai, bem como as suas principais moléculas bioativas (orientina, apigenina e ácido p-cumárico). Foram avaliados os parâmetros de viabilidade e proliferação celular, alterações no ciclo celular, ativação da via apoptótica, via análises espectrofotométricas e fluorimétricas. Os resultados mostraram que a exposição ao paraquat diminuiu a viabilidade celular, aumentou a lipoperoxidação e a apoptose. Já o tratamento com porfirina aumentou a viabilidade e a proliferação celular e a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e gerou danos às proteínas e ao DNA. O desequilíbrio de $O_2 \cdot -H_2O_2$ regulou diferencialmente o metabolismo oxidativo da linhagem de queratinócitos HaCaT via de expressão do gene *Keap1-Nrf2*. Foi demonstrado também que o extrato de açai diminuiu significativamente a proliferação celular, bem como o crescimento de colônias formadas e inibiu a expressão do gene *Bcl-2*, responsável pelo efeito antiproliferativo em células de câncer de próstata. Verificamos também que o extrato de açai

apresentou atividade antitumoral em células HT-29 ao reduzir a viabilidade celular e à parada do ciclo celular, e a atividade antitumoral do açaí se deve ao efeito sinérgico de suas moléculas bioativas. Portanto, os resultados sugeriram que o açaí apresentou atividade antitumoral contra células de câncer de próstata e colorretal, além de que o estresse oxidativo poderia causar um desequilíbrio nas células epidérmicas e causar o câncer. Sendo assim, poderia ser usado como suplemento para prevenção e diminuição dos efeitos causados pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Carcinogênese; Cultura celular; Frutos amazônicos; Açaí; Antitumoral.

ABSTRACT

ANTI-TUMOR PROPERTIES OF ACAI (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824) AND EVALUATION OF OXIDATIVE DISORDER RELATED TO THE SOD2 GENOTYPE IN HEALTHY CELLS

AUTHOR: Micheli Lamberti Jobim
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann

Cancer is one of the main problems of public health worldwide, and in most cases occurs in cells of epithelial origin, since they have a high proliferative rate and have limited characteristics of cell senescence. These cells constantly suffer from intrinsic and extrinsic aggression, generating oxidative stress and consequently the loss of their physical integrity, which is fundamental for tissue homeostasis and the prevention of deleterious diseases such as cancer. An antioxidant-rich diet could minimize the effects of oxidative stress by helping to treat and prevent different types of cancer. The fruit *Euterpe oleracea* (açai) widely consumed in Brazil, has bioactive substances (orientin, p-coumaric acid, apigenin) that have antitumor, antioxidant properties, among others. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the in vitro antitumor effect of *Euterpe oleracea* (açai) hydroalcoholic extract on prostate cancer cells (DU 145) and colorectal cancer cells (HT-29), besides the genoprotective effect on keratinocyte cells (HaCat) subjected to pharmacological imbalance superoxide-hydrogen peroxide (S-HP). Firstly, we used healthy keratinocyte cells exposed to paraquat and porphyrin, causing an S-HP imbalance to verify the possible causal mechanism, evaluating cell viability and proliferation parameters, markers of oxidative stress and DNA damage. After we used the acai hydroalcoholic extract in different concentrations against the prostate cancer lineage (DU145) where we analyzed the parameters of cell viability and proliferation, changes in the cell cycle and activation of the apoptotic pathway and genes associated with apoptosis and cell cycle. Already the colorectal cancer lineage (HT-29) was exposed to different concentrations of açai extract, as well as its main biotives molecules (orientin, apigenin and p-coumaric acid). The parameters of cell viability and proliferation, alterations in the cell cycle, activation of the apoptotic pathway, through spectrophotometric and fluorimetric analyzes were evaluated. Results showed that paraquat exposure decreased cell viability, increased lipoperoxidation and apoptosis. Porphyrin treatment increased cell viability and proliferation, reactive oxygen and nitric oxide production and protein and DNA damage. $O_2 \cdot^-$ - H_2O_2 imbalance differentially regulated the oxidative metabolism of HaCaT keratinocyte lineage via the *Keap1-Nrf2* gene expression. Acai extract has also been shown to significantly decrease cell proliferation as well as the growth of formed colonies and inhibit the expression of the *Bcl-2* gene, responsible for the antiproliferative effect on prostate cancer cells. We also verified that the acai berry extract showed antitumor activity in HT-29 cells by reducing cell viability and cell cycle arrest, and the acai berry antitumor activity is due to the synergistic effect of its bioactive molecules. Therefore, the results suggested that acai showed antitumor activity against prostate and colorectal cancer cells, and that oxidative stress could cause an imbalance in the epidermal cells and cause cancer. Thus, it could be used as a supplement to prevent and reduce the effects caused by oxidative stress.

Keywords: Cacinogenesis; Cell culture; Amazon fruit; Acai; Antitumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Próstata: (A) Localização anatômica; (B) Aspectos histológicos da próstata; (C) Comparação entre uma próstata saudável e hiperplásica.....	17
Figura 2 Mapa de localização geográfica de Maués no Estado do Amazonas. Mapa em destaque mostra o município de Maués-AM e sua proximidade com a área de garimpo de Itaituba-PA.....	32
Figura 3 População de açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i>).....	36
Figura 4 Fruto do açai (<i>Euterpe oleracea</i>).....	37
Figura 5 Frutos inteiros e descerrado do açai (<i>Euterpe oleracea</i>).....	37
Figura 6 Estrutura química do ácido p- cumárico.	39
Figura 7 Estrutura química da apigenina	40
Figura 8 Estrutura química da luteolina A: Estrutura química da orientina. B: Estrutura química da vitexina.	41
Figura 9 A: Estrutura química da orientina. B: Estrutura química da vitexina	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ingestão de polifenóis na dieta e risco de câncer	29
Tabela 2 Propriedades funcionais de frutos amazônicos analisadas no Projeto Idoso da Floresta Amazônica (UnATI/UEA e UFSM) no período de 2013 a 2018.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Alanina Alanina
Ala16Val - Alanina dezesseis Valina
Ala-SOD2 - Alanina-Superóxido Dismutase dois
Bax - Associado à proteína X
Bcl2 - Célula-B de linfoma dois
CAT - Catalase
cDNA - DNA complementar
Casp 3 - Caspase três
Casp 8 - Caspase oito
DCF - 2', 7'- Diclorofluoresceína diacetato
EROS - Espécie Reativa de Oxigênio
GP_x - Glutathiona Peroxidase
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
MnSOD - Superóxido Dismutase dependente de manganês
MTS - *Mitochondrial Target Sequence*
MTT- 3-[4,5dimetiltiazol 2-y]-2,5-brometo difeniltetrazolico
O₂•- - Superóxido
OH• - Hidroxila
ON - Óxido Nítrico
ONOO- - Peroxinitrito
RT-qPCR - Transcrição reversa quantitativa em Tempo Real da Reação em Cadeia da Polimerase
SNP - Single nucleotide polymorphism
S-PH – Superóxido- Peróxido de hidrogênio
SOD - Superóxido dismutase
TBARS- Ácido tiobarbitúrico
Val-SOD2 - Valina-Superóxido Dismutase dois
VV - Valina Valina

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – E-mail de resposta do Editor a submissão do manuscrito a Revista Molecular Biology Reports.....	130
Anexo 2 – E-mail de submissão do manuscrito à Revista Journal of Functional Foods.....	131

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Epidemiologia do câncer:	14
2.2 Câncer de próstata	15
2.3 Câncer colorretal	19
2.4 Origem epitelial do câncer	20
2.5 Papel do metabolismo oxidativo no câncer	22
2.5.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	22
2.5.2 Defesas antioxidantes	23
2.5.3 Superóxido dismutase e câncer	23
2.5.4 Modelo <i>in vitro</i> de desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio	25
2.6 Dieta e a epidemiologia do câncer	27
2.7 Câncer e os polifenóis	28
2.8 Projeto idoso da floresta e os estudos sobre a dieta Amazônica	30
2.9 Açaí: (<i>Euterpe oleracea</i> , Mart., 1824): um potente alimento funcional oriundo da Amazônia	36
2.10 Principais moléculas bioativos do açaí.....	39
2.10.1 Ácido ρ- cumárico	39
2.10.2 Apigenina	40
2.10.3 Luteolina	41
2.10.4 Orientina e vitexina	42
2.11 Potencial ação antitumoral do açaí no câncer de próstata e colorretal.....	43
2.12 HIPÓTESE DO ESTUDO	44
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 MÉTODOS E RESULTADOS	46
5 DISCUSSÃO	114
6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	121
ANEXO 1	130
ANEXO 2	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer, atualmente, configura-se como um dos principais problemas de saúde pública mundial, onde os números de casos vêm aumentando de maneira considerável em todo mundo (GUERRA et al, 2005, WHO, 2017).

Na vasta maioria dos casos, o câncer ocorre em células de origem epitelial, já que as mesmas possuem uma alta taxa proliferativa e apresentam características limitadas de senescência celular. Geralmente, mutações genéticas irão ocorrer nas células-tronco do epitélio presentes na camada germinativa do tecido que produz constantemente novas células epiteliais, tanto no tecido queratinizado, como é o caso da pele quanto no tecido não-queratinizado como é o caso das células que recobrem o trato gastrointestinal e também estão presentes em glândulas como a próstata (WEEDEN E ASSELIN-LABAT, 2018).

Além disso, as células de origem epitelial sofrem constantemente com as agressões intrínsecas e extrínsecas, como por exemplo radiação e mutações gênicas, que acarretam a perda da integridade da barreira física, levando ao estresse oxidativo (EO), condição produzida pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em um sistema biológico. O desequilíbrio ocorre devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou funcionamento inadequado do sistema antioxidante. Embora o oxigênio seja essencial para a vida e esteja envolvido na transdução de sinais, transcrição genica e outras atividades celulares, coincidentemente também possui um efeito deletério sobre biomoléculas na forma de radicais livres (RL) e EROs (SINGH et al., 2019; SILVA & JASIULIONIS, 2014; SHAFI et al., 2019).

Para combater a intensa produção de EROs, as células humanas possuem a capacidade de desenvolver um mecanismo de defesa, denominado sistema de defesa antioxidante, que atua na prevenção e reparo físico e químico dos danos oxidativos nos diversos sistemas orgânicos. Existem dois sistemas de defesa antioxidante: o enzimático e o não-enzimático. Dentre os enzimáticos, incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação de O_2 para H_2O_2 , enquanto a CAT e GPx convertem subsequentemente H_2O_2 em H_2O e O_2 , impedindo assim a produção excessiva de OH^\cdot , a espécie mais reativa. Já o sistema não-enzimático é composto por uma variedade de substâncias antioxidantes, principalmente de origem dietética, nas quais se destacam as

vitaminas, minerais e compostos fenólicos (SHAO et al., 2012; (BARBOSA et al., 2010; CERUTTI, 1985; OBERLEY, 1980).

Investigações sugerem que alterações na dieta tem efeitos positivos e negativos na saúde durante toda vida, sendo que as modificações dietéticas podem não somente influenciar o estado de saúde presente como também podem determinar se um indivíduo desenvolverá ou não alguma doença como por exemplo, o câncer. Muitos estudos mostram que uma dieta rica em compostos antioxidantes são capazes de prevenir o surgimento do processo tumoral, como é o caso do açaí (*Euterpe oleracea*) que possui moléculas bioativas com propriedades antioxidante, antitumoral e neuroprotetiva (SHAFI et al., 2019, PERIN et al., 2013; ZHOU, 2016; JANSEN et al, 1999).

Diante disso, os constituintes nutricionais do açaí, tornam esse fruto um excelente alimento funcional, já que o mesmo pode atuar na regulação de inúmeras rotas essenciais para a homeostase corporal, e conseqüentemente, garantir assim, uma melhora significativa na qualidade de vida. Ao encontro disso, estudos ainda destacam uma importante atividade antitumoral do açaí, o qual pode promover a inibição da proliferação de células tumorais, muitas vezes, resistentes à quimioterapia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do Câncer

O câncer, atualmente, configura-se como um dos principais problemas de saúde pública mundial, onde os números de casos vêm aumentando de maneira considerável em todo mundo. A prevalência e distribuição dos diferentes tipos de câncer variam em função das características de cada região (GUERRA et al., 2005, WHO, 2017).

Dados epidemiológicos mais recentes do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2016), estimaram 580 mil novos casos de câncer para o ano de 2014, sendo em homens o câncer de próstata o mais comum em incidência em todas as regiões do país e em mulheres o câncer de mama, sendo mais frequente nas regiões sul e o segundo mais incidente na região norte do país (INCA, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as mortes por cânceres pelo mundo não é homogênea. Foi observado uma mortalidade total de cânceres no ano de 2000 de 12,6%, sendo 21,6% e 9,8% nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Devido as diferentes taxas de incidência e mortalidade, pode-se constatar que não existe um padrão global para a ocorrência do câncer, tendo relevância principalmente a exposição a fatores ambientais relacionados a urbanização, como dieta e estilo de vida (GÁROFOLO et al., 2004).

2.2 Câncer de Próstata

O câncer de próstata, no Brasil, caracteriza-se pelo o segundo mais comum entre os homens, atrás apenas para o câncer de pele não-melanoma, sendo considerada a segunda maior causa de mortes entre os homens (WATSON et al., 2015). Dentre os principais sintomas desse tipo de carcinoma, destacam-se dor lombar, problemas de ereção, dor na bacia ou joelhos e sangramento pela uretra, porém, na maioria das vezes, é assintomático inicialmente até que atinjam um tamanho considerável (MULHEM et al., 2015). Com o avanço da doença, podem apresentar dor óssea, problemas urinários, infecção generalizada ou insuficiência renal (BACELAR JÚNIOR et al., 2015).

Alguns fatores podem ser agravantes para aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de próstata, como, apresentar histórico familiar de câncer, ter mais de 50 anos, tabagismo, obesidade e a dieta (WU; GU, 2016).

Com o advento da tecnologia e consumo cada vez maior de produtos industrializados, o sedentarismo e a má alimentação são fatores que favoreceram o aumento da incidência de neoplasias (WU; GU, 2016)

A próstata pertence ao sistema reprodutivo masculino, estando localizada abaixo da bexiga. Este órgão glandular tem a forma de noz que possui cerca de 30 glândulas imersas em um estroma fibromuscular. Em termos citológicos, o epitélio prostático é altamente organizado (Figura 1). Sua função associada a secreções que compõe o sêmen. A secreção prostática auxilia o transporte dos espermatozoides produzidos nos testículos até a sua ejaculação. Dentro deste órgão é que ocorre a transformação principal do hormônio masculino, testosterona na sua forma ativa dihidro-testosterona. A di-hidrotestosterona atua no aparecimento e manutenção de

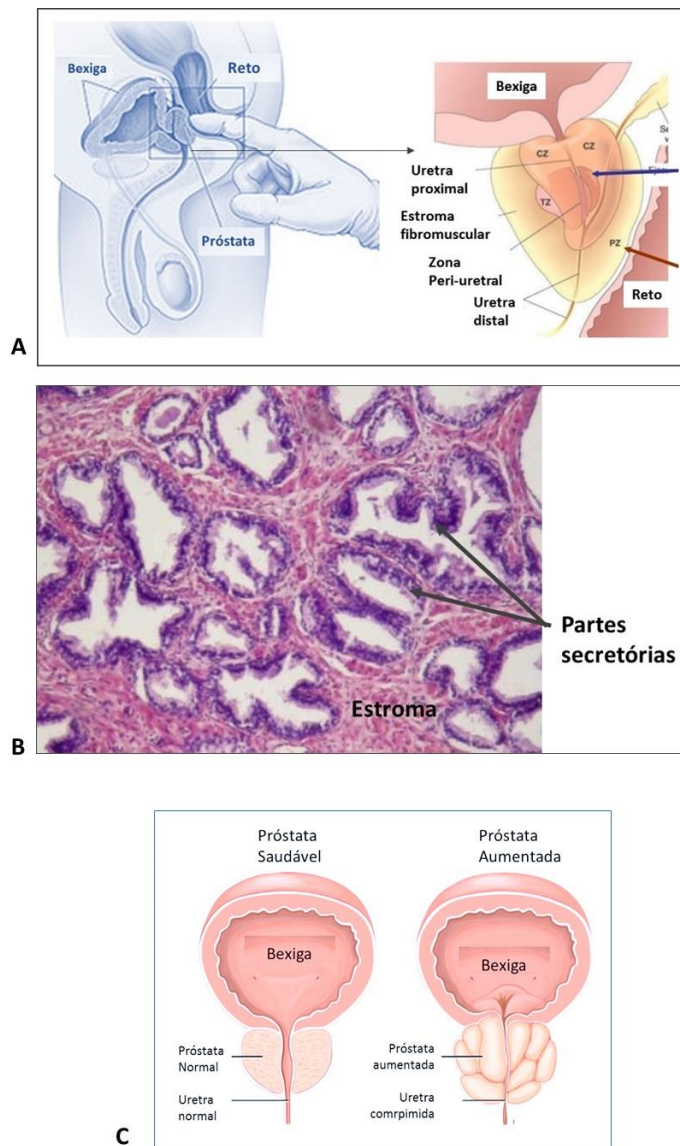
diversas características sexuais secundárias do homem, incluindo o crescimento da próstata (TANAGHO; MCANINCH, 2007).

Em termos histo-patológicos a próstata é dividida em três zonas: central, periférica e de transição. A zona periférica representa a porção subcapsular do aspecto posterior da próstata que envolve a uretra distal. Esta porção compõe 70% da próstata de adultos jovens saudáveis. Porém, 70% dos tumores malignos de próstata surgem nesta região. A zona central constitui aproximadamente 25% do órgão e envolve os ductos ejaculatórios. Os tumores malignos decorrentes de células nesta região já são menos frequentes (cerca de 25%). A zona transicional só representa 5% do volume total da próstata, e raramente está associada ao desenvolvimento de carcinomas. Ela envolve a uretra proximal e é a região da próstata que continua crescendo ao longo da vida do homem, o que quase sempre acaba resultado em uma condição encontrada em idosos que denominada hiperplasia prostática. Isto ocorre porque, em um homem jovem a próstata possui cerca de 20 g. No caso, a partir dos 31 anos de idade a próstata cresce em um ritmo de 0,4 g por ano. Assim, a próstata pode atingir um tamanho de 60 a 100 g em indivíduos com muita idade. Estima-se que 50% dos homens com 60 anos de idade sejam portadores de hiperplasia prostática e 90% dos que possuem entre 70 a 90 anos de idade (TANAGHO; MCANINCH, 2007)

Em termos anatômicos geralmente a próstata é dividida em “lobos”: lobo anterior (ou istmo) que corresponde a porção da zona transicional, lobo posterior que corresponde a zona periférica e lobo mediano que corresponde a zona central. Ainda existem os lobos laterais que correspondem a todas as zonas (TANAGHO; MCANINCH, 2007).

O câncer de próstata é classificado como um adenocarcinoma ou câncer glandular. Isto porque geralmente são as células glandulares secretoras de sêmen que sofrem e acumulam mutações que as transformam em células cancerosas (KYPRIANOU; ISAACS, 1989).

Figura 1 Próstata: (A) Localização anatômica; (B) Aspectos histológicos da próstata; (C) Comparação entre uma próstata saudável e hiperplásica.



Fonte: modificadas de Google Imagens.

Uma vez que haja a transformação maligna das células, em um primeiro momento as células cancerosas se mantêm confinadas dentro da parte glandular da próstata, o que ocasiona uma condição conhecida como carcinoma *in situ* ou neoplasia intraepitelial prostática. Entretanto, com o decorrer do tempo tais células podem aumentar muito a sua taxa de multiplicação invadindo o estroma da própria glândula. Esta condição forma o tumor que pode crescer bastante, a ponto de invadir os tecidos e órgãos vizinhos como as vesículas seminais e o reto (KYPRIANOU,

ISAACS, 1989). As células tumorais têm capacidade metastática sendo os principais órgãos onde ocorre metástase do câncer de próstata os ossos, linfonodos, reto e bexiga urinária (KYPRIANOU; ISAACS, 1989).

Devido a agressividade e a necessidade de tratamentos adjuvantes a terapia já existente, porém clinicamente não bem sucedida, novos estudos vêm sendo realizados com compostos bioativos, e a conjugação destes compostos para novas matrizes reforçam a biodisponibilidade destas moléculas, tendo como alvo somente as células cancerosas, trazendo vantagens aos produtos naturais derivados de plantas comestíveis (nutracêuticos) sob os medicamentos sintéticos (KALLIFATIDIS et al., 2016).

Em um estudo descrito por Shamaladevi e colaboradores (2013) mostrou o potencial efeito antitumoral do extrato aquoso da pimenta da Jamaica, inibindo a proliferação de células tumorais e a formação de colônias, além da progressão do ciclo celular em G1/S. Este efeito antitumoral foi observado também devido a uma diminuição dos níveis do receptor de andrógeno (AR), mecanismo eficaz já conhecido para o tratamento do câncer de próstata. Os compostos bioativos deste extrato tais como eugenol-5-O β - e/ou ericifilon apresentaram atividade antiproliferativa, pro-apoptose e atividade de transcrição anti- AR.

A capsaicina, um composto majoritário das pimentas vermelhas também apresentou ação antitumoral em células de câncer de próstata, a partir de um efeito antiproliferativo, induzindo a apoptose associado com um aumento das proteínas p53, p21 e Bax. A capsaicina também inibiu a ativação de TNF- α , impedindo sua migração nuclear (MORI et al., 2006).

Em estudos anteriores, pacientes com câncer de próstata avançado e tratados com privação hormonal, mostrou-se um fenótipo mais agressivo da doença (SHAMALADEVI et al., 2013; CHA et al., 2005). Devido o receptor de andrógeno desempenhar um papel fundamental na iniciação do tumor, o estudo descrito por Cha e colaboradores (2005) mostrou a importância da busca de novos agentes eficazes na regulação da AR para tratar e prevenir a progressão da doença. A emodina, um composto natural, pode ter como alvo diretamente AR para suprimir o crescimento de células de câncer de próstata.

Há evidências que o sulforafano, composto bioativo com propriedade anticarcinogênica, presente em alimentos como brócolis, couve, repolho-roxo, pode

induzir a progressão do câncer de próstata, através da inibição de histona-desacetilase 6. Além de que este efeito estaria envolvido com a hiperacetilação da HSP90 (chaperona chave) que desestabilizaria os receptores de androgênio e atenuariam sua sinalização (GIBBS et al., 2009).

Outra molécula bioativa derivada de uma planta, ácido betulínico, possui potencial efeito antitumoral, agindo somente nas células com malignidade e não nas células saudáveis, o que a torna um agente cancerígeno bastante atraente como um tratamento coadjuvante a terapia convencional. Este efeito foi observado através da diminuição das oncoproteínas e aumento da morte celular por apoptose (REINER et al., 2013).

Agentes quimiopreventivos promissores no câncer de próstata descritos por Fuganti e colaboradores (2003) são retinóides, antiandrogênicos, vitaminas D e E, selênio dentre outros, que atuam sobre o período da carcinogênese, previamente ao desenvolvimento da neoplasia invasiva, ou seja, quando os mecanismos de controle celular ainda estariam intactos. Uma das investigações observou que em homens com nível plasmático de selênio baixo estava associado a um maior risco de câncer de próstata quando comparado com homens normais, e quando suplementados com selênio reduziu o risco da doença. O mecanismo para tal efeito envolveu indução de apoptose, modificação do citocromo p450 e a imunoestimulação.

2.3 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que afetam segmentos do intestino grosso (o cólon) e do reto. A maioria dos CRC começa a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Segundo a Organização Mundial da Saúde, é possível observar que no mundo, CRC foi responsável por quase 835.000 mortes em 2015. Em termos epidemiológicos, o CCR é o terceiro câncer mais prevalente diagnosticado em países desenvolvidos, como os Estados Unidos. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que em 2018 serão diagnosticados 36.360 novos casos de CCR.

No Brasil, Oliveira et al (2013) fizeram uma análise de tendência de mortalidade por CCR no período de 1980 a 2013. Estes autores observaram que as taxas de mortalidade estão aumentando, no período analisado, tanto para homens

quanto para as mulheres. Entretanto o aumento da mortalidade por CCR é maior na população mais idosa. Os autores também destacaram que variações nas taxas de incidência e mortalidade de CRC indicam a importância de fatores ambientais em a ocorrência de CRC e o potencial para prevenir CRC diagnósticos. Idade e história dos pólipos adenomatosos ou doença inflamatória intestinal são os principais não modificáveis fatores relacionados ao CCR, enquanto o álcool e tabagismo, sedentarismo e hábitos alimentares são alguns dos principais fatores etiológicos em sua incidência. Por este motivo, investigações que auxiliem na identificação de alimentos e suplementos alimentares que possam prevenir ou controlar o CCR são relevantes para o Brasil e para o mundo.

2.4 Origem Epitelial do Câncer

Em geral, o câncer é considerado uma doença do desenvolvimento, porque envolve alterações na divisão e diferenciação celular. Na célula saudável, a divisão celular é controlada basicamente por dois grupos de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, os primeiros estimulam a divisão celular, já os últimos exercem uma ação inibitória, dessa forma o crescimento celular é controlado. Entretanto, mutações nesses genes podem ocorrer e, dessa forma, desencadear o desenvolvimento de um grupo de células com crescimento desordenado que tem potencial para invadir outros tecidos e se espalhar para outros órgãos do corpo (metástases), o que caracteriza o câncer (FARIA; RABENHORST, 2006; PACKER; MAITLAND, 2016).

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento de células transformadas (DE ALMEIDA et al., 2005).

A formação e crescimento do tumor podem ser divididas em quatro etapas: (1) transformação maligna; (2) crescimento da célula transformada; (3) invasão local; e, (4) metástase. O acúmulo de mutações gerado em uma célula pode levar a transformação maligna, desencadeando o processo tumoral que pode levar até mesmo anos para que o tumor seja detectado (INCA, 2012).

O estágio de iniciação do processo tumoral é a primeira etapa onde a célula é acometida por mutações genéticas desencadeadas por agentes carcinogênicos

(oncoiniciador). Já no estágio de promoção as células alteradas entram em contato com agentes oncopromotores, sendo a célula iniciada transformada em célula maligna de uma forma lenta e gradual, sendo necessário o contato longo e contínuo com o agente cancerígeno promotor, muitas vezes, a suspensão desse contato interrompe o processo tumoral. O estágio de progressão é uma etapa irreversível, pois as células tumorais começam a crescer descontroladamente promovendo a instalação do câncer e a manifestação de sintomas clínicos da doença. Ainda, algumas células tumorais podem se desprender do tecido que estavam instaladas, e por meio da corrente sanguínea podem ser levadas para um tecido adjacente, e cometer outro órgão, esse processo é denominado metástase (INCA, 2012; INCA 2016).

Este deslocamento das células tumorais pode ser feito através da circulação sanguínea, linfática e nas cavidades do corpo como peritônio, pleura ou espaços subaracnóides. A grande maioria das células metastáticas são destruídas por apoptose ou através da ação lítica de células citotóxicas, as sobreviventes se fixam em nova região onde podem desenvolver novos tumores ou manter-se em repouso. Sendo assim, nesse novo microambiente, estas células metastáticas iniciam a fase de colonização, proliferação e formação de um tumor secundário (PIACENTINI; MENEZES, 2012).

Outra questão importante relacionada a biologia do câncer é a revisada por Barreto e colaboradores (2011) que indica grande relevância da função imunológica no controle do câncer. Em geral, as células imunológicas agem para reparar os tecidos que sofreram lesões, as células cancerígenas produzem as mesmas células inflamatórias, como prostaglandinas, citocinas e leucotrienos para manterem o crescimento e desenvolvimento da lesão tumoral, assim induzindo sua própria proliferação e tornando-as as barreiras próximas mais permeáveis. Entretanto, o excesso destas substâncias inflamatórias acarreta o bloqueio da apoptose, contribuindo para a proliferação desordenada das células cancerosas.

Na vasta maioria dos casos a carcinogênese ocorre em células de origem epitelial, já que as mesmas possuem uma alta taxa proliferativa e apresentam características limitadas de senescência celular. Geralmente, mutações genéticas irão ocorrer nas células-tronco do epitélio presentes na camada germinativa do tecido que produz constantemente novas células epiteliais, tanto no tecido queratinizado, como é o caso da pele quanto no tecido não-queratinizado como é o caso das células quer

recobrem o trato gastrointestinal e também estão presentes em glândulas como a próstata (WEEDEN E ASSELIN-LABAT, 2018).

Portanto, a manutenção da integridade genômica em células-tronco específicas para tecidos epitelial é fundamental para a homeostase dos tecidos e a prevenção de doenças deletérias, como o câncer. Isto porque, estas células-tronco estão sujeitas a danos no DNA induzidos por contratemplos de replicação endógena ou exposição a agentes exógenos. O tipo de lesão do DNA e o estágio do ciclo celular induziram diferentes mecanismos de reparo do DNA, dependendo do mecanismo de reparo do DNA intrínseco de uma célula. O reparo inadequado do DNA em células-tronco pode levar à morte celular ou à formação e ao acúmulo de alterações genéticas que podem ser transmitidas para as células filhas e, portanto, estão ligadas à formação do câncer (WEEDEN E ASSELIN-LABAT, 2018).

Neste contexto, a identificação de fatores que podem contribuir para minimizar a taxa de mutações e, deste modo a iniciação e progressão do câncer é de grande relevância científica, epidemiológica e clínica.

2.5 Papel do metabolismo oxidativo no câncer

2.5.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é uma condição produzida pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em um sistema biológico. O desequilíbrio ocorre devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou funcionamento inadequado do sistema antioxidante. Embora o oxigênio seja essencial para a vida e esteja envolvido na transdução de sinais, transcrição genica e outras atividades celulares, coincidentemente também possui um efeito deletério sobre biomoléculas na forma de radicais livres (RL) e EROs (SINGH et al., 2019).

O oxigênio, por exemplo, durante o transporte de elétrons na mitocôndria pode ser reduzido parcialmente gerando EROs, tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) que podem levar a danos ao DNA, RNA, lipídeos e proteínas. Além da fragmentação do DNA, as EROs podem causar mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento

de doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (SILVA & JASIULIONIS, 2014; SHAFI et al., 2019).

2.5.2 Defesas antioxidantes

Para combater a intensa produção de EROs, as células humanas possuem a capacidade de desenvolver um mecanismo de defesa, denominado sistema de defesa antioxidante, que atua na prevenção e reparo físico e químico dos danos oxidativos nos diversos sistemas orgânicos (SHAO et al., 2012).

Usualmente esse sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático. Dentre os enzimáticos, incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação de O_2 para H_2O_2 , enquanto a CAT e GPx convertem subsequentemente H_2O_2 em H_2O e O_2 , impedindo assim a produção excessiva de OH^- , a espécie mais reativa (BARBOSA et al., 2010; CERUTTI, 1985; OBERLEY, 1980).

Já o sistema não-enzimático é composto por uma variedade de substâncias antioxidantes, principalmente de origem dietética, nas quais se destacam as vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores da vitamina A e E, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio (BARBOSA et al., 2010).

Os antioxidantes naturais como por exemplo, compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides, contidos em muitas frutas e vegetais presentes em baixas concentrações dentro das células, são eficazes na redução dos RL como sistema de proteção em diversas doenças. Estes possuem forte potencial para inibir o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e oxidação de produtos de degradação, podendo atuar sozinhos ou em sinergia para manter o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (SHAFI et al., 2019).

2.5.3 Superóxido dismutase e câncer

Existem evidências que associam o estresse oxidativo ao envelhecimento biológico e a mais de 200 tipos de doenças e disfunções crônico-degenerativas.

Entretanto, ao contrário do que se pensava há 50 anos atrás, espécies ativas de oxigênio (EAOs) e espécies intermediárias de nitrogênio (EINs) não têm somente efeitos negativos no organismo, já que em baixos níveis e em condições altamente reguladas muitas destas moléculas são importantes sinalizadores celulares como é o caso do óxido nítrico (ON) e do peróxido de hidrogênio (PH). Em uma célula aeróbica saudável, ocorre produção continuada do ânion S, como subproduto da respiração mitocondrial. Para controlar os níveis desta molécula existe um sistema antioxidante endógeno enzimático formado por enzimas que dismutam o S em PH (superóxido dismutases, SOD) e de enzimas que catalisam o PH em água e oxigênio (catalase, CAT e glutaciona-peroxidase, GPX) (BRESCIANI et al., 2013).

Estudos epidemiológicos e experimentais identificaram a ocorrência de uma SNP no gene da enzima SOD2 (SOD dependente de manganês) que atua dentro da mitocôndria (rs4880). No caso, a mitocôndria é a organela que mais produz S via vazamento de elétrons durante as reações mitocondriais, em especial a cadeia fosforilativa relacionada a produção do ATP a partir de glicose e oxigênio. Neste processo, cerca de 5% do oxigênio perde dois elétrons na última camada e se transforma no AS que é uma espécie reativa de oxigênio (EAO). Esta EAO é então substrato da enzima glutaciona peroxidase (GPX) que também atua dentro da mitocôndria para transformar o PH em água e oxigênio (BRESCIANI et al., 2013).

Como a SOD2 é uma enzima produzida a partir de um gene nuclear, inicialmente é sintetizada uma proteína SOD2 inativa que possui uma sequência peptídica MTS (*Mitochondrial Target Sequence*) que direciona a proteína para a membrana interna mitocondrial onde a enzima torna-se ativa. O polimorfismo ocorre no códon 16 da sequência MTS levando a substituição de uma valina por uma alanina que, modifica a conformação proteica da SOD2. Como a SOD2 produzida pelo alelo valina tem a forma de beta-lamina, ela fica parcialmente retida na membrana interna mitocondrial e este fenômeno faz com que a enzima seja menos eficiente. Por outro lado, a presença da alanina faz com que a proteína SOD2 possua uma forma alfa-hélice permitindo a entrada fácil da mesma para o interior da mitocôndria. Estima-se que o genótipo AA produza uma enzima 40% mais eficiente que o genótipo homozigótico VV (BRESCIANI et al., 2013).

Ao contrário do que se possa pensar, a maior eficiência da enzima relacionada ao genótipo AA não é benéfica a célula e ao organismo. Isto porque, o aumento dos

níveis de PH não é acompanhado pelo aumento da GPX. Como o PH é mais solúvel em membranas, o excesso desta EAO extravasa para o citoplasma, onde reage com ions metais como o cobre e zinco (reação de Fenton) produzindo hidroxila (OH⁻). Ao contrário do AS e HP, a OH⁻ não possui enzimas específicas que a catalisem, e por também ser uma molécula altamente reativa o aumento nos seus níveis pode causar danos extensivos a célula, em especial ao DNA. O radical OH⁻ tem alta afinidade com o DNA causando quebras e mutações. Por este motivo, estudos epidemiológicos têm descrito associação entre alguns tipos de câncer (mama, próstata, pulmão) com o genótipo AA (TAUFER et al., 2005; BICA et al., 2009; BRESCIANI et al., 2013).

Um estudo feito por Ambrosone et al (1996) mostrou que mulheres portadoras do genótipo AA possuíam quatro vezes mais chance de desenvolver câncer de mama que as demais. Entretanto, este risco caía a zero nas mulheres portadoras do genótipo AA que apresentavam alto consumo habitual de frutas e verduras. Estudos complementares *in vitro* também acabaram observando que fatores presentes na dieta, como é o caso do resveratrol poderiam modular a resposta oxidativa e inflamatória associada ao polimorfismo Val16Ala-SOD2 (CAPELETTO et al., 2015).

Por outro lado, o genótipo VV por possuir uma enzima SOD2 menos eficiente possui aumento basal nos níveis de AS. Uma vez que virtualmente todas as células sintetizam óxido nítrico (ON), e que existe uma grande afinidade entre o AS e o ON, a reação entre estas duas moléculas produz uma espécie ativa de nitrogênio (EAN) chamada peroxinitrito. O peroxinitrito reage com lipídios presentes nas membranas das organelas e membrana plasmática em um processo conhecido como lipoperoxidação. Este processo causa danos extensivos as células. O AS também pode produzir por auto-reação níveis elevados de PH, OH⁻ e outras moléculas de EAOs que podem causar carbonilação de proteínas e também genotoxicidade (SCHOTT et al., 2017). Provavelmente por este motivo, o genótipo VV tem sido associado ao risco de doenças cardiometabólicas, já que induz inflamação crônica (DUARTE et al., 2016; BARBISAN et al., 2017).

2.5.4 Modelo *in vitro* de desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio

Para melhor investigar o impacto do desbalanço S-PH na célula, um modelo experimental foi criado onde células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

obtidas de indivíduos previamente genotipados para o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e cultivadas *in vitro*. O primeiro estudo avaliou se este polimorfismo influenciava na toxicidade celular causada pela exposição de raios ultravioletas. Os resultados mostraram que CMSP-AA apresentavam níveis mais elevados de genotoxicidade enquanto que CMSP-VV de lipoperoxidação (MONTAGNER et al., 2010).

Posteriormente, diversos estudos foram conduzidos onde se observou o efeito deste polimorfismo na resposta antioxidante do fármaco citrato de clomifeno (COSTA et al., 2013), na modulação dos níveis de citocinas inflamatórias de células suplementadas com o fármaco metrotrexato (BARBISAN et al., 2014) e na resposta anti-inflamatória e na modulação diferencial do gene da Sirtuina 1 que é considerado um gene da longevidade de células suplementadas com resveratrol (CAPELETO et al., 2015). Investigações adicionais mostraram que células portadoras do genótipo AA eram mais suscetíveis a exposição a metil mercúrio do que as demais (ALGARVE et al., 2013) o mesmo ocorrendo quando eram expostas a campos eletromagnéticos estáticos de 5 Mt (DORNELLES et al., 2016).

Os resultados obtidos corroboraram a ideia de que o desbalanço bidirecional S-PH é uma reação chave na disfunção celular que leva ao estabelecimento de doenças crônicas não-transmissíveis, em especial a mutações pró-carcinogênicas. Entretanto, como poderiam haver fatores genéticos e ambientais intervenientes importantes relacionados aos resultados obtidos, um novo modelo farmacológico *in vitro* foi desenvolvido para testar o desbalanço bidirecional S-PH. Neste modelo, foi utilizada a suplementação *in vitro* de paraquat (metilviologênio) que produz níveis elevados de AS e a porfirina que é uma molécula similar a enzima SOD2 para produzir níveis elevados de PH. Os dois primeiros estudos realizados com este modelo avaliaram o efeito do desbalanço na biologia de linhagem comercial de câncer de próstata (BERTO et al., 2015) e linhagem comercial de câncer colorectal (AZZOLIN et al., 2016). No caso, células de câncer de próstata mostraram suscetibilidade aumentada ao PH enquanto que células de câncer colorectal ao AS. Estes resultados sugeriram que a resposta ao desbalanço AS-PH de células de câncer não é universal, e sim dependente do tecido de origem do câncer. Outro resultado importante obtido a partir destes estudos foi o de que desbalanço bidirecional afetou a suscetibilidade e resistência de células cancerosas a quimioterápicos.

Considerando que o modelo do desbalanço farmacológico S-HP está bem estabelecido para as células de câncer de próstata e câncer colorretal, o estabelecimento de um modelo similar em queratinócitos saudáveis seria relevante em estudos que visam prevenir o aparecimento de mutações pró-carcinogênicas.

2.6 Dieta e a epidemiologia do câncer

Investigações apoiadas pela OMS sugerem que alterações na dieta tem efeitos positivos e negativos na saúde durante toda vida, sendo que as modificações dietéticas podem não somente influenciar o estado de saúde presente como também podem determinar se um indivíduo desenvolverá ou não alguma doença como por exemplo, o câncer (INCA, 2016; PERIN, 2013). Estudos epidemiológicos sugerem que uma ingestão regular de baixa gordura e alta quantidade de fibra alimentar acompanhada de frutas e hortaliças diminui os riscos de todos os tipos de cânceres (ZHOU, 2016; JANSEN et al, 1999).

Dentro das pesquisas que reforçam o papel da dieta na saúde, e em especial no desenvolvimento do câncer, estão aquelas que investigaram o papel da Dieta do Mediterrâneo. Nestas últimas décadas, estudos epidemiológicos descreveram que a taxa de incidência de câncer em países do Mar Mediterrâneo era mais baixa quando comparada a países do Norte Europeu, do Reino Unido e dos Estados Unidos. Estes dados levaram a produção de uma extensa quantidade de investigações em modelos experimentais que fortaleceram a hipótese de que a “Dieta do Mediterrâneo” tinha um papel de grande relevância na saúde e longevidade humana (BRAY et al., 2013; DINU et al., 2018). Estudos do tipo ensaio clínico, no qual os sujeitos da pesquisa aderiram a uma dieta do mediterrâneo também mostraram que a mesma foi efetiva para prevenir doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) incluindo morbidades cardiovasculares, neurodegenerativas e diabetes mellitus do tipo II. Também foi postulado que a dieta do Mediterrâneo teria efeito preventiva contra o câncer, entretanto, os dados muitas vezes eram controversos (D’ALESSANDRO et al., 2016; DINU et al., 2018). Uma metanálise mais recente conduzida por Schwingshackl e Hoffmann (2016) sugeriu que, de fato a dieta do Mediterrâneo poderia reduzir o risco de mortalidade de todos os tipos de câncer e da incidência de alguns tipos de câncer,

em especial o câncer de pulmão, de estômago, pâncreas, cabeça e pescoço, fígado, próstata e câncer colorretal.

2.7 Câncer e os polifenóis

Estes resultados reforçam as evidências de que a dieta é essencial para prevenir o surgimento do processo tumoral, já que estudos apontam que há menores taxas de câncer de próstata observadas em vegetarianos e residentes no Japão e na China, onde o consumo de frutas e vegetais é alto (BOAM, 2015). Outro estudo demonstrou que uma dieta rica em frutas e hortaliças podem estar associadas a baixas taxas de incidência ao câncer, devido à presença de componentes fenólicos, terpenos, glicosinolatos, minerais dentre outros que teriam função antioxidante e anticarcinogênica (FERNANDES; MAFRA, 2005).

Na realidade, a eficácia anticarcinogênica de muitos alimentos está diretamente associada a presença de compostos secundários, em especial os polifenóis. Estas moléculas possuem diversas atividades potentes como é o caso da sua ação antioxidante e anti-inflamatória tendo capacidade de modular diversas funções de citohistológica com destaque a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular, modulação d angiogênese, resposta a hormônios, da desintoxicação e também da resposta imune (ZHOU et al., 2016).

A presente revisão resumiu descobertas recentes sobre as propriedades anticancerígenas dos polifenóis naturais e discutiu os mecanismos de ação, que foram baseados em evidências de estudos epidemiológicos, experimentos de laboratório e ensaios clínicos (Tabela 1) (ZHOU et al., 2016).

Tabela 1 Ingestão de polifenóis na dieta e risco de câncer

Cancer	Polifenóis	Estudo	Risco de câncer	Referência
Câncer de pulmão	Flavonóides	Caso- controle	0,63	Christensen et al., 2012
Câncer de intestino	Flavonóides	Caso- controle	Nenhuma associação significativa	Petrick et al., 2015
	Flavonóides	Caso- controle	0,33	Woo et al., 2014
Câncer colorretal	Flavonóides	Estudo de coorte	Nenhuma associação significativa	Nimptsch et al., 2016
	Flavonóides e lignanas	Caso- controle	Total flavonoides 0,59 Lignanas 0,59	Zamora Ros et al., 2013
	Polifenóis	Caso- controle	Nenhuma associação significativa	Wang et al., 2013
	Isoflavonas	Meta- análise	0,76	Tse & Eslick, 2016
Carcinoma Hepatocelular	Flavanol	Estudo de coorte	0,62	Zamora Ros et al., 2013
Câncer de mama	Flavonóides	Meta- análise	Flavanol 0,88 Flavonas 0,83 Nenhuma associação significativa para flavonóides totais ou outras subclasses	Hui et al., 2013
	Isoflavonas	Meta- análise	0,68	Xie et al., 2013
	Flavanol	Estudo de coorte	0,81	Wang et al., 2014
Câncer de próstata	Flavonóides	Estudo de coorte	1,15	Wang et al., 2014
	Flavonóides	Estudo de coorte	Total catequinas 0,73 Epicatequina 0,74 Kaempferol 0,78 Miricetina 0,71	Geybels et al., 2013

Fonte: Zhou et al. (2016)

2.8 Projeto Idoso da Floresta e os Estudos sobre a Dieta Amazônica

A biodiversidade brasileira, em especial o Bioma Amazônico é muito rico em plantas medicinais, especialmente frutos que possuem atividade concomitante anti-inflamatória e antioxidante. Esta premissa está baseada em um levantamento bibliográfico sobre a ação cientificamente comprovada de 20 frutos nativos da Amazônia feita por Ribeiro & Cruz (2012). Este levantamento foi baseado em estudos realizados pelo Projeto Idoso da Floresta Amazônica desenvolvido pela Universidade Aberta da Terceira Idade da Universidade do Estado do Amazonas (UnATI/UEA) com o Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Inicialmente foi conduzida uma investigação que incluiu 1509 idosos que viviam na região altamente urbanizada de Manaus inseridos na Estratégia de Saúde da Família (ESF-SUS) mostrou um perfil epidemiológico de doenças crônicas não-transmissíveis bastante similar ao observado nas regiões Sul e Sudeste e também países desenvolvidos. Com alta prevalência de diabetes do tipo 2, hipertensão, hipercolesterolemia, obesidade e doenças cardiovasculares (RIBEIRO et al., 2008).

Com base nestes resultados foi questionado se este perfil também seria similar em idosos ribeirinhos que vivem no interior do Amazonas. Para responder esta questão inicialmente foi feito um estudo epidemiológico do tipo ecológico que identificou 10 municípios do Estado do Amazonas com maior frequência de idosos longevos (> 80 anos) e também com maior expectativa de vida. Dentre estes municípios foi escolhida a cidade de Maués para a condução dos estudos. Este município está parcialmente isolado na selva amazônica com acesso somente de avião ou barco. É composto por uma sede urbana que concentra cerca de 50% da população (em 2009 era de ~25.000) enquanto que a outra metade está espalhada em 175 pequenas comunidades ribeirinhas localizadas na grande quantidade de rios e iguarapés que compõe este município (RIBEIRO et al., 2008).

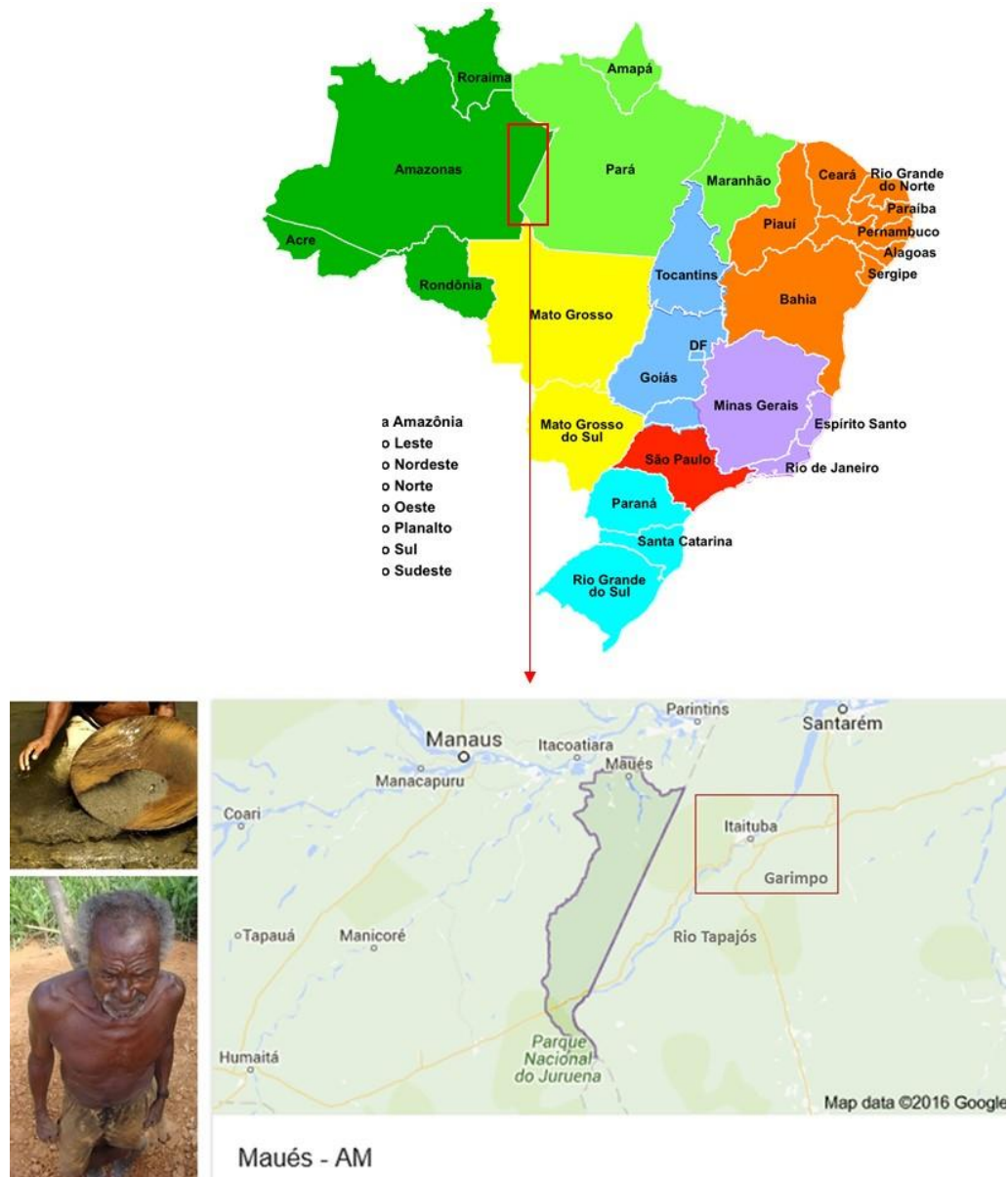
A partir da capacitação dos agentes de saúde da família que, em 2009 atendiam cerca de 92% da população de Maués foi possível coletar dados epidemiológicos dos idosos (> 60 anos). Os resultados foram surpreendentes uma vez que a comparação entre os 1509 idosos de Manaus e 1802 idosos de Maués mostrou que os ribeirinhos possuíam baixa prevalência de doenças crônicas não transmissíveis. Por outro lado, maior prevalência de fraturas e de histórico de doenças

transmissíveis com destaque a malária e leishmaniose foi encontrado nos idosos ribeirinhos (RIBEIRO et al., 2013).

Para validar os resultados obtidos, um estudo complementar que incluiu 637 idosos ribeirinhos foi conduzido. Nesta investigação variáveis antropométricas, dietéticas, bioquímicas, fisiológicas, antropométricas foram coletadas por uma equipe altamente capacitada. Este estudo contou com a presença de pesquisadores de outras universidades brasileiras e também da Universidade de Leon, Espanha. Análise de indicadores funcionais e de equilíbrio dos idosos ribeirinhos mostrou que as quedas eram mais relacionadas com fatores como o relevo e o transporte de barco do que com fragilidade dos idosos (MAIA-RIBEIRO et al., 2012).

Uma análise etnofarmacológica e dietética descreveu que os idosos ribeirinhos, ao contrário dos urbanizados, se alimentavam preferencialmente de peixes, frutos e subprodutos da mandioca e do milho. É interessante comentar que, relatos informações apontaram que uma grande parte dos idosos investigados trabalhou durante os anos 80 nos garimpos localizados no Estado do Pará no qual o Município de Maués faz divisa (Figura 2).

Figura 2 Mapa de localização geográfica de Maués no Estado do Amazonas. Mapa em destaque mostra o município de Maués-AM e sua proximidade com a área de garimpo de Itaituba-PA



Fonte: Adaptado de Google imagens.

Investigações longitudinais adicionais mostraram que idosos com níveis elevados de oxidação da albumina (AOPP) e baixa capacidade de realizar um teste funcional denominado “*time up and go*” (TUG) apresentavam mais chance de morrer após mais de quatro anos de seguimento (SILVA et al., 2014; ANTONINI et al., 2016).

Entretanto, extensa maioria dos idosos investigados em 2009 se mantiveram saudáveis e vivos até o presente momento ($\geq 70\%$).

Investigações sobre potenciais fatores genéticos que poderiam aumentar a longevidade desta população não têm encontrado resultados muito consistentes, sendo que a maioria dos mesmos não foi publicada, com exceção de um estudo que mostrou associação entre um polimorfismo pontual (SNP) no gene do receptor 2^a da serotonina (5-HT_{2A}), no qual ambos homozigotos (TT e CC) apresentam um desbalanço. Neste caso, os resultados mostraram que aqueles idosos com genótipo heterozigoto (TC) sobreviveram mais do que os idosos TT ou CC, indicando que tal gene poderia causar algum tipo de disfunção e aumentar o risco de mortalidade (SILVA et al., 2017).

O conjunto dos resultados a partir dos estudos transversais e longitudinais deixam de ser surpreendentes, já que apesar do baixo acesso aos serviços de saúde da população ribeirinha, exposição a agentes infectocontagiosos e também poluentes como o mercúrio utilizado no garimpo do ouro, os idosos avaliados apresentavam condição de saúde e aptidão funcional satisfatória. Passos e colaboradores publicaram um estudo epidemiológico que sugeriu que o consumo de frutas poderia diminuir a toxicidade do mercúrio de comunidades ribeirinhas amazônicas (PASSOS et al., 2007). Deste modo, assim como foram investigados aspectos da aptidão física e de marcadores genéticos nos idosos ribeirinhos, também foram implementados estudos sobre o impacto de elementos da dieta Amazônica na saúde e longevidade dos mesmos.

Uma vez que, foi em Maués que o guaraná (*Paullinia cupana*) foi domesticado pelos índios Saterê-Maués e é habitualmente consumido pela população ribeirinha local, para testar o impacto do consumo deste fruto na saúde dos idosos, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo que comparou 537 sujeitos que nunca consumiam guaraná, com sujeitos que consumiam habitualmente o pó de guaraná (> 3 vezes na semana). Os resultados mostraram que os consumidores de guaraná apresentavam menor prevalência de riscos cardiovasculares com obesidade, hipertensão e dislipidemia (KREWER et al., 2011). Investigações experimentais em roedores confirmaram a ação hipoglicemiante do guaraná (PORTELA et al., 2013). Um estudo conduzido por Krewer et al (2014) e Suleiman et al (2016) realizado em 14 pacientes com sobrepeso que ingeriram uma cápsula de 90 mg de pó de guaraná durante duas

semanas observou queda nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, marcadores do estresse oxidativo e também nos níveis de triglicerídeos.

Estes resultados reforçaram a hipótese de que a Dieta Amazônica constituída fundamentalmente por uma grande diversidade de frutos poderia ter uma influência positiva na saúde e longevidade dos idosos ribeirinhos. Para confirmar esta hipótese, inicialmente foi conduzido um levantamento de evidências científicas publicadas na literatura relacionadas com 20 diferentes frutos de origem amazônica. Este levantamento foi publicado sob a forma de um livro denominado *Dieta Amazônica: Saúde e Longevidade* por Ribeiro e da Cruz (2012). Investigações complementares sobre as propriedades biológicas do guaraná foram então conduzidas, bem como de outro fruto amazônico rico em carotenoides denominado tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). Os principais resultados obtidos a partir destes estudos são sintetizados na Tabela 2.

Estudos com outros frutos amazônicos também começaram a ser conduzidos, incluindo o cubiu (*Solanum sessiflorum*), a castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*) e o açaí (*Euterpe oleraceae*). Entretanto, muitos dos resultados ainda estão em fase de publicação. Em relação ao açaí, uma investigação importante conduzida por Machado et al (2016) sugeriu que este fruto poderia prevenir ou reverter disfunção mitocondrial em células neurais da linhagem ShSY-5Y. Este estudo destacou a relevância das propriedades funcionais do açaí de interesse na prevenção e tratamento de alguns tipos de câncer de origem epitelial, como é o caso do câncer de próstata e o câncer colorretal.

Tabela 2 Propriedades funcionais de frutos amazônicos analisadas no Projeto Idoso da Floresta Amazônica (UnATI/UEA e UFSM) no período de 2013 a 2018.

Fruto	Principais Resultados	Referencias
Guaraná	Modulação do estresse oxidativo causado pela exposição de células embrionárias de fibroblastos NIH-3T3 ao nitroprussiato de sódio que aumenta os níveis de óxido nítrico	Bitterncourt et al. 2013
	O guaraná diminuiu os níveis de oxidação do LDL-colesterol tanto <i>in vitro</i> quanto <i>in vivo</i>	Portella et al., 2013
	Células da linhagem MCF-7 de câncer de mama apresentaram aumento a sensibilidade de 7 quimioterápicos quando o meio foi suplementado da cultura com guaraná	Hertz et al., 2015
	O guaraná melhorou a taxa de proliferação celular de células-tronco senescentes obtidas de lipoaspiração	Machado et al., 2015
	O guaraná tem efeito genoprotetor e hepatoprotetor em ratos expostos ao poluente ambiental CCl ₄ .	Kober et al., 2016
	O guaraná diminuiu os níveis de colesterol de ratos hipercolesterolêmicos via modulação anti-inflamatória associada ao sistema purinérgico;	Ruchel et al., 2016
	O guaraná aumentou a sensibilidade a oxiplatina da linhagem resistente de células do câncer coloretal HT-29.	Cadoná et al., 2016
	O guaraná possui atividade antitumoral em células do câncer coloretal HT29 via inibição das rotas AKT/Mtor/S ³ K e MAPKs	Cadoná et al., 2017
	A viabilidade de espermatozoides humanos congelados aumentou na presença de um composto com matriz química similar a do guaraná	Werner et al., 2017
	Células neurais SH-SY5Y foram protegidas contra a ação tóxica da vincristina que mimetiza a doença em Alzheimer quando o meio de cultura foi suplementado com guaraná	Veloso et al., 2018
Tucumã	O tucumã apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>) e o fungo <i>Candida albicans</i>	Jobim et al., 2013
	O tucumã possui efeito genotóxicos em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) somente em altas concentrações	Cezimbra et al., 2013
	O tucumã diminuiu os efeitos genotóxicos causados pela exposição de CMPs ao peróxido de hidrogênio	Sagrillo et al., 2015
	O tucumã apresentou atividade antioxidante e anti-hiperlipidêmica em ratos com diabetes induzida pelo aloxano.	Baldissera et al., 2017

2.9 Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart., 1824): um potente alimento funcional oriundo da Amazônia

O açaí (*Euterpe oleracea*), conhecido como açazeiro (Figura 3), pertence à família *Arecaceae* (JONES, 1995). O epíteto genérico é uma homenagem a Euterpe, deusa da mitologia grega e traduzido do grego significa “elegância da floresta”, devido a beleza da planta (MARCHIORI, 1995; HODGE, 1965).

O açazeiro é uma palmeira, que quando adulta pode atingir de 3m a 20m, o fruto (Figura 4 e 5) é uma drupa globosa, o epicarpo na maturação pode ser roxo ou verde. O mesocarpo é polposos, envolvendo um endocarpo volumoso e contendo no seu interior uma semente (HENDERSON & GALENO, 1996; OLIVEIRA et al., 1998; CAVALCANTE, 1991).

Figura 3 População de açazeiro (*Euterpe oleracea*).



Fonte: Adaptado por Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
(www.inpa.gov.br)

Figura 4 Fruto do açaí (*Euterpe oleracea*).



Fonte: Adaptado por Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
(www.inpa.gov.br)

Figura 5 Frutos inteiros e descerrado do açaí (*Euterpe oleracea*).



Fonte: Adaptado por Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
(www.inpa.gov.br)

É um fruto nativo da região amazônica, é considerado um alimento funcional com propriedades terapêuticas e estimulantes. Essas características são atribuídas devido a sua composição nutricional, a qual contém alto teor de lipídios, como ômega 6 e 9, que são importantes para evitar o desenvolvimento de doenças

cardiovasculares, além de conter carboidratos, fibras, vitamina E, proteínas, minerais (Mn, Fe, Zn, Cu e Cr) e ampla concentração de antioxidantes (PORTINHO, 2012).

O consumo do açaí está em crescente avanço, pois além de suas propriedades benéficas a saúde é economicamente muito utilizado na produção de bebidas, principalmente as revigorantes, já que a sua polpa apresenta elevado valor energético (YAMAGUCHI et al., 2014). Ainda, no campo econômico o açaí é muito utilizado para a fabricação de cosméticos, onde as suas propriedades nutritivas e protetoras são muito exploradas (BAUMANN et al., 2009).

O açaí também é amplamente investigado por suas propriedades antienvhecimento, especialmente por ser rico em antioxidantes, como os 38ntioxidant, antocianinas e polifenóis, que são os fitoquímicos predominantes (LICHTENTHÄLER et al., 2005).

Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase 1 (SOD1), responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais quando produzidas em excesso, podem danificar moléculas biológicas importantes e contribuir para acelerar o processo de senescência e morte celular, são moduladas pelo açaí. Estudos relataram que uma superexpressão da SOD1 pode aumentar a longevidade enquanto mutações nessa enzima reduziram a longevidade em *Drosophila melanogaster* (MARTIN et al., 2009). Pesquisas apontam que o consumo do açaí prolonga o efeito antienvhecimento da SOD1 (SUN et al., 2010).

Além de efeitos na longevidade o açaí parece ser um promissor agente antioxidante e antiinflamatória, pois estudos já relatam a sua ação inibitória da ciclooxigenase COX-1 e COX-2. Essa ação envolvida na redução do processo inflamatório e na nocicepção (conjunto das percepções da dor), é devida principalmente a fração lipídica da polpa do açaí, que é composta por aproximadamente 24% de ácidos graxos saturados, 59% de ácidos graxos monoinsaturados e 17% de ácidos graxos poliinsaturado (FAVACHO et al., 2010).

Ainda, o açaí poderia diminuir o risco de obesidade associadas a doenças crônicas como a diabetes do tipo 2, já que os polifenóis, presentes em grandes quantidades nesse fruto, são responsáveis por modular favoravelmente o metabolismo lipídico e a homeostase da glicose, reduzindo consequentemente os riscos de síndrome metabólica e as complicações do diabetes do tipo 2 (DEMBINSKA-KIEC et al., 2008).

Adicionalmente, os compostos antioxidantes do açaí apresentam efeitos neuroprotetores, como descrito por Souza-Monteiro e colaboradores (2015), o açaí apresentou propriedades anticonvulsionantes e neuroprotetoras em ratos.

Diante do descrito por vários pesquisadores, os constituintes nutricionais do açaí, tornam esse fruto um excelente alimento funcional, já que o mesmo pode atuar na regulação de um grande número de rotas essenciais para a homeostase corporal, e conseqüentemente, garantir assim, uma melhora significativa na qualidade de vida.

Ao encontro disso, estudos ainda destacam uma importante atividade antitumoral do açaí, o qual pode promover a inibição da proliferação de células tumorais, muitas vezes, resistentes à quimioterapia (DIAS et al., 2014; RODRIGUES et al, 2014).

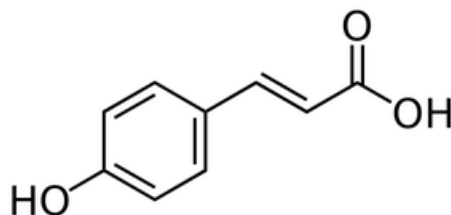
2.10 Principais moléculas bioativas do açaí

O açaí tem uma matriz química rica em moléculas bioativas, entre os quais se incluem:

2.10.1 Ácido p- cumárico

O ácido p- cumárico (Figura 6) é um isômero abundante derivado do ácido cinâmico, encontrado em plantas comestíveis, tais como amendoins, tomate e cenoura, possui relatos na literatura de atividade antitumoral e antimutagênica (JAGANATHAN et al., 2013).

Figura 6 Estrutura química do ácido p- cumárico.



Fonte: BOO (2019)

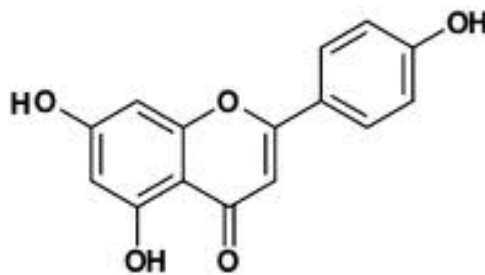
Em um estudo recente de Pei e colaboradores (2016) mostrou que ácido p-cumárico é um precursor de outros compostos fenólicos, existente na forma livre ou conjugada. Devido a suas atividades biológicas, tais como antioxidantes, anticarcinogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória, ansiolítica, antipirética, analgésica dentre outras, vêm sendo estudada nos últimos anos.

Em células de câncer de cólon das linhagens HT- 29 e HCT- 15, o ácido p-cumárico apresentou atividade antiproliferativa, através da indução da apoptose. Além da interrupção do ciclo celular na fase G1, e aumento das EROS, o que indica que este composto inibiria o crescimento das células cancerígenas através da indução de apoptose via EROS-mitocondrial (JAGANATHAN et al., 2013).

2.10.2 Apigenina

A apigenina (Figura 7) é conhecida como um flavonóide bioativo existente em abundância em diversas frutas, bebidas e vegetais derivados de plantas como a salsa, laranja e camomila e em alguns temperos, além de ser componente do vinho tinto com propriedades anti-inflamatória, antioxidante e anticarcinogênica (SHUKLA; GUPTA, 2010).

Figura 7 Estrutura química da apigenina.



Fonte: Lee et al. (2019)

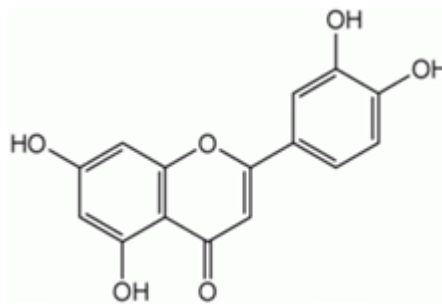
Wang e colaboradores (2016) em pesquisa recente salientaram que a apigenina já foi utilizada como um agente quimiopreventivo, e que este composto pode ter efeitos benéficos para o tratamento do câncer de próstata através da inibição da

produção de androgênio. Neste estudo, os pesquisadores observaram que a apigenina apresentou ser um potente inibidor de enzimas esteroidogênicas em ratos e humanos, sendo esta possível utilização para o tratamento do câncer de próstata.

2.10.3 Luteolina

A luteolina (Figura 8) é um tipo de flavonóide, produzidos como metabólitos secundários pelas plantas como mecanismo de defesa com propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana e anticarcinogênica (LEYVA-LOPES et al., 2016).

Figura 8 Estrutura química da luteolina.



Fonte: Nabavi et al. (2015)

É encontrada em plantas, frutas e legumes que incluem cenoura, brócolis, salsa, dentre outros. A luteolina glicosilada é encontrada principalmente nas plantas comestíveis, e durante a digestão e absorção intestinal a forma glicosilada é hidrolisada para liberar luteolina, a qual possui ação terapêutica. Porém, em alguns casos durante a passagem pelo estroma intestinal a luteolina pode reverter a sua forma glicosilada. Estudos já comprovaram que ela sozinha ou associada com agentes quimioterápicos podem sensibilizar células cancerosas, além de melhorar a citotoxicidade que vários fármacos podem causar (TUORKEY, 2016; DELLAFIORA et al., 2014).

Em um estudo publicado recentemente por Han e colaboradores (2016) foi observado que o composto bioativo luteolina foi capaz de inibir a proliferação e induzir

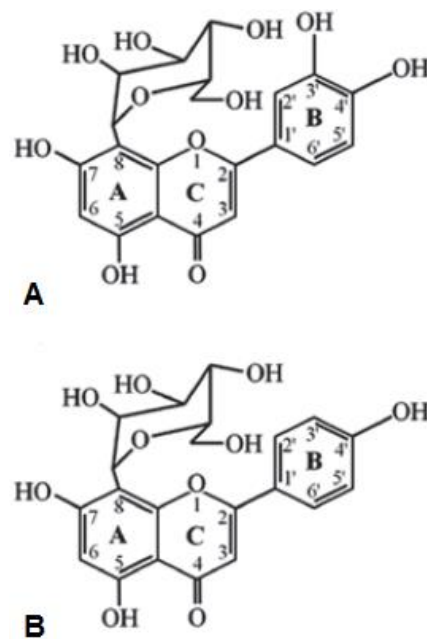
a apoptose em células de câncer de próstata através da regulação negativa de miR-301, desencadeando a expressão de DEDD2, gene pro- apoptótico (HAN et al., 2016).

Níveis elevados de citocinas, como interleucina (IL) 1- β , fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL- 6 estão associados com as doenças crônicas, tais como artrite reumatoide, aterosclerose e câncer. Sabe-se que alguns flavonoides como a quercetina, apigenina e a luteolina possuem propriedades capazes de reduzir a expressão e secreção destas citoquinas, semelhantes aos medicamentos existentes no mercado, porém evitando os efeitos secundários que estes causam a longo prazo (LEUYVA-LOPES et al., 2016).

2.10.4 Orientina e vitexina

A orientina e vitexina (Figura 9) são monômeros de flavonoides totais e possuem a mesma constituição química, conhecidos por apresentarem atividade antioxidante e antitumoral (AN et al., 2015; KHAN et al., 2016).

Figura 9 A: Estrutura química da orientina. B: Estrutura química da vitexina.



Fonte: AN, F. et al. (2015).

A orientina é um flavonóide C- glicosídeo, solúvel em água, sendo esse composto isolado a partir de várias plantas medicinais tais como *Ocimum sanctum*, *Phyllostachys* sp. (folhas de bambu), *Passiflora* sp. (flores), *Trollius* sp. (Ouro rainha) e *Jatropha gossypifolia* (Bellyache Bush) (LAM et al., 2016).

Em células de câncer esofágico EC- 109, ambos compostos bioativos orientina e vitexina apresentaram efeitos antitumorais pela indução da apoptose celular e regulação dos níveis da expressão dos genes p53 e Bcl-2 positiva e negativa, respectivamente (AN et al., 2015).

Porém, um estudo recente em células de câncer de fígado HepG2, realizada com o óleo essencial da planta *O. sanctum* L., composta com grandes proporções de flavonoides tais como orientina e vicenina, não apresentou efeito anticarcinogênico/citotóxico em um período de tempo prolongado, ou seja, após 96 horas de exposição, com apenas 41% de morte celular (KHAN, et al. 2016).

Em uma investigação de Zhou e colaboradores (2009) isolaram vitexina de uma planta chinesa conhecida como *Vitex Negundo* e esta apresentou efeito antitumoral, frente a células de câncer de mama, próstata, fígado e colo de útero e atividade citotóxica pela indução de apoptose mediada pela diminuição dos genes apoptóticos *Bcl- 2/BAX* e ativação das caspases.

2.11 Potencial ação antitumoral do açaí no câncer de próstata e colorretal

Devido à composição antioxidante do açaí, o mesmo vem sendo estudado como um importante agente antitumoral. Foi descrita por Dias e colaboradores (2014) a ação pró-apoptótica dos polifenóis presentes no açaí em células de câncer colorretal, o mecanismo antitumoral foi realizado através da inibição da citocina pró-inflamatória, do fator de necrose tumoral (TNF- α), assim como fatores de adesão celular VCAM-1 e VCAM-2. Ainda, foi reduzida a expressão de proteínas pró-oncogênicas (*Bcl-2* e survivinas) associado com um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a caspase 3.

Também foi relatada a atividade antiproliferativa do açaí em células de câncer de mama (MCF-7), onde o extrato desse fruto foi capaz de promover alterações

morfológicas da célula, induzindo a formação de vacúolos autofágicos no seu interior (SILVA et al., 2014).

O açaí também mostrou efeito inibitório no crescimento de câncer de bexiga em ratos, através da ingestão diária do fruto (FRAGOSO et al., 2012). Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que as frações polifenólicas da polpa do açaí reduziram a proliferação de células leucêmicas (HL-60), pelo aumento da expressão da proteína apoptótica caspase-3 (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). Ainda, em roedores com câncer de esôfago a polpa do açaí atenuou a proliferação celular e o tamanho dos tumores (STONER et al., 2010).

Diante disso, mais estudos antitumorais devem ser realizados com o açaí para identificar outros tipos de cânceres sensíveis a esse alimento funcional, principalmente os que são agressivos e resistentes aos quimioterápicos, como, por exemplo, o câncer de próstata, com a finalidade de produzir suplementos para serem administrados durante o tratamento de pacientes com câncer, a fim de potencializar a inibição do crescimento tumoral. Além disto, o açaí também poderia atuar em células epiteliais saudáveis prevenindo possíveis acúmulos de mutações, em especial no câncer de próstata e no câncer colorretal. A escolha destes dois tipos de câncer está subsidiada em estudos epidemiológicos e experimentais que sugerem que ambos são fortemente influenciados pela dieta e seus compostos bioativos.

Além da potencial ação antitumoral do açaí, o extrato deste fruto também poderia atuar em células epiteliais saudáveis prevenindo possíveis acúmulos de mutações, principalmente quando na presença de um desbalanço entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) superóxido (S) e peróxido de hidrogênio (PH).

2.12 HIPÓTESE DO ESTUDO

Com base na revisão de literatura científica apresentada a principal hipótese deste trabalho é a de que o extrato de açaí possui efeito nutrigenômico antitumoral contra células e câncer de próstata e colorretal devido à presença na sua matriz nutricional de moléculas bioativas como a apigenina e a orientina, tendo também efeito preventivo na genotoxicidade associada ao desbalanço S-HP em queratinócitos saudáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açai) em células de câncer de próstata (DU 145) e células de câncer colorretal (HT-29) e efeito genoprotetor em células de queratinócitos (HaCat) submetidas a um desbalanço farmacológico S-HP.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito do desbalanço S-HP nos indicadores de cito-genotoxicidade de queratinócitos saudáveis através da análise da:

- na viabilidade celular;
- na proliferação celular;
- marcadores do estresse oxidativo
- dano de DNA

Em linhagens celulares de câncer de próstata DU 145 avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de açai na:

- na viabilidade celular;
- na proliferação celular;
- no efeito clonogênico;
- em marcadores de apoptose celular;
- na alteração do ciclo celular;
- na expressão de genes associados a apoptose e na proliferação celular.

Em linhagens celulares de câncer colorretal HT-29 avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de açai e suas principais moléculas biotivas na:

- na viabilidade celular;
- na proliferação celular;
- em marcadores de apoptose celular;

- na alteração do ciclo celular;
- na expressão de genes associados a apoptose.

4 MÉTODOS E RESULTADOS

Delineamento geral do estudo é apresentado no quadro abaixo. O detalhamento dos materiais e métodos são descritos em nos artigos e manuscrito relacionados a esta tese.

Artigo 1	Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism by Nrf2 redox signaling Periódico <i>Molecular Biology Reports</i> (Publicado)
Artigo 2	Açaí (Euterpe Oleracea, Mart.), na Amazonian fruit has antitumor effects on prostate cancer cells. Periódico <i>Archives in Biosciences & Health</i> (Publicado)
Manuscrito 3	Açaí (Euterpe oleracea, Mart.) and Its Major Bioactive Molecules Present Antitumor Effect Against Colorectal Cancer Cells (HT-29) by Inhibiting Apoptosis Pathway Periódico <i>Journal of Functional Foods</i> (Submetido)

Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway

Micheli Lamberti Jobim^{a,*}, Verônica Farina Azzolin^a, Charles Elias Assmann^b, Vera Maria Melchiors Morsch^b, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,c}, Liliane de Freitas Bauermann^a

^a Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Programa de Pós-graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Universidade Federal de Santa Maria. 1000 Roraima Av., Santa Maria, RS, Brazil. Zip code 97105-900. Tel: +55 55 3220-9380. E-mail: micheli.l.j@bol.com.br (Micheli Lamberti Jobim)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of a superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance of the superoxide dismutase manganese dependent (SOD2) gene, generated by paraquat and porphyrin exposure, on the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism. Paraquat acts increasing superoxide ($O_2^{\bullet-}$) levels, while porphyrin increases hydrogen peroxide (H_2O_2) levels, acting as VV-SOD2-like and AA-SOD2-like molecules, respectively. First of all, HaCaT cells were treated with different concentrations of paraquat and porphyrin (1; 10; 30, and 70 μ M) to determine the concentration of both that causes imbalance. After defining the concentration of paraquat and porphyrin (70 μ M), a time curve was performed (1, 3, 6, and 24 h) to evaluate ROS production levels. Other oxidative parameters, such as nitric oxide (NO), lipoperoxidation (TBARS) and protein carbonyl, were evaluated after 24 h of incubation, as well as genotoxic analyses, apoptosis detection, and gene expression. Our findings revealed that paraquat exposure decreased cell viability, increasing lipoperoxidation, DNA damage, and apoptosis. On the other hand, porphyrin treatment increased cell viability and proliferation, ROS and NO production, triggering protein and DNA damage. In addition, porphyrin up-regulated Keap1 and Nrf2 gene expression, while paraquat decreased Nrf2 gene expression. In this sense, we suggested that the superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates oxidative stress on keratinocytes cell line via Keap1-Nrf2 gene expression pathway.

Keywords: SOD2; Val16Ala-SOD2 SNP; Paraquat; Porphyrin; Oxidative stress; Keap1-Nrf2 pathway.

1. Introduction

Keratinocytes represent the main cells of the epidermis. These cells present a high proliferative turnover and generate a dense skin barrier that protects humans against infections triggered by exogenous pathogens, such as virus and bacteria. In addition, these cells have an important functional relevance to organism defensive responses against other several environmental stressful factors, such as radiation, heat, cold, and trauma, which generate oxidative stress states. The defensive action of keratinocytes is very important, since chronic oxidative stress exposure can trigger inflammation, skin aging and cancer development [1].

In healthy conditions, keratinocytes present low-senescence phenotype than other cells, such as fibroblasts. Its phenotype probably is influenced by keratinocyte antioxidant defense which involves a crucial upregulation of the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2). Indeed, Nrf2 transcription factor regulates the expression of other antioxidant proteins, that effectively protect these cells against oxidative damages [2, 3, 4].

However, overproduction of antioxidant molecules by keratinocytes against reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) is finely regulated to maintain the cells oxidative homeostasis. This assumption is based on a prior investigation which reported that keratinocyte senescence process could be induced by the upregulation of the superoxide dismutase manganese dependent gene (SOD2) enzyme and subsequent hydrogen peroxide (H_2O_2) overproduction into the mitochondria [5]. SOD2 is considered a crucial antioxidant enzyme to cells catalyzing the reaction from superoxide $O_2^{\bullet-}$ anion, which is continuously produced by mitochondrial biochemical reactions

involving oxygen, into H_2O_2 . However, an evidence has suggested that SOD2 enzyme has a dichotomous role in cancer as either tumor suppressor or promoter according to its regulation and to cell type [6]. This assumption is based on former investigations that described the association between a SOD2 single nucleotide polymorphism (SNP, rs4880) located in the 16-codon (Val16Ala-SOD2) with some types of cancer [7].

The Val16Ala-SOD2 SNP presents an important superoxide-hydrogen peroxide imbalance related mainly to its homozygous genotypes (AA and VV). Specifically, the AA-genotype has been associated to a higher risk of some cancer types, such as prostate, breast, non-Hodgkin lymphoma, lung cancer, and colorectal cancer [8, 9, 10]. Moreover, Taufer et al [11] described that the AA-genotype presented higher immunosenescence markers than V-allele subjects, whereas Montagner et al [12] described higher DNA damage in AA UV-exposed than VV UV-exposed lymphocytes suggesting that higher SOD2 levels could affect cellular aging.

Potential causal mechanisms involving AA cancer risk could be related to SOD2 efficiency [7]. In fact, SOD2 enzyme is active only into mitochondria dismutating $O_2^{\bullet-}$ anion to H_2O_2 , that subsequently is converted by glutathione peroxidase (GPx) in water and oxygen. AA-genotype presents a different SOD2-protein phenotype, which has an alpha-helix structure entering more easily into the mitochondria than VV-genotype enzymes. However, better SOD2 efficiency associated with AA-genotype generates higher H_2O_2 levels that easily pass through the mitochondria membranes reaching the cytoplasm and potentially increasing some ROS levels including hydroxyl radical ($\bullet OH$). The basal increase of ROS levels can trigger continuous DNA damage increasing cancer risk in AA-

subjects. Moreover, recent studies that established a pharmacological $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 (S-HP) imbalance model using paraquat to generate high $O_2^{\bullet-}$ levels and porphyrin, a SOD2-like molecule that generates high H_2O_2 levels showed important modulation on the proliferative state and chemotherapeutic drug resistance on colorectal and prostate cancer cell lines [13, 14]. Other recently published studies stated that the $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance also modulates the oxidative metabolism of healthy cells, such as peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine [15] and fibroblasts exposed to a Brazil nut extract [16].

Therefore, it is possible that the genetic $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 (S-HP, respectively) imbalance triggered by the Val16AlaSOD2 SNP could directly affect antioxidant response of keratinocytes by differential modulation of Nrf2 gene and also by differential basal oxidative metabolism markers of these cells. To test this hypothesis, the present investigation described results from an *in vitro* protocol using the HaCaT keratinocytes cell line submitted to a pharmacological $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance to test potential differential modulation of Nrf2 gene expression and other apoptotic and oxidative markers.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used to perform the assays were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany). Reagents used to perform cell culture protocols as cell culture media, fetal bovine serum (FBS), antibiotics/antifungals, and plastics were acquired from Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA) and

Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Molecular biology reagents were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), and Qiagen (Hilden, Germany). All spectrophotometric and fluorimetric assays were performed using a 96-microplate reader SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.2 Experimental study design

In this study, an *in vitro* protocol was performed using the HaCaT keratinocytes cell line obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). Keratinocytes represent a suitable model to investigate responses to oxidative stress due to the fact that these cells constitute some of the main cells of the human epidermis and help to protect the body against pathogens and environmental agents that cause oxidative stress, thus participating in the processes of aging and inflammation, for example [1]. Cells were submitted to a pharmacological $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance to test potential differential modulation of Nrf2 gene expression and other apoptotic and oxidative markers. Cells were exposed to paraquat, an organic compound that interferes with electron transfer through the reduction in the number of donor electrons, such as NADPH in the mitochondria, increasing the superoxide anion levels; on the other hand, porphyrin is a SOD2 mimic molecule that increases the rate conversion of superoxide anion into hydrogen peroxide [17, 18], in order to generate a $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 imbalance. Therefore, oxidative parameters were evaluated according to figure 1.

Figure 1 here

2.3 Cell culture and treatments

Keratinocytes cell line (HaCaT) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ and they were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. Cell suspension was placed in 96-well plates (2.5 x 10⁵ cells/well). After cell attachment, cells were treated with paraquat or porphyrin at different concentrations (1; 10; 30, and 70 µM) to determine the concentration of both that causes imbalance in HaCaT cells. After defining the concentration of paraquat and porphyrin, a time curve was performed (1, 3, 6 and 24 h) for evaluating ROS production levels. Other oxidative parameters were evaluated after 24 h of incubation.

2.4 Viability and proliferation assays

Cell viability and proliferation was evaluated after the exposure to paraquat and porphyrin for 24 and 72 h. The effect on cell viability and proliferation was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] spectrophotometric assay, as described by Montagner et al [12]. For this assay, 2.5 x 10⁵ cells were incubated for 1 h with MTT reagent. After, formazan salt was dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO), and absorbance was measured at 570 nm.

2.5 Reactive oxygen species (ROS) assay

Intracellular ROS production was evaluated by levels of oxidized dichlorofluorescein (DCF) from 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) described by Esposti et al [19]. Keratinocytes cells were seeded in 96-well plates (5×10^5 cells/well), and after paraquat and porphyrin treatment, cells were incubated with DCFH-DA (10 μ M) for 1 h at 37°C in the dark. Fluorescence was determined at 488 nm (excitation) and 525 nm (emission).

2.6 Nitric oxide (NO) quantification

Nitric oxide (NO) production was measured by the modified Griess method previously described by Choi et al [20]. Treated cells were incubated at room temperature with Griess reagent for 10 min and the absorbance was measured at 550 nm.

2.7 Lipoperoxidation and protein carbonylation measurement

Oxidative stress indicators were measured in keratinocytes samples. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method performed by Jentzsch et al [21]. Protein carbonylation was determined by the Levine method with modifications.

2.8 DNA comet and micronucleus genotoxicity assays

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al [22] in accordance with the general guidelines for use of the comet assay. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for

cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). Slides were analyzed under blind conditions by at least two individuals.

To evaluate the frequency of micronuclei (MN), which form during the cellular interphase, being of the same color and not larger than one third of the main nucleus. It also makes it possible to evaluate the frequency of Nuclear Bridges (PN), Nuclear Buds (BUD) (also called broken eggs), and Binucleated Cells (BN) described by Maluf and Riegel [23]. In this test, 1000 cells per slide were analyzed for each of the criteria (MN, PN, BUD and BN).

2.9 Apoptosis detection

Cells in the concentration of 1×10^5 were stained by Alexa Fluor 488 Annexin V (Invitrogen) for 15 min at room temperature and washed once with PBS. Fluorescent images were obtained with a fluorescence microscope (Keyence). Percentages of Annexin V-positive apoptotic cells relative to the total number of cells were calculated according to the described by Sakai et al [24].

2.10 Gene expression analysis by qRT-PCR

The potential differential modulation of Nrf2 and Keap1 gene expression was performed similarly to the previously described in Barbisan et al [25]. Briefly, qRT-PCR was performed in a 20 μ L reaction volume: 1 μ L of the cDNA and 19 μ L of QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany). The following qRT-PCR parameters were used: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 65°C. Beta-actin was used as the housekeeping gene. Relative expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as the fold expression compared to the control.

2.11 Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The results were expressed as a percent (%) of the negative control group. Therefore, the data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test. The statistical tests were performed using the GraphPad Prism Software. Results of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Initially, we determined the effect of different paraquat and porphyrin concentrations on keratinocytes viability for 24 h (Figure 2A) and proliferation for 72 h (Figure 2B) at different concentrations (1, 10, 30, and 70 μ M). After 24h exposure, only the highest concentration (70 μ M) of paraquat decreased cell viability, while lower concentrations of this chemical increased cell viability when compared to control levels. At the same exposure time, porphyrin at 30 μ M showed cytotoxicity, and at 70 μ M showed to elevate cell viability compared to the control. For 72h of exposure, in general, paraquat and porphyrin concentrations significantly increased cell proliferation when compared to the control. From these initial results, the concentration that caused imbalance for both paraquat and porphyrin was determined at 70 μ M.

Figure 2 here

After determining the concentration of 70 μ M from the viability and proliferation assays, a curve was performed to evaluate ROS production levels

at different exposure times (1, 3, 6, and 24 h). Results showed a significant increase of ROS production for porphyrin treatment at 70 μ M after 3 h of exposure (Figure 3).

Figure 3 here

NO production was measured after 24 h of exposure. Results showed that porphyrin significantly increased the NO levels (Figure 4).

Figure 4 here

Lipid and protein damage were determined by TBARS and protein carbonyl, respectively, after 24 h of exposition. Results showed that paraquat treatment increased the lipoperoxidation levels, however, porphyrin decreased this parameter compared to the control (Figure 5A). On the other hand, porphyrin treatment increased protein carbonyl whereas paraquat did not alter the protein damage levels when compared to the control (Figure 5B).

Figure 5 here

Genotoxicity was measured by Comet and Micronucleus Assay. The results showed that paraquat and porphyrin treatment caused genotoxicity in the cells. This fact can be observed by the increase of DNA damage in the Comet Assay (Figure 6 and 7) and micronucleus formation, mainly micronucleus and binucleate cells in relation to the control (Table 1).

Figure 6 here

Figure 7 here

Table 1 here

Cellular apoptosis was also investigated, and the results are represented in figure 8. Our findings showed an increase of Annexin V marker in cells treated with paraquat, indicating high levels of apoptotic cells (Figure 8F). On the other hand, porphyrin did not alter apoptosis levels when compared to the control.

Figure 8 here

Keap1 and Nrf2 gene expression was analyzed by qRT-PCR. The results showed that porphyrin treatment increased Keap1 and Nrf2 gene expression while paraquat decreased Nrf2 gene expression when compared to the control. In this sense, the modulatory effect was more expressive after porphyrin exposure (Figure 9).

Figure 9 here

4. Discussion

Keratinocytes are important cells of the human epidermis protecting the body against environmental stressors and pathogens, that potentially trigger oxidative stress. Chronic exposure to oxidative stress is linked to skin aging, inflammatory processes, and also cancer development [1]. SOD2 enzyme is one

of the crucial enzymes in the protection against oxidative stress generated into the mitochondria. However, a specific SNP found in this enzyme, known as Val16Ala-SOD2 confers distinct enzyme efficiencies depending on the allele, especially homozygous alleles (VV and AA), that have been associated with some types of cancer [7]. Due to the generation of a superoxide-hydrogen peroxide imbalance related mainly to the homozygous genotypes, investigating how keratinocytes are affected by this oxidative imbalance is of relevance to understand the mechanisms that drive cellular aging, inflammatory diseases, and cancer development. In this sense, we investigated here the effect of the $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance, generated by paraquat and porphyrin exposition, on the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism. Paraquat acts as VV-SOD2 like, increasing $O_2^{\bullet-}$, while porphyrin increase H_2O_2 , as AA-SOD2 like. In general terms, our findings revealed that this imbalance differentially modulates the keratinocytes oxidative stress, mainly by modulating Keap1-Nrf2 gene expression pathway.

Our results showed that the concentration of paraquat and porphyrin that caused an imbalance in HaCaT cells (70 μ M), decreased cell viability (for paraquat) and increased cell viability and proliferation (for porphyrin). Paraquat decreased viability possibly due to higher $O_2^{\bullet-}$ levels production. High levels of $O_2^{\bullet-}$ can generate H_2O_2 and O_2 by dismutation reaction, catalyzed by SOD. Also, $O_2^{\bullet-}$ can also donate an electron to ferric ion (Fe^{3+}) to form ferrous ion (Fe^{2+}), that reacts with H_2O_2 and generates a very potent oxidant $\bullet OH$. This event is called as Fenton reaction. This molecule can generate damage in organic molecules, such as lipid, protein, and DNA [26].

On the other hand, the cellular response to H_2O_2 levels can directly activate in some cases specific growth signaling pathways, such as the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) [27]. This fact can explain our findings using porphyrin treatment. Our results showed that porphyrin increased cell viability and proliferation, since this molecule produces H_2O_2 that can activate cell growth and viability pathways.

ROS and NO production was also tested in this investigation. The results found in the DCFH-DA Assay confirm that porphyrin treatment produced high levels of ROS. Moreover, high levels of NO were detected by porphyrin exposure. However, paraquat treatment showed normal levels of ROS and NO following high lipoperoxidation levels. This result indicated that low levels of ROS and NO was found due to the interaction of $O_2^{\bullet-}$ with NO, producing peroxynitrite ($ONOO^-$), the main molecule responsible for lipid damage. This fact was confirmed by high levels of TBARS following paraquat exposure. The study performed by Kocak-Toker et al [28] corroborates with our findings, since these authors reported an increase in lipid damage due to $ONOO^-$ exposure. However, lipid damage was not altered following porphyrin treatment, indicating that H_2O_2 produced by porphyrin was directed to protein damage, since there were high levels of protein carbonyl after porphyrin treatment. The study of Zhang et al [29] corroborates with our findings, since they reported that H_2O_2 is responsible to generate protein damage.

Additionally, DNA damage was determined in our study. Comet Assay as well as Micronucleus Test suggested that both treatments, with paraquat and porphyrin, caused DNA injuries detected in these experimental approaches. High production of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 can generate Fenton Reaction, that is responsible

for producing $\cdot\text{OH}$, that presents high affinity to DNA and reported to cause genotoxicity [30, 31]. DNA mutations can generate cell dysfunction and induce apoptosis. This parameter also was measured in our study, and we suggested high apoptosis levels in paraquat exposure, confirming lower cell viability in the MTT Assay.

Moreover, our findings indicated that porphyrin and paraquat exposure may interfere with the Keap1-Nrf2 pathway since porphyrin increased Keap1 and Nrf2 gene expression and paraquat decreased Nrf2 expression when compared to control levels. In general terms, porphyrin seems to modulate this pathway more significantly. Previous studies reported that Keap1 stimulates Nrf2 ubiquitin-dependent proteasomal degradation. When oxidative stress conditions increase, Keap1 is inactivated, and the ubiquitination of Nrf2 stops, upregulating Nrf2 gene expression to protect cells against oxidative metabolism damage [32, 33]. Despite methodological constraints related to our study, results suggested that the $\text{O}_2^{\cdot-}$ - H_2O_2 imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway. Porphyrin presented a more pronounced Keap1 up-regulation and a subtler Nrf2 up-regulation, while paraquat decreased the Nrf2 expression. Further investigations of other signaling pathways could help to elucidate by what other mechanisms paraquat and porphyrin could be acting in order to better understand the factors that regulate the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide imbalanced cells.

5. Conclusion

In summary, we showed that the $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance, generated by paraquat and porphyrin exposition, modulated the oxidative metabolism of HaCaT keratinocytes. Our findings revealed that paraquat exposure decreased cell viability, increased lipoperoxidation and apoptosis. On the other hand, porphyrin treatment increased cell viability and proliferation, ROS and NO production, and generated protein and DNA damage. Moreover, we suggest that the $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance differentially regulates the oxidative metabolism of the HaCaT keratinocytes cell line via Keap1-Nrf2 gene expression pathway. Thus, our investigation showed the relevance of the $O_2^{\bullet-}$ - H_2O_2 imbalance on HaCaT cells oxidative metabolism, suggesting that possibly similar conditions could be found in AA-SOD2-like (porphyrin exposure) and VV-SOD2-like (paraquat exposure) keratinocyte cells. In general, our results suggest a differential modulation of the oxidative metabolism depending on the type of molecule (H_2O_2 or $O_2^{\bullet-}$), and that the responses observed could be linked to the Keap1-Nrf2 redox signaling pathway.

Funding

This study was supported by grants and fellowships from the following Brazilian governmental agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Bowman A, Birch-Machin MA (2016). Age-Dependent Decrease of Mitochondrial Complex II Activity in Human Skin Fibroblasts, *J Invest Dermatol* 136:912-919.
- [2] Zhong JL, Edwards GP, Raval C, Li H, Tyrrell RM (2010). The role of Nrf2 in ultraviolet A mediated heme oxygenase 1 induction in human skin fibroblasts, *Photochem Photobiol Sci* 9:18-24.
- [3] Tian FF, Zhang FF, Lai XD, Wang LJ, Yang L, Wang X, Singh G, Zhong JL (2011). Nrf2-mediated protection against UVA radiation in human skin keratinocytes, *Biosci Trends* 5:23-29.
- [4] Schafër M, Werner S (2015). Nrf2 - A regulator of keratinocyte redox signaling, *Free Radical Biol Med* 88:243-252.
- [5] Deruy E, Gosselin K, Vercamer C, Martien S, Bouali F, Slomianny C, Bertout J, Bernard D, Pourtier A, Abbadie C (2010). MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes, *PlosOne* 5:e12712.
- [6] Kim YS, Vallur PG, Phaeton R, Mythreye K, Hempel N (2017). Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer, *Antioxidants (Basel)* 6:86.
- [7] Bresciani G, Cruz IB, Paz JA, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J (2013). The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors, *Free Radic Res* 47:781-792.

[8] Kang SW (2015). Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis, *Int J Clin Exp Med* 8:14647-14655.

[9] Li X, Shen M, Cai H, Liu K, Liu Y, Huang Z, Liang C, Deng X, Ye J, Zou Q, Li J (2016). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis, *Int J Biol Markers* 31:e422-e430.

[10] Minlikeeva AN, Browne RW, Ochs-Balcom HM, Marian C, Shields PG, Trevisan M, Krishnan S, Modali R, Seddon M, Lehman T, Freudenheim JL (2016). Single-Nucleotide Polymorphisms and Markers of Oxidative Stress in Healthy Women, *Plos One* 11:e0156450.

[11] Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB (2005). Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60:432-438.

[12] Montagner FG, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB (2010). Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes, *Toxicol in Vitro* 24:1410-1416.

[13] Azzolin VF, Cadona FC, Machado AK, Berto M, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner WG, Gonçalves PB, Bica CG, da Cruz IBM (2016). Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response, *Toxicol in Vitro* 32:8-15.

[14] Berto M, Bica CG, Sá GP, Barbisan F, Azzolin VF, Rogalski F, Duarte MMF, da Cruz IBM (2015). The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide

imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis, *Med Oncol* 32:251.

[15] Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, Bonadiman B, Duarte MMMF, Machado AK, da Cruz IBM (2017). Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine, *Chem Biol Interact* 273:18-27.

[16] Schott KL, Assmann CE, Teixeira CF, Boligon AA, Waechter SR, Duarte FA, Ribeiro EE, da Cruz IBM (2018). Brazil nut improves the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts in a nutrigenomic manner, *Food Chem Toxicol* 121:519-526.

[17] Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na SY, Chang WY, Kim GY, Kim HS, Hyun JW (2013). Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells, *Gene* 25:214–219.

[18] Bus, Gibson JE. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity, *Environ Health Perspect* 55:37–46.

[19] Esposti MD (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species, *Methods* 26:335-340.

[20] Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cell Immunol* 280:164-170.

[21] Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK (1996). Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids, *Free Radic Biol Med* 20:251-256.

- [22] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* 175:184-191.
- [23] Maluf SW, Riegel M (2011). *Citogenética Humana*, 1. ed, Porto Alegre: Artmed p.180-193.
- [24] Sakai O, Uchida T, Roggia MF, Imai H, Ueta T, Amano S (2015). Role of Glutathione Peroxidase 4 in Glutamate-Induced Oxytosis in the Retina, *Plos One* 10:e0130467.
- [25] Barbisan F, Motta JR, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MMF, Mostardeiro CP, Unfer T, Schott KL, Cruz IBM (2014). Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One* 9:1-11.
- [26] Day RM, Suzuki YJ (2006). Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione, *Dose Response* 3:425-442.
- [27] Zhang W, Liu HT (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res* 12:9-18.
- [28] Kocak-Toker N, Giris M, Tulubas F, Uysal M, Aykac- Toker G (2005). Peroxynitrite induced decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity is restored by taurine, *World J Gastroenterol* 11:3554-3557.
- [29] Zhang L, Li Q, Jia S, Huang Z, Luo Y (2018). Effect of different stunning methods on antioxidant status, in vivo myofibrillar protein oxidation, and the susceptibility to oxidation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during 72 h post-mortem, *Food Chem* 246:121-128.

[30] Park S, Imlay JA (2003). High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction, *J Bacteriol* 185:1942-1950.

[31] Hu P, Wu T, Fan W, Chen L, Liu Y, Ni D, Bu W, Shi J (2017). Near infrared-assisted Fenton reaction for tumor-specific and mitochondrial DNA-targeted photochemotherapy, *Biomaterial* 141:86-95.

[32] Lu M, Ji J, Jiang Z, You Q (2016). The Keap1–Nrf2–ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update, *Med Res Rev* 36:924-963.

[33] Zhu H, Yan P, Wang L, Liu Y, Wen J, Zhang Q, Fan Y, Luo Y (2018). Protective properties of Huperzine A through activation Nrf2/ARE-mediated transcriptional response in X-rays radiation-induced NIH3T3 cells, *J Cell Biochem* 119:8359-8367.

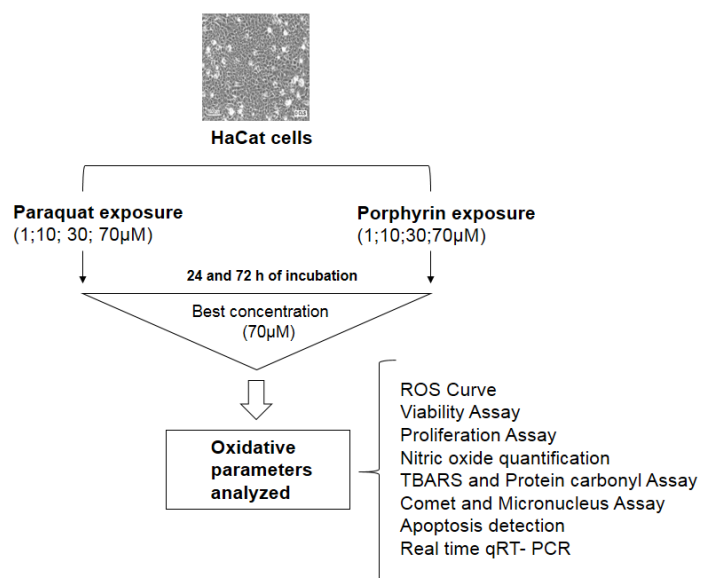


Figure 1. Experimental study design.

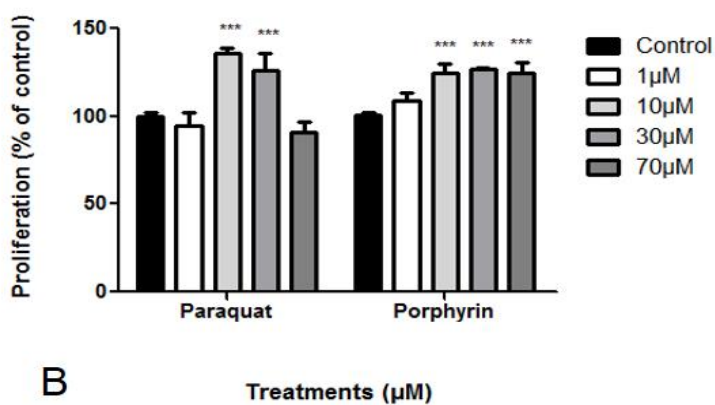
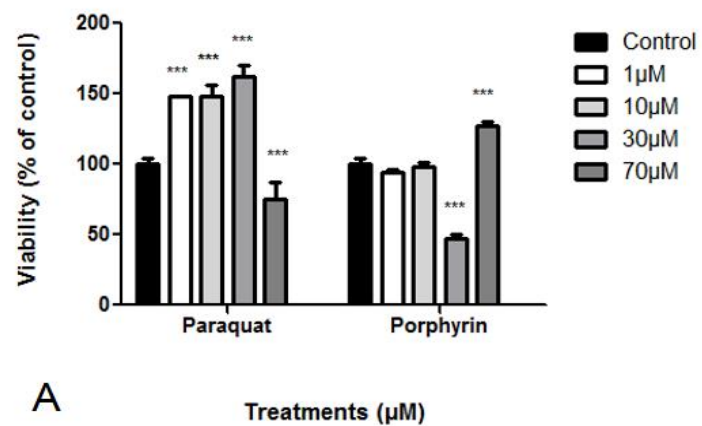


Figure 2. HaCaT cells were treated with paraquat, porphyrin at different concentrations (1; 10; 30, and 70 μM). Viability was measured in 24 h (A) and proliferation was determinate in 72 h (B). The results were compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences ***($p < 0.001$).

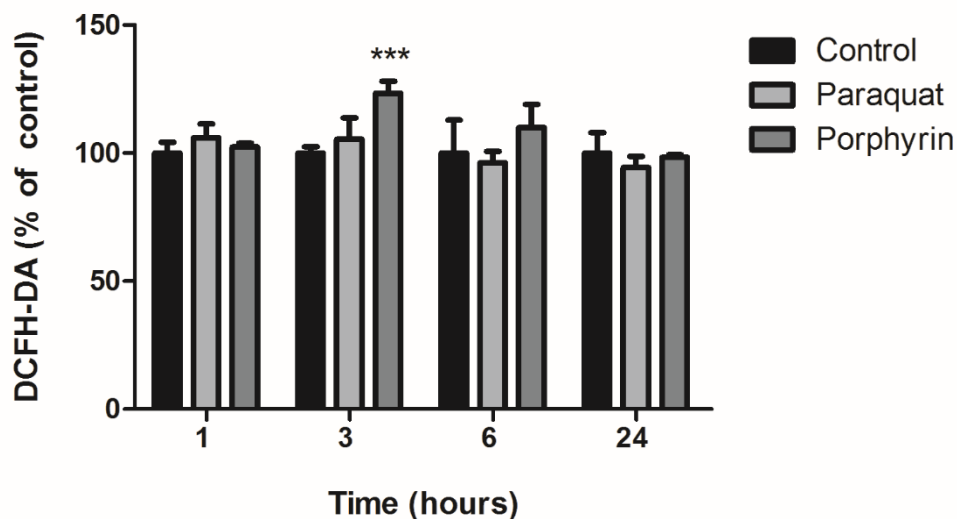


Figure 3. HaCaT cells were treated with the best concentration of paraquat and porphyrin (70 μ M), and a time curve was performed (1, 3, 6 and 24 h) for evaluating ROS production levels by DCFH-DA Assay. The results were compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences ***($p<0.001$).

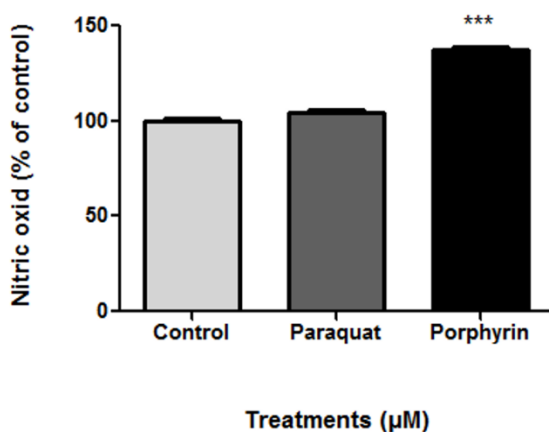


Figure 4. HaCaT cells were treated with paraquat, porphyrin at 70 μ M for 24 h for evaluating NO production levels by Griess reagent. The results were compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences ***($p<0.001$).

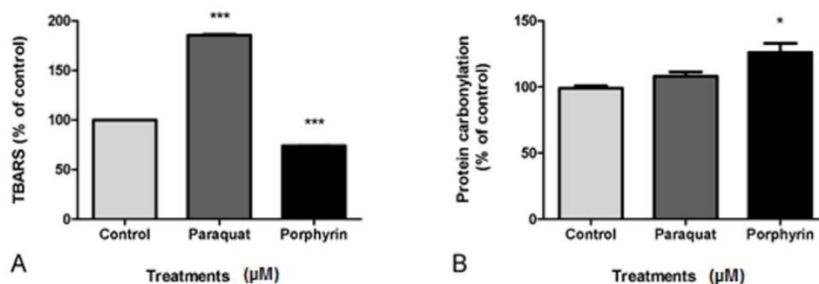


Figure 5. HaCaT cells were treated with paraquat, porphyrin at 70 µM for 24 h for evaluating lipoperoxidation levels by TBARS Assay (A) and for protein carbonyl determination (B). The results were compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences *($p < 0.05$) and ***($p < 0.001$).

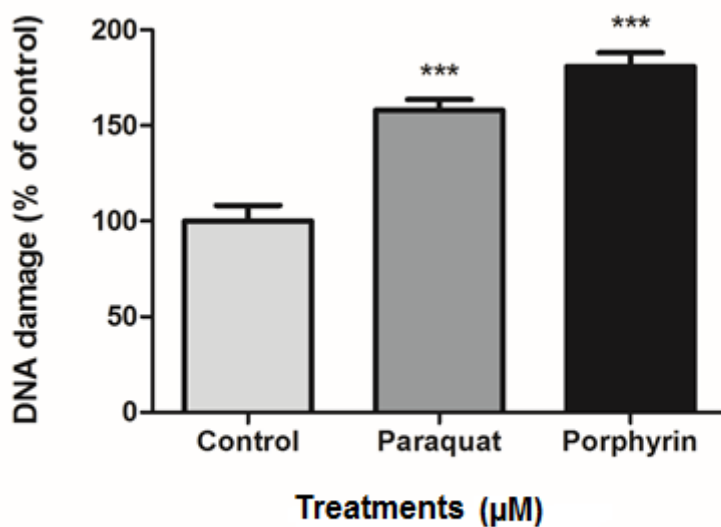


Figure 6. HaCaT cells were treated with paraquat, porphyrin at 70 µM for 24 h for evaluating genotoxicity by Comet Assay. The results were compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences ***($p < 0.001$).

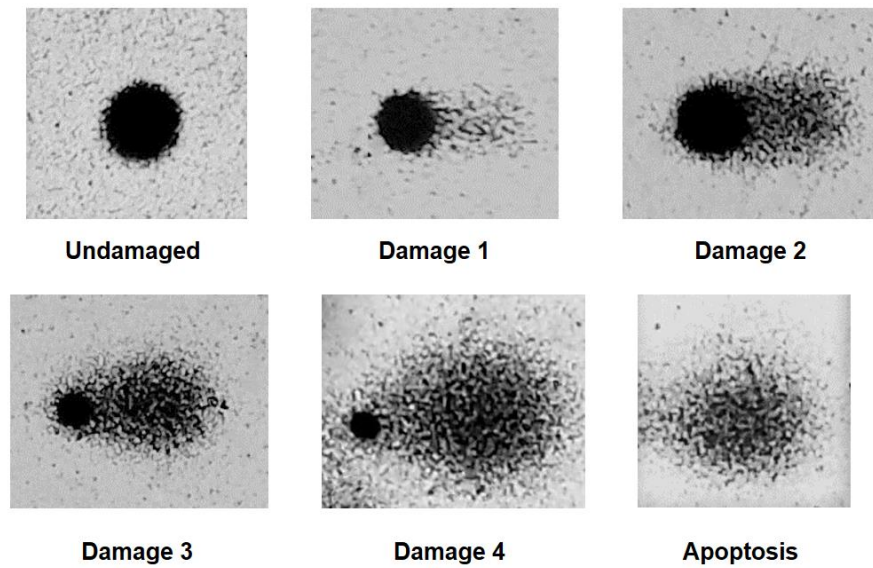


Figure 7. Classification of damages in the comet test according to the length of the tail.

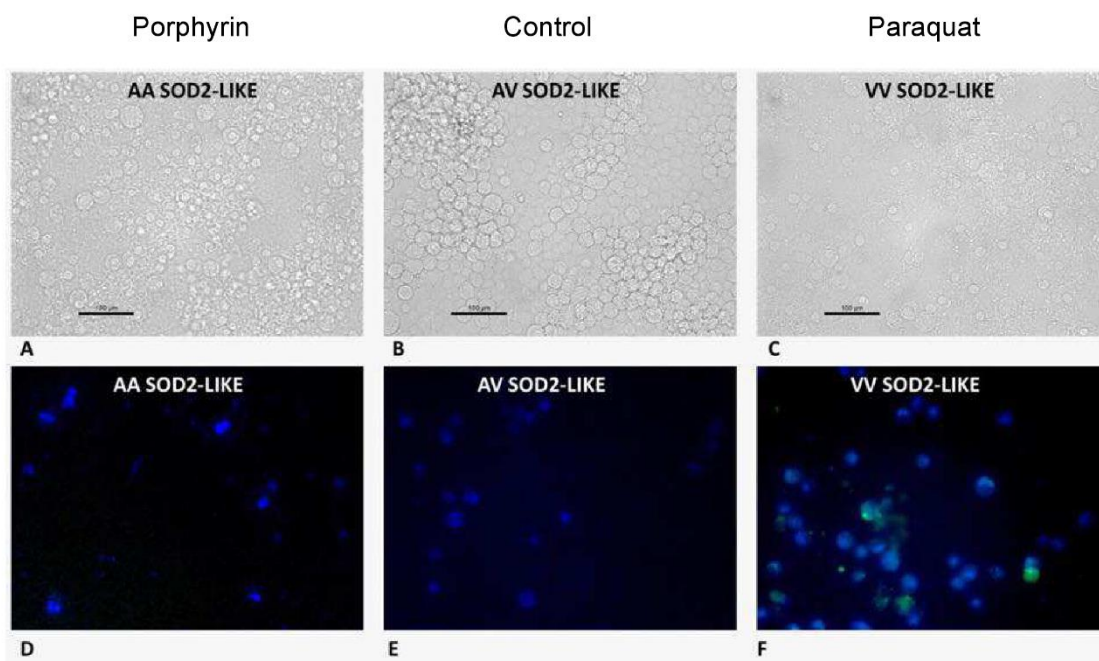
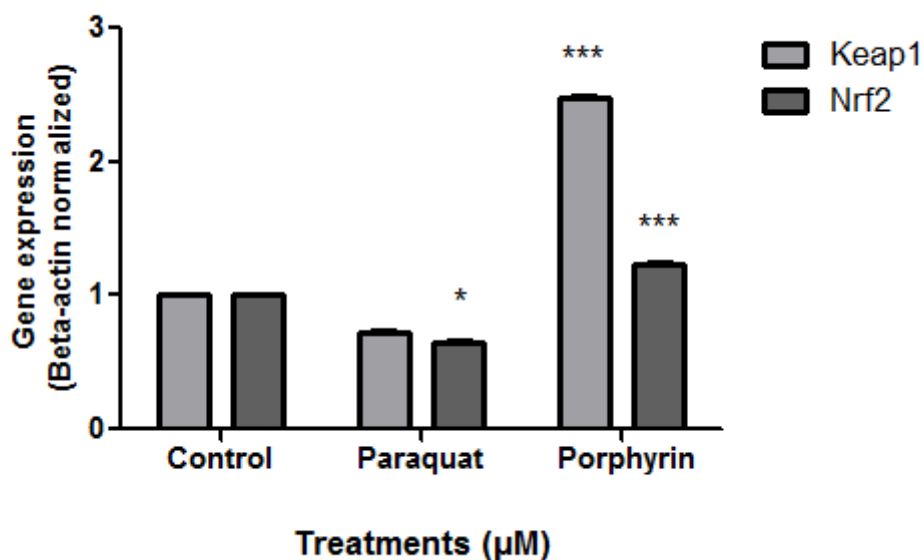


Figure 8. HaCaT cells were treated with paraquat and porphyrin at 70 μM for 24 h to evaluate apoptosis by Annexin V marker. Cells were treated with porphyrin (A) and stained with Annexin V (B). Control, only cells and medium (B) and stained with Annexin V (E). Cells were exposed to paraquat (C) and stained with Annexin V (F).



	Control	Paraquat	Porphyrin
Keap1			
Nrf2			

Legend: $>0,9 <1,1$ $<0,8$ $>1,2$

Figure 9. HaCaT cells were treated with paraquat and porphyrin at 70 μM for 24 h to evaluate Keap1 and Nrf2 gene expression. N=3, significant differences *($p < 0.05$) and ***($p < 0.001$).

Table 1. Summary of results for the keratinocytes micronucleus test.

Treatments	Normal	Micronucleus (MN)	Binucleate (BN)	Nuclear Bridge (PN)	Nuclear Bud (BUD)
Control	942,25 \pm 6,07	42,25 \pm 8,14	15,5 \pm 4,51	0	0
Paraquat	855 \pm 14,16	97 \pm 9,83*	43,5 \pm 4,43*	4,5 \pm 3,11	0
Porphyrin	883 \pm 10,55	75,5 \pm 7,32*	35,5 \pm 7,59*	6 \pm 1,82	0



AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA, MART.), AN AMAZONIAN FRUIT HAS ANTITUMOR EFFECTS ON PROSTATE CANCER CELLS

Jobim ML

Pharmacology Post-Graduation Program, Sciences and Health Program, Federal University of Santa Maria; Biogenomics Laboratory, Morphology Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria; Rua Roraima, 1000, Prédio 21, 97105900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; micheli.l.j@bol.com.br; <https://orcid.org/0000-0002-7968-143X>

Barbisan F

Gerontology Post-Graduation Program, Physical Education and Deport Center, Federal University of Santa Maria; Biogenomics Laboratory, Morphology Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria; Open University of Third Age, University of Amazon Estate.; fernandabarbisan@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2960-7047>

Fortuna M

Pharmacology Post-Graduation Program, Sciences and Health Program, Federal University of Santa Maria; Biogenomics Laboratory, Morphology Department; milena.fortunaz@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0335-9994>

Teixeira CF

Pharmacology Post-Graduation Program, Sciences and Health Program, Federal University of Santa Maria; Biogenomics Laboratory, Morphology Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria; cibelefteixeira@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0058-3827>

Boligon AA

Federal University of Santa Maria, Health Sciences Center, Pharmacy Industrial Department; alineboligon@yahoo.com.br; <https://orcid.org/0000-0002-6001-1313>

Ribeiro EE

Open University of Third Age, University of Amazon Estate; unatieuler@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3878-1933>

Da Cruz IBM

Pharmacology Post-Graduation Program, Sciences and Health Program, Federal University of Santa Maria; Gerontology Post-Graduation Program, Physical Education and Sport Center, Federal University of Santa Maria; Biogenomics Laboratory, Morphology Department, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria; Open University of Third Age, University of Amazon Estate; ibmcruz@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3008-6899>

Abstract: Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.) is fruit broadly consumed in the world. From its chemical matrix is possible that açai could have some cytotoxic effect against prostate cancer (PCa). To test this hypothesis using an *in vitro* PCa model DU145 cell. Additionally, potential synergism between açai and docetaxel (DO), a chemotherapeutic drug used to treat advanced PCa was also evaluated. Cells were exposed to an açai hydro alcoholic extract at different concentrations (1 to 1000 µg/mL) and its effect on viability, apoptosis and cellular proliferation was determined by MTT assay, growth cell, clonogenic assays and cell cycle analysis by flow cytometry. Differential modulation of *Bcl-2* and *BAX* genes was also determined by Pcr quantitative in real time (qRT-PCR) analysis. Açai at lower concentrations (1-10 µg/mL) presented significant cytotoxic and antiproliferative action against PCa cells decreasing frequency of S phase cycle. Probably, this effect was associated with its strong down-regulation of *Bcl-2* gene. However, açai did not contribute to improve Docetaxel effects on PCa cells. Açai's PCa antitumor effects could be related to elevated concentrations of orientin plus vitexin, p-coumaric acid, apigenin and catechins present in its chemical matrix, which are molecules with antitumor effect previously described in the literature.

Keywords: Carcinogenesis. DU145 cells. Antiproliferative. Nutrigenomics. Gene modulation.

1 INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most incident in elderly men, however, its epidemiological distribution is heterogeneous, probably due to environmental and genetic factors. In Brazil, Northern Region presents lower PCa prevalence than geographic regions.¹ It is possible

that differential nutritional patterns based in pre- Colombian diet rich in habitual fruit and fish consumption could have some protective role against PCa.²⁻⁵

A very popular fruit consumed in Northern region, as Amazonas State is açai (Euterpe oleracea, Mart.) that, nowadays is broadly consumed in other countries.⁶ This fruit has several bioactive molecules that could present PCa antitumoral property, such as epicatechin, quercetin and apigenin.^{7,8} From these evidences, we performed an *in vitro* assay to test potential açai effect against PCa cells and also its synergic effect with Docetaxel (DO) chemotherapeutic drug that is used to treat resistant PCa.⁹⁻¹¹

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL, HYDRO ALCOHOLIC EXTRACT AND CHEMICAL CHARACTERIZATION

The present study is part a project that has previous authorization by Brazilian Ministry of Environmental (no 012300.785152/6584-19) to investigate native species with potential biological impact on human health. Açai hydro alcoholic extract used here was the same produced and previously chemically characterized by Machado *et al.*¹² The extract was obtained from fresh fruit açai samples from Manaus city, Amazonas, Brazil (3.08oS, 60.01oW).

The açai samples was used to produce the hydro alcoholic extract. The açai fruits were initially put in water during 24 h to become more soft and were crushed in a 70% ethanol solution with a concentration of 300 mg/mL. To protect from light and humidity, the material was stored in amber bottles for 21 days under manual daily stirring. After this period of extraction, the material was initially filtered to remove the bark and seed, evaporated by a rotatory evaporator, and lyophilized to complete solvent removal, lyophilized and stored at -200 C until to perform the chemical characterization and *in vitro* studies.

Chemical characterization of 12 bioactive molecules was performed from açai extract by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis using the Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The freeze-dried

hydroalcoholic extract was analyzed following the protocol reported by Klimaczewski *et al.*¹³ at 15mg/mL.

The analysis of bioactive molecules in açai extract tested here showed higher concentrations (mg/g) of orientin (8.05 ± 0.03) followed by apigenin (3.59 ± 0.01), p-Coumaric acid (3.52 ± 0.01), cyanidin-3-O-glucoside (2.62 ± 0.01), epicatechin (2.37 ± 0.02), luteolin (2.57 ± 0.02) and vitexin (2.19 ± 0.01). Lower concentrations of caffeic acid (0.76 ± 0.01), catechin (0.75 ± 0.03), gallic acid (0.73 ± 0.01) and chlorogenic acid (0.41 ± 0.01) were also found in the extract.

2.2 CELL CULTURE TREATMENTS

The *in vitro* assays were performed using a DU-145 cell commercial line obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM supplemented 10% FBS, and 1% penicillin/streptomycin, maintained in incubator at 37 °C and saturation of 5% CO₂. Cells were exposed to different açai log-distributed concentrations (1, 3, 10, 30, 100, 1000 µg/mL). The 100 µM DO a chemotherapeutic drug, was used as a positive control in some tests.¹⁴ The synergism effect of açai extract and DO was also evaluated by concomitant treatment of cells with two components.

2.3 CYTOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE AÇAI EFFECT

Açai cytotoxic effects was evaluated in 24 h cell cultures and its antiproliferative effects in 48 and 72 h cell cultures by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) spectrophotometric assay.¹⁵ Cytotoxic effect was confirmed by complementary protocol that analyzed necrosis and apoptosis açai's induction determined by flow cytometry using Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit obtained from Becton Dickinson-BD (East Rutherford, New Jersey, USA) as manufacturer's instructions.

The antiproliferative effect of açai against PCa cells was confirmed by three complementary tests. Cell cycle analysis evaluated by flow cytometry in 72 h cell cultures using propidium iodide (PI) reagent as described in Azzolin *et al.*¹⁶ Cellular growth curve

and clonogenic assays were performed as previously described by Cadoná *et al.*¹⁷ that use violet crystal dye to detect viable cells for 7 days. For the Clonogenic Assay were used cells/well in triplicate in the six well plates. The colonies were incubated until formatted 50 cells for colony (approximately 10-15 days). Further, colonies were detected with violet crystal and the number of colonies was counted as described Cubillos-Ros *et al.*¹⁸ Cell cycle analysis also evaluated by flow cytometry after the cells were treated for 72 h with açai extracts at different concentrations using PI reagent.¹⁶

2.4 AÇAÍ EFFECTS ON GENES ASSOCIATED TO APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION

Potential açai modulation on BAX (bcl-2-like protein 4) and Bcl-2 genes involving with the control of apoptosis and cellular proliferation was evaluated by Pcr quantitative in real time (qRT-PCR) analysis using RNA samples extracted with Trizol reagent and a general protocol previously described in Barbisan *et al.*¹⁹ Beta-actin gene was used as housekeeping gene to normalize the expression of BAX and Bcl-2 genes. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The primer pairs used were: BAX “FCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA”, “R CCCGGAGGAA GTCCAATGT”, Bcl-2 “FGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT” and “R AGT CATCCACAGGGCGATGT”.

2.5 STATISTICAL ANALYSIS

Treatments were compared by One-way ANOVA analysis of variance, followed by post hoc Dunnet or Tukey test, employing Graphpad Prism 5 software. The results were expressed as mean \pm standard deviation, with $p < 0.05$ indicating statistical significance.

3 RESULTS

Some chemical molecules presented in the açai extract matrix could to be contributing with the antiproliferative activity of açai against PCa cells. A synthesis of some

investigations that described antitumor effect of main bioactive molecules present in the açai extract tested here are presented in the Figure 1.

Molecules	Main results
Orientin and vitexin*	PCa antitumor effect by increase of BAX/Bcl-2 ratio and activation of caspases. ²⁰
<i>p</i> -Coumaric acid	Strawberry and honey present <i>p</i> -Coumaric acid in their nutritional matrix present PCa antitumor effect. ²¹
Apigenin	Molecule found in parsley, celery, peppermint, cloves and red wine trigger apoptosis in various PCa models ²²⁻²⁴ and shows synergistic effect in combinatorial therapy of PCa resistant models and in the control of PCa stem cells. ²⁵
Catechins#	These molecules are present in some species such as green, black tea and guarana. Robust evidences are demonstrated that green tea catechins are effective for preventing PCa involving inhibition of Bcl-2 gene expression. ^{25,26}
Cyanidin	This molecule is able to presents anti-proliferative effects through activation of caspase-3 and induction of p21 protein expression. PCa treatment with cyanidin increased the levels of P75NGFR, a tumor suppressor molecule suggesting a possible role of this molecule in the induction of a normal-like prostate cell phenotype (differentiation induction). ²⁷
Luteolin	Molecule found in some foods, such as raw radicchio, chard, pumpkin, turnip and some spices including dried oregano, yellow and green hot chili peppers is able to inhibits cell proliferation of PCa cells. ²⁸ Molecule presents suppressive effect on DU145-III that presents great invasion potential. ²⁹ Luteolin is also induces apoptosis in PCa cells and inhibits cancer metastasis. ³⁰
Phenolic acids###	These molecules are found in large number of vegetable foods, such as citric fruits, apple, eggplant and food beverages as red wine and coffee. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with increased cellular proliferation, prevents apoptosis and favors tumor invasion. Gallic acid, a phenolic acid molecule is able to inhibits COX-2 mRNA31 and induces apoptosis of PCa cells. ³² Effect of caffeic acid inducing cell cycle arrestment and growth cell inhibition was also reported. ³³ Synthetic derivatives of caffeic acid are considered potent inhibitors of proliferation of androgen-dependent prostate cancer cells. These molecules also decrease of CPa cell variability. ³⁴ A study also reported that caffeic acid was able to enhance DO and paclitaxel cytotoxicity in PCa cells. ³⁵

Figure 1 – Description of some studies reporting antitumor effect against PCa of main bioactive molecules found in the açai hydro alcoholic extract

Note: * these molecules are flavonoids with similar chemical constitution; # molecules that belong to the flavan-3-ols (or simply flavanols) that are part of the chemical family of flavonoids; ## phenolic acids constituted by gallic, caffeic and chlorogenic acids presented in the chemical matrix of açai hydro alcoholic extract studied here.

Açai at lower concentrations tested here (1, 3 10 µg/mL) was able to decrease PCa viability in comparison to control group (Figure 2 A, B). At contrary, highest açai concentrations > 100 µg/mL stimulated cells survival in 24 h cultures. All açai concentrations showed antiproliferative effect on PCa cells in 48 and 72 h cell cultures. However, this effect was

more pronounced when cells were exposed to açai at 3 µg/mL concentration in 48 h cell cultures and at 1, 3 10 µg/mL concentrations in 72 h cell cultures. In general results did not showed a significant effect of açai and DO on apoptosis and necrosis events in the PCa 24 h cell cultures ($p=0.067$).

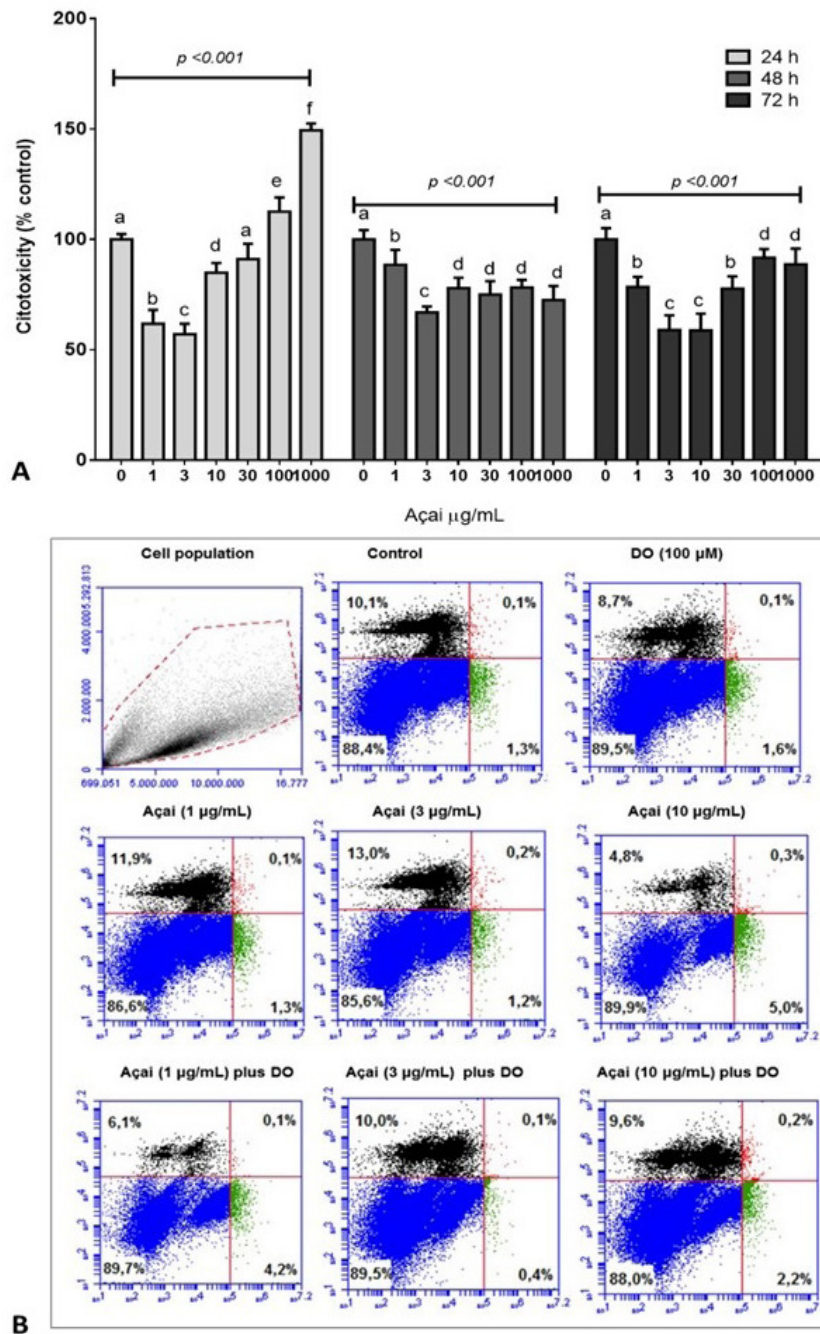


Figure 2 - (A) Comparison of antiproliferative effect on PCA cells in 24, 48 and 72 h cell cultures treated with açai (*Euterpe oleraceae*) hydro alcoholic extract. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) among treatments analyzed by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test. (B) Comparison of apoptosis events evaluated by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide dyes in 24 h culture of PCA DU145 cells treated with açai (*Euterpe oleraceae*) at different concentrations without (A) and with (B) concomitant treatment with docetaxel (DO) chemotherapeutic drug (representative graphs). Blue = viable cells; green = live cells undergoing early apoptosis; red = dead apoptotic cells; black = necrotic cells.

Cell cycle analysis (Figure 4) showed that DO exposure increased cells in the G2/M phase when compared to control group, whereas açai increased the frequency of S phase cells. Both situations indicated differential modulation of PCa cell cycle. When cells were concomitantly treated with açai and DO, just cells treated with DO plus 3 µg/mL açai presented increase of frequency in the G2/M phase.

Açai at 1, 3 and 10 µg/mL concentrations presented a strong and significant down regulation effect on Bcl-2 gene ($p=0.001$) and this result was similar to found in cells just treated with DO chemotherapeutic drug: DO = 0.0437 ± 0.02 ; açai 1 µg/mL = 0.0374 ± 0.02 ; 3 µg/mL = 0.042 ± 0.03 , 10 µg/mL = 0.0307 ± 0.02 gene expressions in relation to control group. Despite different açai concentrations present up regulation effect on BAX gene this effect was not so pronounced than observed in the Bcl-2 gene ($p=0.01$): DO = 1.786 ± 0.254 ; açai 1 µg/mL = 1.230 ± 0.219 ; 3 µg/mL = 1.78 ± 0.219 , 10 µg/mL = 1.51 ± 0.19 gene expressions in relation to control group. BAX/Bcl-2 gene ratio was higher 10 in cells exposed to DO and all açai concentrations confirming that antiproliferative effect on PCa cells involved biochemical pathways related with these genes (Figure 5). These results were similar when cells were concomitantly treated with DO and açai extract.

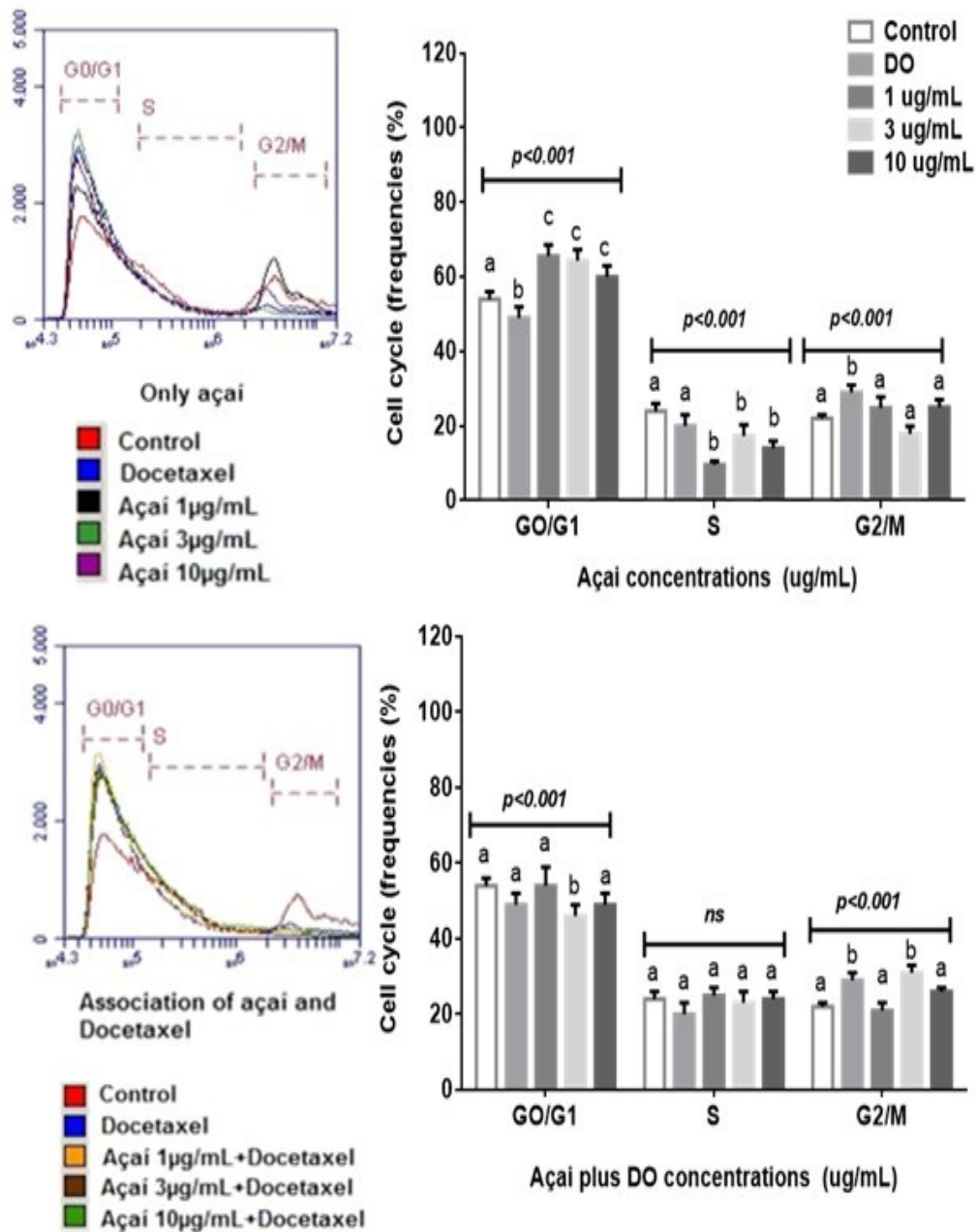


Figure 4 - Comparison of cell cycle phases of PCa DU145 cells treated with açai (*Euterpe oleraceae*) hydroalcoholic extract at different concentrations. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) among treatments analyzed by One-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test.

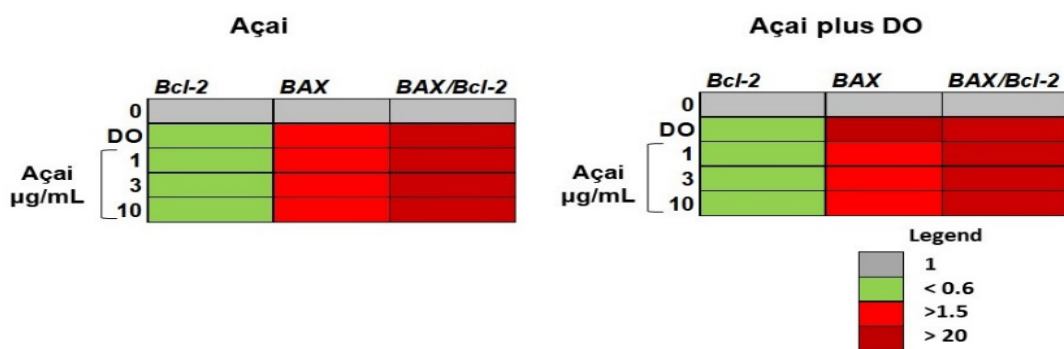


Figure 5 - Comparison of Bcl-2 and BAX gene expression of PCa DU145 cells treated with açai (Euterpe oleracea) hydro alcoholic extract at different concentrations. Different colors indicate statistical differences ($p < 0.05$) among treatments analyzed by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test. Gene expression values are represent by 1 = similar to control; < 0.6 = downregulation; > 1.5 = upregulation; > 20 = upregulation.

4 DISCUSSION

The present study investigated the potential antitumoral effect of an açai hydro alcoholic extract on PCa cells. In general results showed that açai at concentrations ranged among 1 until 10 $\mu\text{g/mL}$ presented a clear cytotoxic and antiproliferative action on PCa cells, similar to observed in cells DO exposed. Moreover, whole of results indicated that concomitant exposure did not affect the DO antitumoral action on cells. However, the interaction between DO and açai did not present a strong synergetic effect of antitumoral action of this chemotherapy drug. Evidence suggests that the anticarcinogenic efficacy of many foods is directly associated with the presence of secondary compounds, especially polyphenols. These molecules have several potent activities, such as their anti-inflammatory and anti-inflammatory action, capable of modulating various cyto-histological functions, such as cell survival, proliferation, migration and differentiation, angiogenesis modulation, hormone response, detoxification and also the immune response.³⁶

Gene expression analysis identify as mechanism that açai acts on PCa cells involves differential modulation of BAX and Bcl-2 genes similar that is triggered by DO. Despite methodological limitations related to *in vitro* protocols, for our best knowledge this is the first study indicating potential antitumoral açai effects on PCa cells.

Orientin was the molecule with higher concentration in açai hydro-alcoholic extract tested here. In fact, this molecule is similar to vitexin and is also a water-soluble flavonoid

C-glycoside of luteolin. These molecules are found in some spices and food beverages, such as black tea.^{21,37,38} Evidences has indicating that orientin has several biological properties³⁹ including antitumor effect against human liver and esophageal cancer cells.³⁸ In another study, a decrease in proliferative tumor markers in guinea-pig rats was observed, as well as annulment of inflammatory mast cells and decreased expression of nF- κ B and proinflammatory cytokines.⁴⁰ However, we found few studies suggesting that vitexin could has antitumoral effect against PCa cells.^{20,40,41} Therefore, the present study helps elucidate the potential antitumor effect in cancer cells, mainly prostate cancer.

p-Coumaric acid was the second metabolite more concentrated in açai extract. This phenolic acid serves a precursor of other phenolic compounds been found in some foods, such as strawberry and honey that present antitumor activity against PCa cells and other cancer cells.⁴²⁻⁴⁵

Undoubtedly, apigenin found in açai extract is the molecule that more number of studies suggest antitumor PCa effect.⁸ Studies related to causal mechanism associated with apigenin on PCa cells involve inhibition of androgen production.⁴⁶ Other antitumoral mechanisms of apigenin in different cancer types include cellular arrestment by downregulation of telomerase activity and also suppressive effect of Bcl-2 protein expression.^{23,47} Therefore, apigenin found in açai extract probably had an important role in the antitumor activity observed in PCa cells. This antitumor effect also could be accentuated by catechins and luteolin also found in the açai extract and that present capacity to modulate differentially *BAX* and *Bcl-2* genes.⁴⁸

5 CONCLUSION

In summary, despite methodological constrains related with *in vitro* studies, the results presented here suggest that açai extract has some antitumoral effect against PCa DU145 cells involving down-regulation of *Bcl-2* gene. The synergism between açai and DO is not so effective, but it is not possible to discard that this interaction could to induce improvement in the DO cytotoxic property. The results presented here could considered novel and suggest that açai could be use nutritional supplement in order to prevent PCa or to progression of PCa disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Aline Augusti Bolignon, Alencar Kolinski Machado, Beatriz da Rosa Silva Bonadiman, and Andrielli Puhle, for give us the characterized açai extract tested here. This work was supported by grants and fellowships from Brazilian governamental funds: Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGs) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

REFERENCES

1. Oliveira MM, Malta DC, Guauche H, Moura L, Silva GA. Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey. *Rev Bras Epidemiol.* 2013; 18(2):146-9.
2. Lin PH, Aronson W, Freedland SJ. Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Med.* 2015; 13(3).
3. Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li H. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients.* 2016; 8(3):156.
4. Boam T. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *ECancer Medical Science.* 2015; 9:585.
5. Dufour DL, Piperata BA, Murrieta RS, Wilson WM, Williams DD. Amazonian foods and implications for human biology. *Ann Hum Biol.* 2016; 43(4):330-48.
6. Yamaguchi KKL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem.* 2015; 179:137-51.
7. Portinho JA, Zimmermann LM, Bruck MR. Beneficial effects of açai. *International Journal of Nutrology.* 2012; 5(1):15-20.

8. Shukla S, Fu P, Gupta S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis*. 2014; 19:883-94.
9. Dias MM, Noratto G, Martino HS, Arbizu S, Peluzio MC, Talcott S, *et al.* Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutr Cancer*. 2014; 66:1394-405.
10. Silva DF, Vidal FC, Santos D, Costa MC, Morgado-Díaz J, Desterro SBNM, *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 29:175.
11. Yoo S, Choi SY, You D, Kim CS. New drugs in prostate cancer. *Prostate Int*. 2016; 4:37-42.
12. Machado AK, Andrezza AC, da Silva TM, Boligon AA, do Nascimento V, Scola G, *et al.* Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In vitro* Exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 8940850.
13. Klimaczewski CV, Saraiva RDA, Roos DH, Boligon A, Athayde ML, Kamdem JP, *et al.* Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria *in vitro*. *Industrial Crops and Products*. 2014; 54:240-7.
14. O'Neill AJ, Prencipe M, Dowling C, Fan Y, Mulrane L, Gallagher WM, *et al.* Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines. *Molecular Cancer*. 2011; 10(126):1-13.
15. Fukui M, Yamabe N, Zhu BT. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In vitro* and *In Vivo*. *Eur. J. Cancer*. 2010; 46(10):1882-91.
16. Azzolin VF, Cadona FC, Machado AK, Dal Berto M, Barbisan F, Dornelles EB, *et al.* Superoxide- hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicology In vitro*. 2016; 8-15.
17. Cadoná FC, Rosa JL, Schneider T, Cubillos-Rojas M, Sánchez-Tena S, Azzolin VF, *et al.* Guaraná, a Highly Caffeinated Food, presents *in vitro* Antitumor Activity in Colorectal and Breast Cancer Cell Lines by Inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways. *Nutr Cancer*. 2017; 69:800-10.
18. Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Peiró-Jordán R, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. The E3 Ubiquitin Protein Ligase HERC2 Modulates the Activity of Tumor Protein p53 by Regulating Its Oligomerization. *J. Biol. Chem*. 2014; 289:14782.

19. Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, *et al.* Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One.* 2014; 9:e107299.
20. Zhou Y, Liu YE, Cao J, Zeng G, Shen C, Li Y, *et al.* Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5161-9.
21. Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem.* 2008; 56:670-5.
22. Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, Chinou I, *et al.* Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PLoS One.* 2014; 9(4):e94860.
23. Jayasooriya RG, Kang SH, Kang CH, Choi YH, Moon DO, Hyun JW, *et al.* Apigenin decreases cell viability and telomerase activity in human leukemia cell lines. *Food Chem Toxicol.* 2014; 50:2605-11.
24. Erdogan S, Doganlar O, Doganlar ZB, Serttas R, Turkekul K, Dibirdik I, *et al.* A. The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44(+) stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF- κ B signaling. *Life Sci.* 2016; 162:77-86.
25. Shukla S, Fu P, Gupta S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis.* 2014; 19:883-94.
26. Guo Y, Zhi F, Chen P, Zhao K, Xiang H, Mao Q, *et al.* Green tea and the risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96:e6426.
27. Sorrenti V, Vanella L, Acquaviva R, Cardile V, Giofrè S, Di Giacomo C. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2015; 47:1303-10.
28. Seo Y, Ryu K, Park J, Jeon DK, Jo S, Lee HK, *et al.* Inhibition of ANO1 by luteolin and its cytotoxicity in human prostate cancer PC-3 cells. *PLoS One.* 2017; 12:e0174935.
29. Han K, Meng W, Zhang JJ, Zhou Y, Wang YL, Su Y, *et al.* Luteolin inhibited proliferation and induced apoptosis of prostate cancer cells through miR-301. *Onco Target.* 2016; 9:3085-94.
30. Wang L, Li W, Lin M, Garcia M, Mulholland D, Lilly M, *et al.* Luteolin, ellagic acid and punicalic acid are natural products that inhibit prostate cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2014; 35:2321-30.

31. Ferruelo A, de Las Heras MM, Redondo C, Ramón de Fata F, Romero I, Angulo JC. Wine polyphenols exert antineoplastic effect on androgen resistant PC-3 cell line through the inhibition of the transcriptional activity of COX-2 promoter mediated by NF- κ B. *Actas Urol Esp.* 2014; 38:429-37.
32. Reddivari L, Vanamala J, Safe SH, Miller JC Jr. The bioactive compounds alpha-chaconine and gallic acid in potato extracts decrease survival and induce apoptosis in LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 2010; 62:601-10.
33. Lin HP, Lin CY, Huo C, Hsiao PH, Su LC, Jiang SS, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester induced cell cycle arrest and growth inhibition in androgen-independent prostate cancer cells via regulation of Skp2, p53, p21Cip1 and p27Kip1. *Oncotarget.* 2015; 6:6684-707.
34. Sanderson JT, Clabault H, Patton C, Lassalle-Claux G, Jean-François J, Paré AF, *et al.* Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21:7182-93.
35. Tolba MF, Esmat A, Al-Abd AM, Azab SS, Khalifa AE, Mosli HA, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. *IUBMB Life.* 2013; 65:716-29.
36. Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li HB. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients.* 2016; 8(156).
37. Lam KY, Ling AP, Koh RY, Wong YP, Say YH. A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Adv Pharmacol Sci.* 2016; 1:4104595.
38. An F, Wang S, Tian Q, Zhu D. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. *Oncol Lett.* 2015; 10:2627-33.
39. Khan F, Sharma P, Prakash O, Shukla A, Vasudev PG, Luqman S, *et al.* Structure-Activity relationship studies on Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) based flavonoid orientin and its analogue for cytotoxic activity in liver cancer cell line HepG2. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016; 19:656-66.
40. Silva DA, Alves VG, Franco DM, Ribeiro LC, de Souza MC, Kato L, *et al.* Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). *Nat Prod Res.* 2012; 26(4):364-9.
41. Silva ICV, Kaluderovic G, de Oliveira PF, Guimaraes DO, Quaresma CH, Porzel A, *et al.* Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an enriched flavonoid extract and from *Passiflora mucronata*. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018.

42. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. *p*- Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96 (9):2952-62.
43. Peng W, Wu JG, Jiang YB, Liu YJ, Sun T, Wu N, *et al*. Antitumor activity of 4-O-(2''-O-acetyl-6''-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-*p*- coumaric acid against lung cancer via mitochondrial- mediated apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2015; 25:8-13.
44. Marczylo TH, Cooke D, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyaniding-3-glucoside in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 64 (6):1261-8.
45. Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. Antiproliferative effect of *p*-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. *Chem Biol Interact*. 2018; 291:16-28.
46. Wang X, Wang G, Li X, Liu J, Hong T, Zhu Q, *et al*. Suppression of rat and human androgen biosynthetic enzymes by apigenin: possible use for the treatment of prostate cancer. *Fitoterapia*. 2016; 111:66.
47. Chen XJ, Wu MY, Li DH, You J. Apigenin inhibits glioma cell growth through promoting microRNA-16 and suppression of BCL-2 and nuclear factor- κ B/MM P-9. *Mol Med Rep*. 2016; 14 (3):2352-8.
48. Li Z, Zhang Y, Chen L, Li H. The dietary compound luteolin inhibits pancreatic cancer growth by targeting BCL-2. *Food Funct*. 2018; 9(5):3018-27.

1 **Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) and Its Major Bioactive Molecules**
2 **Present Antitumor Effect Against Colorectal Cancer Cells (HT-**
3 **29) by Inhibiting Apoptosis Pathway**

4
5 Micheli Lamberti Jobim^{a,c}, Fernanda Barbisan^{b,c}, Verônica Farina Azzolin^{a,c},
6 Moisés Mastella^{a,c}, Cibele Teixeira^{a,c}, Euler Esteves Ribeiro^d, Ivana Beatrice
7 Mânica da Cruz^{a,b,c}, Liliane de Freitas Bauermann^a

8
9
10 ^a *Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa*
11 *Maria-RS, Brazil*

12
13 ^b *Postgraduate Program of em Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa*
14 *Maria-RS, Brazil*

15
16 ^c *Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa*
17 *Maria, Santa Maria-RS, Brazil*

18
19 ^d *Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM,*
20 *Brazil.*

21
22 *Corresponding author: Micheli Lamberti Jobim. Universidade Federal de Santa
23 Maria. Roraima Avenue 1000, Santa Maria-RS, ZP 97105-900, Brazil. Tel: +55
24 991784159. E-mail: micheli.l.j@bol.com.br

25

26

27

28 **Abstract**

29 *Euterpe oleracea*, Mart is popularly known as açai is an abundant fruit and much
30 consumed by the local population of the Amazon, and studies have shown that it
31 is rich in phytochemicals with antioxidant, anti-inflammatory and anticancer
32 activities. The purpose of this study was to investigate açai hydroalcoholic extract
33 antitumor effect as well as its main bioactive molecules against HT-29 colorectal
34 cancer cells. First of all, HT-29 cells were treated with different concentrations of
35 açai. After, apoptosis and cell cycle analyses were performed with the best
36 antitumor açai concentration and the proportional concentrations of the main
37 bioactive molecules (orientin, apigenin, *p*-coumaric acid). Our findings revealed
38 that açai present antitumor activity by reducing cell viability due to the up-
39 regulation of the apoptosis pathway gene (caspase-3) and cell cycle arrest.
40 Moreover, açai antitumor activity is due to the synergic effect of its bioactive
41 molecules.

42

43 **Keywords:** Apoptosis; caspases; dietary intervention; gene expression;
44 colorectal cancer.

45

46

47

48

49

50

51

52

53 **1 Introduction**

54

55 Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer associated
56 with death in the world, which affects older people and most cases are diagnosed
57 throughout the fifth and sixth decade of life, with a higher prevalence in men.
58 Northern Region of Brazil presents a lower CRC prevalence than other
59 geographic regions (Oliveira et al., 2013). This fact can be explained due to
60 differential nutritional patterns based on pre-Columbian times, termed the
61 Amazonian diet, that is rich in habitual fruit and fish consumption (Lin et al., 2015;
62 Dufour et al., 2016).

63 Recently studies have been reported that Amazonian functional foods
64 present antitumor activity, such as guaraná (*Paulliana cupana*) (Cadona et al.,
65 2016; Cadona et al., 2017; Hertz et al., 2015; Fukumasu et al., 2008; Fukumasu
66 et al., 2010), graviola fruit (*Annoma muricata*) (Dai et al., 2011), star fruit
67 (*Averrhoa carambola*) (Singh et al., 2014), and açai (*Euterpe oleracea*) (Fragoso
68 et al., 2012). The antitumoral action of this Amazonian fruits can be attributed by
69 their chemical matrix (Cadona et al., 2016; Cadona et al., 2017). For instance,
70 açai is considered an orientin, apigenin and p-coumaric acid rich fruit (Machado
71 et al., 2016).

72 Previous investigations have been reported that these active biomolecules
73 are able to decrease cancer cell proliferation by inhibiting cancer cells
74 deregulated pathways, such as An et al (2015) demonstrated that orientin presets
75 antitumor action against esophageal cancer EC-109 cells by inhibiting apoptosis.
76 Moreover, Yang et al (2018) reported that apigenin inhibited PI3K/Akt/mTOR
77 pathway and stimulated apoptosis pathway in and autophagy in hepatocellular

78 carcinoma cells. Also, Peng et al (2015) showed that p-coumaric acid is able to
79 reduce lung cancer cells proliferative by mitochondrial-mediated apoptosis.

80 Also, since colorectal cancer presents resistance to traditional
81 chemotherapy and poor treatment response (Elbadawy et al., 2018), as well as
82 chemotherapy, is responsible to cause many side effects (Campos et al., 2011),
83 it is very important to figure out antitumor supplements to improve cancer
84 treatment.

85 However, the açai antitumor activity against human colorectal cancer has
86 been not revealed yet. Taking this into account, we performed here an *in vitro*
87 study using colorectal cancer cells (HT-29) to test açai antitumor activity and its
88 major bioactive molecules found in its chemical matrix (orientin, apigenin, p-
89 coumaric acid).

90

91 **2 Material and Methods**

92

93 **2.1 Plant Material and Açai Hydroalcoholic extract**

94

95 Fresh fruit açai samples were obtained directly from the city of Manaus,
96 located in the Amazonian region (3.08°S, 60.01°W), Amazonas state, Brazil. S
97 transported to the Biogenômica laboratory where they were processed. Açai
98 botanical identification was performed by Dr. Eduardo Vélez-Martin from
99 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The present study is part of a project
100 that has previous authorization by the Brazilian Ministry of Environmental (no
101 012300.785152/6584-19) to investigate native species with a potential biological
102 impact on human health.

103 Açaí hydroalcoholic extract used here was the same produced and
104 previously chemically characterized by Machado et al (2016). The major bioactive
105 molecules found in the açaí chemical matrix were *p*-coumaric acid (Rt = 29.97
106 min), orientin (Rt = 35.14 min), and apigenin (Rt = 54.13 min). From these
107 procedures, it was possible to determine that the extract used in this study has
108 8.05 mg/g of orientin, 3.49 mg/g of apigenin, and 3.52 mg/g of *p*-coumaric acid.

109

110 **2.2 Reagents**

111

112 The bioactive molecules (apigenin, orientin, and *p* coumaric acid),
113 chemotherapeutic Oxaliplatin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,
114 Missouri, United States). Materials used in cell culture were purchased from
115 Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies
116 (Carlsbad, California, United States). Molecular biology reagents were obtained
117 from Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, and Germany), Invitrogen
118 (Carlsbad, California, United States), and Bio-Rad Laboratories (Hercules,
119 California, United States). For analysis via flow cytometry, we utilized Annexin V:
120 FITC Apoptosis Detection Kit obtained from Becton Dickinson-BD (East
121 Rutherford, New Jersey, USA).

122 The equipment used included the SpectraMax i3x Multi-Mode microplate
123 reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States) and the Rotor-
124 Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Germany).

125

126 **2.3 Cell culture and treatments**

127

128 All tests were performed using colorectal cancer cells line (HT-29)
129 obtained from American Type Culture Collection (ATCC HTB-38), and cultured in
130 DMEM supplemented 10% FBS, and 1% penicillin/streptomycin, maintained in a
131 CO₂ incubator at 37 °C and saturation of 5% CO₂.

132 The cell suspension was situated in each of the 96-well plates (2.5 x 10⁵
133 cells/well). After cell attachment for 24 hours, cells were treated with different açai
134 concentrations at 1, 3, 10, 30, 100 µg/mL. Cells were exposure to main açai
135 bioactive molecules only in the best concentration found. The main
136 chemotherapeutic used to treat colorectal cancer (oxaliplatin) was used as a positive
137 control of cytotoxicity at a concentration of 20µM, according performed in the
138 study of Cadoná et al (2016).

139

140 **2.4 Viability assay**

141

142 The açai effect on colorectal cancer HT-29 cells viability were performed
143 after 24 hours of exposure. Cell viability was evaluated by Analysis of apoptosis
144 using propidium iodide staining (PI) by flow cytometry according to Nicoletti et al
145 (2006).

146

147 **2.5 Apoptosis and cell cycle assays**

148

149 The açai and its main bioactive molecules effect on colorectal cancer
150 cells viability and cell cycle was evaluated by flow cytometry. Apoptosis analyze
151 was detected using Annexin-V-FITC and PI staining kit. Annexin-VFITC is able
152 to detect early apoptotic processes, while PI allows identifying dead cells. The

153 detection was realized through the connection between the cell receptor with the
154 fluorescent antibodies to Annexin-V and PI. The analysis was performed
155 according to the manufacturer's instructions. Cells were seeded in 6-well plates
156 at 1×10^6 cells per well in 2 mL of the different treatments in DMEM and incubated
157 for 24 hours. Following incubation, cells were trypsinized to be detached and
158 were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1X Binding Buffer at
159 a concentration of 1×10^6 cells/ml. After, 100 μ L of the solution (1×10^5 cells)
160 containing the cell was transferred to a 5 mL culture tube. Resuspended cells
161 underwent smooth vortexing and staining with 5 μ L of Annexin-V-FITC and 5 μ L
162 of PI. Following short incubation for 15 min in the dark at room temperature, 400
163 μ L of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the fluorescence of cells
164 was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications
165 (Zhao et al., 2014).

166 The cell cycle analysis was performed using flow cytometry after 72
167 hours of HT-29 treatment with açai and its bioactive molecules. The PI reagent
168 can insert between the DNA bases and this way measures the quantity of
169 molecules present in the sample. However, PI also can link with RNA molecules,
170 and then the sample needs prior treatment with nucleases to eliminate this
171 interference. Cells were seeded in 6-well plates at 5×10^4 cells per well in 2 mL
172 of the different treatments in DMEM and incubated for 72 hours. Following
173 incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70%
174 ethanol (the suspension was put in the vortex) at -20°C overnight. Previous to
175 analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS; after that, the
176 cells were resuspended in 500 μ l PI-solution in PBS: 50 μ g/ml PI from 50x stock
177 solution (2.5 mg/ml), 0.1 mg/ml RNase A and 0.05% Triton X-100, and incubated

178 for 40 min at 37°C. Finally, 3 ml of PBS was added to washing and resuspended
179 in 500 µl PBS to flow analysis (William-Faltaos et al., 2006).

180

181 **2.6 Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis**

182

183 Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's
184 instructions. The extracted RNA was measured by Thermo Scientific
185 NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer at the 532 nm wavelength. For realizing
186 the reverse transcription, RNA was used, whereby the samples of RNA (1 µg/mL)
187 were added to 0.2 µL of DNAase at 37 °C for 5 minutes, followed by heating at
188 65 °C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4
189 µL of Mix Iscript. The reaction consisted of the following steps: heating at 25 °C
190 for 5 minutes, at 42 °C for 30 minutes, and at 85 °C for 5 minutes, followed by
191 incubation at 5°C for 60 minutes. The qRT-PCR was performed in a Rotor-Gene
192 Q 5plex HRM System with 2× QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix; the
193 thermocycling conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of
194 10 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A melt curve was generated from 60 °C to 90°C
195 in 0.5°C increments for 5 s at each temperature. All reactions were performed in
196 triplicates, with 1 µM of each primer: *β actina* 5'
197 TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA 3' and 3' TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA 5';
198 *CASP8* 5' AAGGAGCTGCTCTTCCGAATT 3' and 3'
199 CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT5'; *CASP* 3' TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG
200 3' and 3' TACCAGTGCGTATGGAGAAATGG 5'; and 2× QuantiFast SYBR®
201 Green PCR Master Mix; final reaction volume was 20 µL. The beta-actin gene
202 was used as the housekeeping gene (Barbisan et al., 2014).

203 **2.7 Statistical Analysis**

204

205 The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The results
206 were expressed as a percent (%) of a negative control group. Therefore, the data
207 were submitted to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the
208 Dunnett Test. The statistical tests were performed using GraphPad Prism
209 Software. Results of $p < 0.05$ were considered significant.

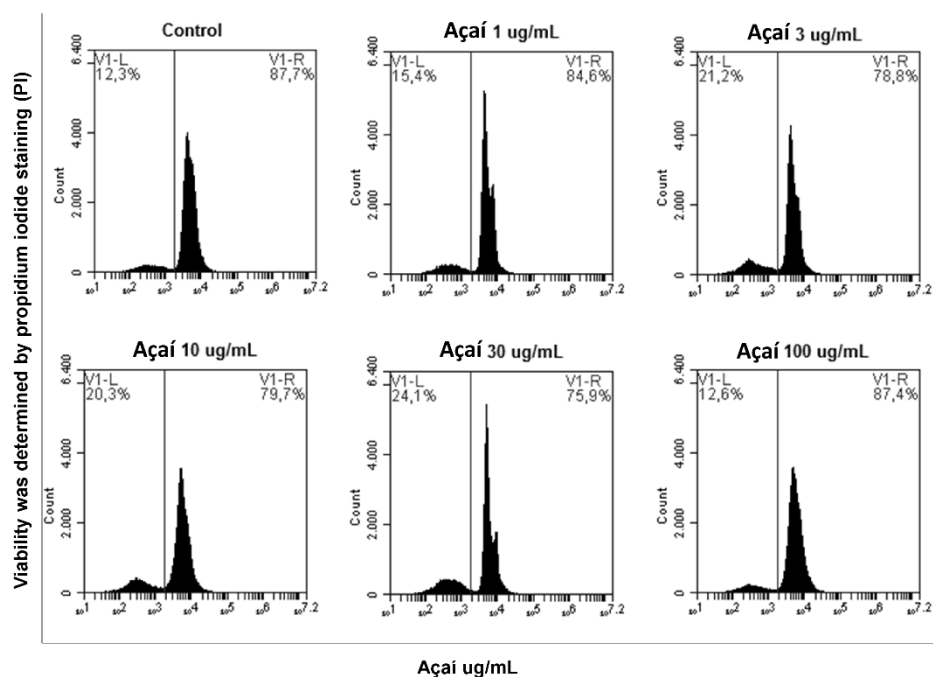
210

211 **3 Results**

212

213 The cell viability response of HT-29 colorectal cancer cells exposed to
214 different concentrations of açai freeze-dried hydroalcoholic extract was analyzed
215 after 24 hours of exposure (Figure 1). The results showed that açai extract
216 decreased HT-29 cell viability at 1; 3; 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$) when
217 compared to a negative control (only cells and medium).

218



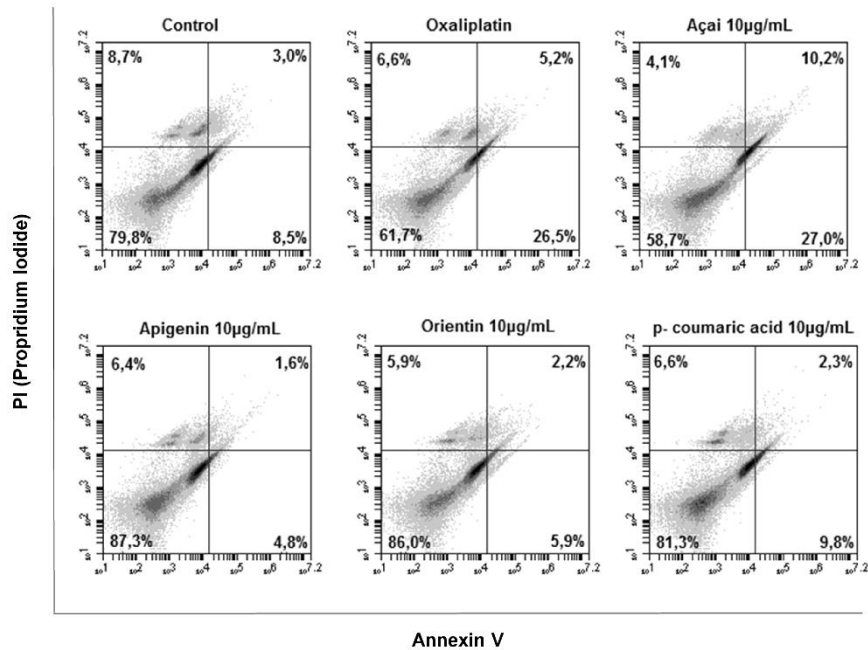
219

220

221 HT-29 cells were exposed to the best açai concentration found in the
 222 previous experiment (10 $\mu\text{g/mL}$) as well as the main bioactive molecules, orientin,
 223 apigenin, and p-coumaric acid, found in the proportional concentration of açai. In
 224 this sense, the concentrations of bioactive molecules were tested at 0.034 $\mu\text{g/mL}$
 225 of apigenin; 0,0805 $\mu\text{g/mL}$ of orientin, and 0.0352 $\mu\text{g/mL}$ of p-coumaric acid. The
 226 antitumor causal mechanism of açai was investigated by measuring apoptosis
 227 levels. Our findings showed that açai decreases cells viability by activating
 228 apoptosis pathway since açai increased early apoptosis levels when compared
 229 with negative control ($p < 0.0001$). Açai increased early apoptosis similar the
 230 chemotherapeutic tested, oxaliplatin ($p < 0.0001$). As well as açai increased dead
 231 cells levels more that oxaliplatin treatment ($p < 0.0001$). However, the açai isolated
 232 biomolecules did not show the same effect. Orientin, apigenin, and p-coumaric
 233 acid did not activate the apoptosis pathway by Annexin V apoptosis marker. On

234 the other hand, apigenin and orientin slightly decreased early apoptosis when
 235 compared with negative control, showing that the antitumor activity of açai is due
 236 to the synergic effect of its biological molecules (Figure 2).

237

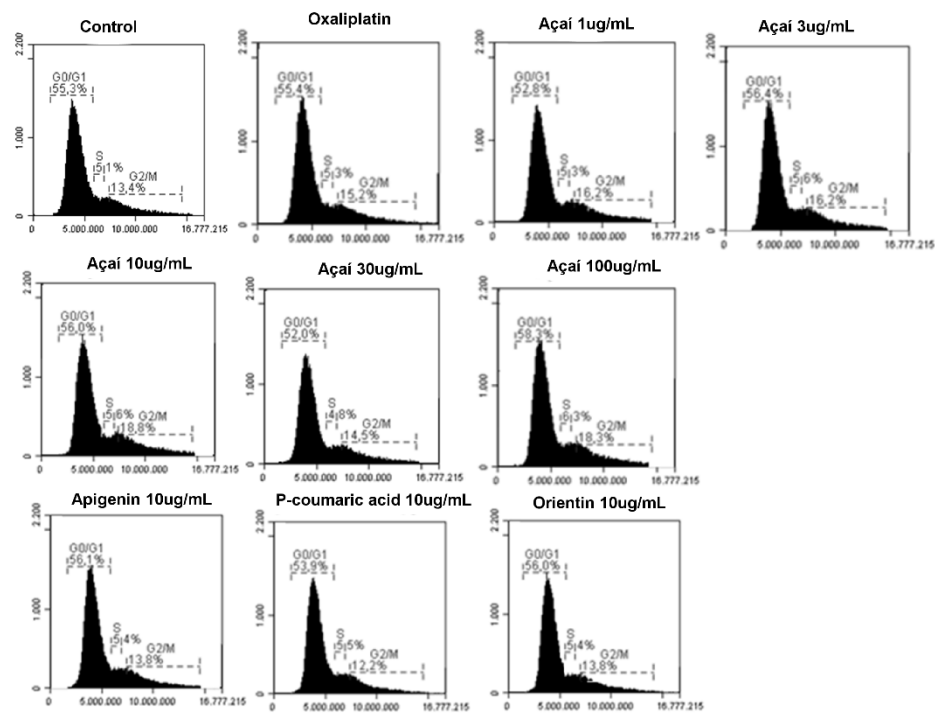


238

239

240 Moreover, the açai and its proportional bioactive molecules effect on HT-29
 241 cell cycle was also evaluated after 72 hours. Açai acted similar to oxaliplatin
 242 ($p < 0.0001$); nevertheless, the açai activity was slightly more acute than that of
 243 oxaliplatin. Apigenin also presented a similar effect of açai, although at a lower
 244 level ($p < 0.001$). Oxaliplatin, açai, and apigenin promoted a decrease in phase
 245 G0/G1 and S followed by an arrest in phase G2/M (Figure 3).

246



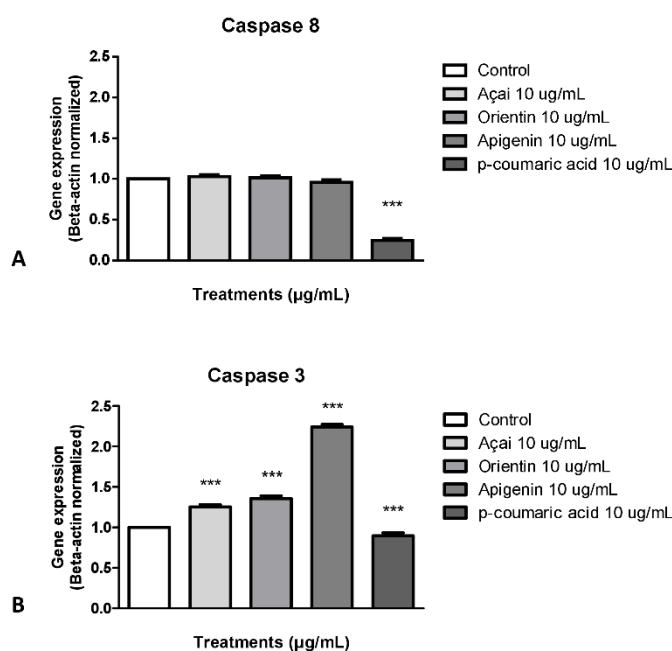
247

248

249 In addition, we also evaluated the potential effect of açai on the apoptotic
 250 pathway from the analysis of three genes expression after 24 hours of treatment
 251 exposure (Figure 4). All genes studied here presented some differential
 252 regulations according to the treatment of HT-29 cells.

253 Analyses of caspase-8 transcription showed the down-regulation of its gene
 254 in the presence of p-coumaric acid (Figure 4A), however, the other treatments
 255 did not present change in the gene expression. Caspase 3 levels presented
 256 heterogeneous results according to treatment. The HT-29 cells exposed to açai,
 257 orientin and apigenin up-regulated the caspase 3 regulation. On the other hand,
 258 p-coumaric acid showed the down-regulation of this gene.

259



260

261

262 4 Discussion

263

264 Our results revealed that açai hydroalcoholic extract present antitumoral
 265 activity against HT-29 colorectal cancer cells. Moreover, the main açai bioactive
 266 molecules (orientin, apigenin, *p*-coumaric acid) were tested in proportional
 267 concentrations found in the best antitumor açai concentration (10 µg/mL). Our
 268 findings suggested that açai is able to decrease HT-29 cell proliferation by cell
 269 cycle arrest and apoptosis activation.

270 The results found in this study suggest that açai showed antitumor activity
 271 against HT-29 cells. Previous investigations corroborated with this find. In this
 272 sense, Alessandra- Perini et al (2018) reported that açai presents antitumor
 273 activity against breast cancer by inhibiting tumorigenesis effect of the chemical
 274 carcinogen DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in an experimental model. In

275 addition, another investigation showed that açai prevent DMBA induced
276 esophageal cancer in rats (Stoner et al., 2010).

277 Also, the study performed by Freitas et al (2017) reported that açai
278 hydroalcoholic extract is able to reduce cell viability and causing necroptosis in
279 the MCF-7 breast cancer cell. In addition, Fragozo et al (2012) suggested that
280 açai presents inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis, probably due
281 to its potential antioxidant activity.

282 Our findings suggested that açai is able to reduce HT-29 cell proliferation
283 by activating the apoptosis pathway detected by flow cytometry. The investigation
284 of Monge- Fuentes et al (2017) also showed that açai induces melanoma cells
285 death by late apoptosis/necrosis measured by flow cytometry.

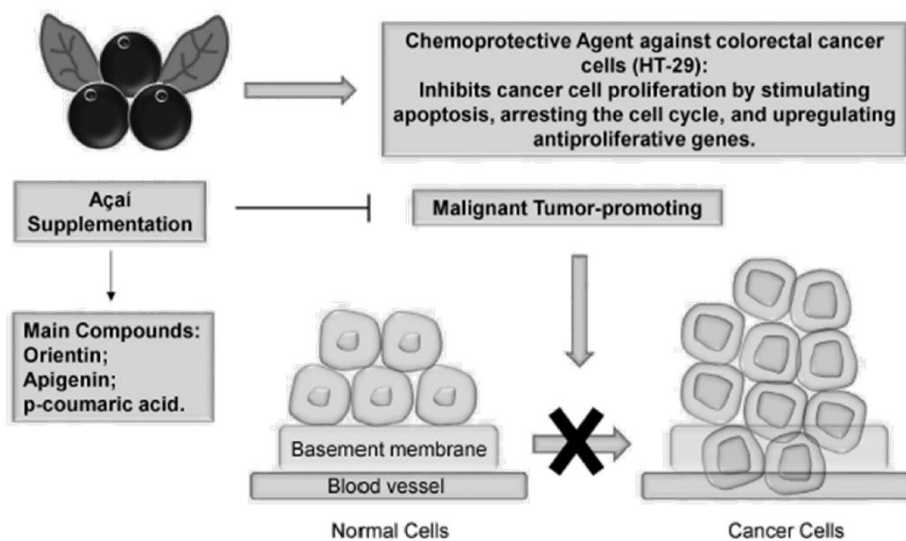
286 In the present study, we showed that açai is able to decrease cell
287 proliferation by arresting the cell cycle in the G2/M phase. Also, açai up-regulated
288 caspase-3 expression. This result indicates that the antitumor causal açai
289 mechanism is related to inhibiting apoptosis since this gene is involved with this
290 pathway. On the other hand, açai did not modulate caspase 8 gene expression.
291 In this sense, probably the antitumor açai action is no involved with extrinsic
292 apoptosis. Del Pozo- Insfran et al (2006) also related that açai activates apoptosis
293 of HL-60 Leukemia Cells by apoptosis activation due to caspase-3 activation.

294 Moreover, we tested here the activity of the main açai bioactive
295 compounds. Our findings showed that the isolated bioactive compound did not
296 show the same antitumor açai effect. Only apigenin presented a better effect on
297 caspase-3 up-regulation than açai. However, in general, açai presented better
298 antitumor activity than the isolated bioactive molecules. The synergic effect of the
299 bioactive molecules can explain this result.

300 Del- Pozo Insfran et al (2006) also reported that açai polyphenolics
301 presented antiproliferation and induced apoptosis in HL-60 human leukemia
302 cells. Interactions between anthocyanins and non-anthocyanin-polyphenolics
303 reduce cell proliferation from 56 to 86% likely due to caspase-3 activation. This
304 study corroborates with our findings, suggesting that the antitumor açai extract is
305 generated by the association of the bioactive molecules, producing a synergic
306 effect.

307 We tested here the antitumor effect of açai hydroalcoholic extract against HT-
308 29 cells as well as the causal mechanism involved and the action of açai main
309 bioactive compounds. Our findings revealed that açai present antitumor activity
310 by reducing cell viability due to the up-regulation of the apoptosis pathway gene
311 (caspase-3) and cell cycle arrest. Moreover, the açai antitumor activity is due to
312 the synergic effect of its bioactive molecules, since in general the main açai
313 isolated bioactive molecules (orientin, apigenin, *p*-coumaric acid) did not show
314 the same antitumor effect than açai (Figure 5). In conclusion, complementary
315 investigations should be performed to develop supplements based on açai
316 extract to prevent cancer development or to better the colorectal cancer
317 treatment.

318



319

320

321

322

323

324 Funding

325

326 This investigation was also supported by grants and fellowships from
 327 Brazilian governmental funds: Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas
 328 (FAPEAM), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGs),
 329 Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Coordenação
 330 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

331

332 Conflict of interest

333

334 The authors declare that they have no conflict of interest.

335

336

337 **Acknowledgments**

338

339 We would like to thank the Laboratory of Biogenomics team for support and
340 technical assistance.

341

342 **References**

343

344 Alessandra-Perini, J.; Perini, J.A.; Rodrigues-Baptista, K.C et al 2018. Euterpe
345 oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA
346 in breast experimental cancer. BMC Complement Altern. Med. 18, 1, 116.

347

348 An, F.; Wang, S.; Tian, Q. et al 2015. Effects of orientin and vitexin from *Trollius*
349 *chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells.
350 *Oncol. Lett.* 10, 4, 2627-2633.

351

352 Barbisan, F.; Motta, J.R.; Trott, A. et al 2014. Methotrexate-related response on
353 human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-
354 SOD2 gene polymorphism. *PLoS One.* 9, 10, 1-11.

355

356 Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Azzolin, V.F. et al 2016. Guaraná a caffeine
357 rich food increases Oxaliplatin sensitivity of colorectal HT

358 29 Cells by apoptosis pathway modulation. *Anticancer Agents Med. Chem.* 16,
359 1055-1065.

360

361 Cadoná, F.C.; Rosa, J.L.; Schneider, T. et al 2017. Guaraná, a highly caffeinated
362 food, presents in vitro antitumor activity in colorectal and breast cancer cell lines
363 by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs pathways. *Nutr. Cancer.* 69, 800-810.

364

365 Campos, M.P.O.; Hassan, B.J.; Riechelmann, R. et al 2011. Cancer-related
366 fatigue: a review. *Ver. Assoc. Med. Bras.* 57, 2, 211-219.

367

368 Dai, Y.; Hogan, S.; Schmelz, E.M. et al 2011. Selective growth inhibition of human
369 breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving
370 downregulation of EGFR expression. *Nutr. Cancer.* 63, 795-801.

371

372 Del Pozo-Insfran, D.; Percival, S.S.; Talcott, S.T. 2006. Açai (*Euterpe oleracea*
373 Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of
374 HL-60 leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4, 1222-1229.

375

376 Dufour, D.L.; Piperata, B.A.; Murrieta, R.S.; et al 2016. Amazonian foods and
377 implications for human biology. *Ann Hum. Biol.* 43, 330-348.

378

379 Elbadawy, M.; Usui, T.; Yamawaki, H. et al 2018. Development of an
380 experimental model for analyzing drug resistance in colorectal cancer. *Cancers*
381 (Basel). 10, 6.

382

383 Fragoso, M.F.; Prado, M.G.; Barbosa, L. et al 2012. Inhibition of mouse urinary
384 bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. Plant
385 Foods Hum. Nutr. 67(3), 235-41.

386

387 Freitas, D.D.S.; Morgado-Díaz, J.A.; Gehren, A.S. et al 2017. Cytotoxic analysis
388 and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the
389 *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. J. Pharm. Pharmacol. 69(9),
390 714-721.

391

392 Fukumasu, H.; Avanzo, J.L.; Nagamine, M.K. et al 2008. *Paullinia cupana* Mart
393 var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of
394 B16/F10 melanoma lung metastases in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 41, 4, 305-
395 10.

396

397 Fukumasu, H.; Latorre, A.O.; Zaidan-Dagli, M.L. 2010. *Paullinia cupana* Mart. var.
398 *sorbilis*, guaraná, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing
399 mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest
400 in EAC cells. Phytother. Res. 25, 1, 11-6.

401

402 Hertz, E.; Cadoná, F.C.; Machado, A.K. et al 2015. Effect of *Paullinia cupana* on
403 MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. Mol. Clin. Oncol.
404 3, 1, 37-43.

405

406 Lin, P.H.; Aronson, W.; Freedland, S.J. 2015. Nutrition, dietary interventions and
407 prostate cancer: the latest evidence. BMC Med. 13, 3.

408

409 Machado, A.K.; Andrezza, A.C.; da Silva, T.M. et al 2016. Neuroprotective
410 effects of açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) against Rotenone in vitro exposure. *Oxid.*
411 *Med. Cell Longey.* 89400850.

412

413 Monge-Fuentes, V.; Muehlmann, L.A.; Longo, J.P. et al 2017. Photodynamic
414 therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A
415 potential treatment for melanoma. *J. Photochem. Photobiol. B.* 166, 301-310.

416

417 Nicoletti, I.; Riccardi, C. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining
418 and flow cytometry. *Nature Protocols.* 1,3, 1458-1461.

419

420 Oliveira, M.M.; Malta, D.C.; Guauche, H. et al 2013. Estimated number of people
421 diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey. *Rev Bras*
422 *Epidemiol.* 18, 146-49.

423

424 Peng, W.; Wu, J.G.; Jiang, Y.B. et al 2015. Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-
425 6"-O-p-coumaroyl- β - D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via
426 mitochondrial- mediated apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 233, 8-13.

427

428 Singh, R., Sharma, J., Goyal, P.K. 2014. Prophylactic role of *Averrhoa carambola*
429 (star fruit) extract against chemically induced hepatocellular carcinoma in swiss
430 albino mice. *Adv. Pharmacol. Sci.* 158936.

431

432 Stoner, D.G.; Wang, L.; Seguin, C. et al 2010. Multiple berry types prevent N-
433 nitrosomethylbenzylamine- induced esophageal cancer in rats. Pharm. Res.
434 27(6), 1138-1145.

435

436 William-Faltaos, S.; Rouillard, D.; Lechat, P. et al 2006. Cell cycle arrest and
437 apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines.
438 Anticancer Res. 26, 2093-1099.

439

440 Yang, J.; Pi, C.; Wang, G. 2018. Inhibition of P13/Akt/mTOR pathway by apigenin
441 induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. Biomed.
442 Pharmacother. 103, 699-707.

443

444 Zhao, X.; Huang, S.; Luo, H. et al 2014. Evaluation of vesicular stomatitis virus
445 mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. Int. J. Exp. Med. 7, 1204-
446 1213.

447

448

449 **Captions**

450

451 **Figure 1.** HT-29 cells were treated with diferentes concentrations of açai, 1; 3;
452 10; 30; 100 µg/mL for 24 hours. The cells viability was determined by propidium
453 iodide staining (PI) by flow cytometry. The results were compared against the
454 percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences
455 ***($p<0.0001$), **($p<0.001$) and * ($p<0.005$).

456

457 **Figure 2.** HT-29 cells were exposed to the best açai concentration found in the
458 previous experiment (10 µg/mL) as well as the main bioactive molecules, orientin,
459 apigenin, and *p*-coumaric acid, found in the proportional concentration of açai (10
460 µg/mL). Also, cells were treated with oxaliplatin (20 µM) that is used as positive
461 control of cytotoxicity. Cell survival was performed after 24 hours of treatment

462 exposition using Annexin-V-FITC and PI staining kit by flow cytometry. The
463 results were compared against the percentage of negative control (only cells).
464 N=3, significant differences ***($p<0.0001$), **($p<0.001$) and * ($p<0.005$).

465

466 **Figure 3.** Cell cycle profile of HT-29 cells treated with oxaliplatin (20 $\mu\text{mol/L}$)
467 guaraná (100 $\mu\text{g/mL}$) and proportional concentrations of orientin, apigenin, and
468 *p*-coumaric acid for 72 hours. The graphic shows the DNA content in each phase
469 of cell cycle detected using propidium iodide staining (PI) by flow cytometry. The
470 results were compared against the percentage of negative control (only cells).
471 N=3, significant differences ***($p<0.0001$), **($p<0.001$) and * ($p<0.005$).

472

473 **Figure 4.** Açai, its main metabolites (orientin, apigenin, and *p*-coumaric acid) and
474 oxaliplatin effect on genes of the apoptosis pathway: Bax, Bcl-2 (presented as
475 Bax/Bcl-2 ratio), caspase 8 and caspase 3 of HT-19 cells. The results were
476 compared against the percentage of negative control (only cells). N=3, significant
477 differences ***($p<0.0001$), **($p<0.001$) and * ($p<0.005$).

478

479 **Figure 5.** Antitumor effects of açai supplementation on colorectal cancer cells
480 (HT-29).

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

5 DISCUSSÃO

Existe uma quantidade muito grande de evidências que associam o estresse oxidativo ao envelhecimento biológico e a mais de 200 tipos de doenças e disfunções crônico-degenerativas, como por exemplo o câncer.

O câncer, atualmente, configura-se como um dos principais problemas de saúde pública mundial, onde os números de casos vêm aumentando de maneira considerável em todo mundo. Em geral, o câncer é considerado uma doença do desenvolvimento, porque envolve alterações na divisão e diferenciação celular. Na célula saudável, a divisão celular é controlada basicamente por dois grupos de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, os primeiros estimulam a divisão celular, já os últimos exercem uma ação inibitória, dessa forma o crescimento celular é controlado. Entretanto, mutações nesses genes podem ocorrer e, dessa forma, desencadear o desenvolvimento de um grupo de células com crescimento desordenado que tem potencial para invadir outros tecidos e se espalhar para outros órgãos do corpo (metástases), o que caracteriza o câncer.

Na vasta maioria dos casos a carcinogênese ocorre em células de origem epitelial, já que as mesmas possuem uma alta taxa proliferativa e apresentam características limitadas de senescência celular. Geralmente, mutações genéticas irão ocorrer nas células-tronco do epitélio presentes na camada germinativa do tecido que produz constantemente novas células epiteliais, tanto no tecido queratinizado, como é o caso da pele quanto no tecido não-queratinizado como é o caso das células que recobrem o trato gastrointestinal e também estão presentes em glândulas como a próstata.

Os resultados apresentados nessa tese iniciam por um estudo *in vitro*, onde avaliamos o efeito da genotoxicidade associada ao desbalanço S-HP em queratinócitos saudáveis. Neste primeiro estudo, utilizamos os queratinócitos (HaCat), que são células da epiderme humana responsáveis pela proteção do corpo de estressores ambientais e patógenos que desencadeiam o estresse oxidativo e conseqüentemente ao envelhecimento da pele, processos inflamatórios e desenvolvimento do câncer. A enzima SOD2 é uma das principais enzimas na proteção ao estresse oxidativo gerado na mitocôndria. No entanto um SNP específico encontrado nessa enzima, conhecido como Val16Ala-SOD2, confere eficiências

enzimáticas específicas, dependendo do alelo, especialmente para os alelos homocigotos (AA e VV), na qual tem sido associados a alguns tipos de câncer. A partir desta hipótese, investigamos como os queratinócitos são afetados por esse desequilíbrio oxidativo para entendermos os mecanismos que levam ao envelhecimento celular, doenças inflamatórias e desenvolvimento do câncer e assim propor tratamentos alternativos que possam ajudar na prevenção destes processos.

Nossos resultados mostraram que a concentração de paraquat e porfirina causaram um desequilíbrio nas células HaCat (70 μ M), diminuindo a viabilidade celular (para paraquat) e aumentando a viabilidade e proliferação celular (para porfirina). O paraquat diminui a viabilidade possivelmente devido a maior produção de $O_2^{\bullet-}$. Altos níveis de $O_2^{\bullet-}$ podem gerar H_2O_2 e O_2 por reação de dismutação catalisada pela SOD, podendo gerar danos em moléculas orgânicas, como lipídios, proteínas e DNA.

Por outro lado, a resposta celular aos níveis de H_2O_2 pode ativar diretamente, em alguns casos, vias específicas de sinalização de crescimento, como as Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) (ZHANG & LIU, 2002). Este fato pode explicar nossos achados usando o tratamento com porfirina. Nossos resultados mostraram que a porfirina aumentou a viabilidade e a proliferação celular, uma vez que esta molécula produz H_2O_2 que pode ativar o crescimento celular e as vias de viabilidade.

A produção de ERO e NO também foi testada nesta investigação. Os resultados encontrados no ensaio DCFH-DA confirmam que o tratamento com porfirina produziu altos níveis de EROs. Além disso, altos níveis de NO foram detectados pela exposição à porfirina. No entanto, o tratamento com paraquat mostrou níveis normais de EROs e NO após altos níveis de lipoperoxidação. Este resultado indicou que baixos níveis de EROs e NO foram encontrados devido à interação do $O_2^{\bullet-}$ com o NO, produzindo peroxinitrito (ONOO $^-$), principal molécula responsável pelo dano lipídico. Este fato foi confirmado pelos altos níveis de TBARS após a exposição ao paraquat. O estudo realizado por Kocak-Toker et al (2005) corrobora com nossos achados, uma vez que esses autores relataram um aumento no dano lipídico devido à exposição a ONOO $^-$. No entanto, o dano lipídico não foi alterado após o tratamento com porfirina, indicando que o H_2O_2 produzido por porfirina foi direcionado para o dano protéico, uma vez que houve altos níveis de proteína carbonil após o tratamento com porfirina. O estudo de Zhang et al (2018) corrobora com nossos achados, uma vez que relataram que o H_2O_2 é responsável por gerar dano protéico.

Além disso, o dano ao DNA foi determinado em nosso estudo através do ensaio de Cometa, bem como o Teste de Micronúcleo, sugeriram que ambos os tratamentos, com paraquat e porfirina, causaram danos de DNA. A alta produção de $O_2 \cdot -$ e H_2O_2 pode gerar reação de Fenton, que é responsável pela produção de $\cdot OH$, que apresenta alta afinidade ao DNA e causa genotoxicidade (PARK & IMALAY, 2003; HU et al., 2017). Mutações de DNA podem gerar disfunção celular e induzir apoptose. Este parâmetro também foi medido em nosso estudo, e sugerimos altos níveis de apoptose na exposição ao paraquat, confirmando a menor viabilidade celular no ensaio MTT.

Além disso, nossos resultados indicaram que a exposição à porfirina e paraquat pode interferir na via *Keap1-Nrf2*, pois a porfirina aumentou a expressão do gene *Keap1* e *Nrf2* e o paraquat diminuiu a expressão de *Nrf2* quando comparado aos níveis de controle. Em termos gerais, a porfirina parece modular esta via mais significativamente. Estudos anteriores relataram que *Keap1* estimula a degradação proteasomal dependente de ubiquitina *Nrf2*. Quando as condições de estresse oxidativo aumentam, *Keap1* é inativado, e a ubiquitinação de *Nrf2* é interrompida, aumentando a expressão do gene *Nrf2* para proteger as células contra danos no metabolismo oxidativo (LU et al., 2016; ZHU et al., 2018).

A partir destes resultados e sabendo que para combater a alta produção de EROs as células humanas possuem a capacidade de desenvolver um mecanismo de defesa, denominado sistema de defesa antioxidante, dividido em enzimático e não-enzimático. Dentre os enzimáticos, incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o sistema não-enzimático é composto por uma variedade de substâncias antioxidantes, principalmente de origem dietética.

Os antioxidantes naturais como por exemplo, compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides, contidos em muitas frutas e vegetais presentes em baixas concentrações dentro das células, são eficazes na redução dos RL como sistema de proteção em diversas doenças. Estes possuem forte potencial para inibir o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e oxidação de produtos de degradação, podendo atuar sozinhos ou em sinergia para manter o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (SHAFI et al., 2019).

Diante destas evidências, nosso segundo estudo foi avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açai) em células de câncer de próstata (DU 145).

O presente estudo investigou o potencial efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico do açai em células de câncer de próstata. Em geral, os resultados mostraram que o açai apresentou efeito antitumoral frente a linhagem celular de câncer de próstata (DU145), inibindo a proliferação celular. Um estudo realizado por Khan e colaboradores (2015) corrobora com os nossos estudos, mostrando um efeito antiproliferativo da molécula orientina em células de câncer de fígado HepG2. Assim como o estudo de An e colaboradores (2015) que mostraram que a orientina induziu a apoptose em células de câncer de esôfago. EC-109.

Segundo estudos de Shukla & Gupta (2010), Wang e colaboradores (2016) e já demonstraram que a apigenina vem sendo utilizada como um quimiopreventivo no câncer de próstata, sendo capaz de inibir a proliferação celular em células DU145, além de inibir a produção de androgênio. Além disso, um estudo também sugere que a apigenina poderia melhorar a resposta celular aos quimioterápicos (ARMSTRONG, GAO, 2015).

Nossos resultados também mostraram que o açai foi capaz de suprimir a expressão do gene *Bcl-2* corroborando com a hipótese de que o açai atua na via antiproliferativa. Corroborando com o nosso resultado, um estudo de Chen e colaboradores (2016) sugeriram que a apigenina foi capaz de suprimir a expressão do gene *Bcl-2* em células de glioma.

O açai sozinho ou sua interação com o docetaxel induziu a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M respectivamente. Corroborando com o nosso achado, um estudo realizado por Fitzpatrick e colaboradores (2014) mostrou que o quimioterápico Docetaxel impede a divisão celular e interrompe o ciclo celular na fase mitótica, além de induzir a apoptose através da inibição do gene *Bcl-2*.

Outro estudo, realizado por Nehmé e colaboradores (2001) mostrou um efeito benéfico no sinergismo entre o quimioterápico Docetaxel e o ácido all-trans-retinóico em células DU145, induzindo a parada do ciclo celular na fase G2/M e indução da apoptose. A indução da apoptose poderia ser observada em células de câncer de próstata expostas com açai e Docetaxel, mas esta não é a principal causa do efeito antitumoral e por este motivo não foi observado em 24h de cultura celular. Esta

hipótese é baseada em um aumento da expressão do gene *BAX*, especialmente nas células tratadas com ambos, açaí (3µg/mL) e Docetaxel.

Diante de estudos anteriores corroborando com o nosso segundo estudo, mostrando que as moléculas bioativas encontradas no açaí possuem propriedades antitumorais que ajudariam a prevenção e possível tratamento para diferentes tipos de câncer, nosso terceiro estudo foi investigar o efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico do açaí e dos principais compostos bioativos presentes no fruto em linguagem de câncer colorretal (HT-29).

Nossos resultados revelaram que o extrato hidroalcoólico do açaí apresenta atividade antitumoral contra células do câncer colorretal HT-29. Além disso, as principais moléculas bioativas de açaí (orientina, apigenina, ácido p-cumárico) foram testadas em concentrações proporcionais encontradas na melhor concentração antitumoral de açaí (10 µg / ml). Nossos achados sugerem que o açaí é capaz de diminuir a proliferação de células HT-29 pela parada do ciclo celular e ativação da apoptose.

Investigações anteriores corroboraram com esse achado. Nesse sentido, Alessandra-Perini et al (2018) relataram que o açaí apresenta atividade antitumoral contra o câncer de mama ao inibir o efeito da tumorigênese do carcinógeno químico DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) em um modelo experimental. Além disso, outra investigação mostrou que o açaí previne o câncer de esôfago induzido por DMBA em ratos (STONER et al., 2010).

Além disso, o estudo realizado por Freitas et al (2017) relatou que o extrato hidroalcoólico do açaí é capaz de reduzir a viabilidade celular e causar necroptose na célula cancerígena da mama MCF-7. Além disso, Fragoso et al (2012) sugeriram que o açaí apresenta inibição da carcinogênese da bexiga urinária de camundongos, provavelmente devido à sua potencial atividade antioxidante.

Nossos resultados sugerem que o açaí é capaz de reduzir a proliferação de células HT-29 pela ativação da via de apoptose detectada por citometria de fluxo. A investigação de Monge-Fuentes et al (2017) também mostrou que o açaí induz a morte de células de melanoma por apoptose tardia / necrose medida por citometria de fluxo.

No presente estudo, mostramos que o açaí é capaz de diminuir a proliferação celular ao interromper o ciclo celular na fase G2 / M. Além disso, o açaí modulou a expressão de caspase-3. Esse resultado indica que o mecanismo causador do açaí antitumoral está relacionado à inibição da apoptose, uma vez que esse gene está

envolvido com essa via. Por outro lado, o açaí não modulou a expressão do gene da caspase 8. Nesse sentido, provavelmente a ação antitumoral do açaí não está envolvida com a apoptose extrínseca. Del Pozo-Insfran et al (2006) também relataram que o açaí ativa a apoptose das células da leucemia HL-60 por ativação da apoptose devido à ativação da caspase-3.

Além disso, testamos aqui a atividade dos principais compostos bioativos do açaí. Nossos achados mostraram que o composto bioativo isolado não apresentou o mesmo efeito antitumoral do açaí. Apenas a apigenina apresentou um melhor efeito na regulação positiva da caspase-3 quando comparado com o açaí. No entanto, em geral, o açaí apresentou melhor atividade antitumoral do que as moléculas bioativas isoladas. O efeito sinérgico das moléculas bioativas pode explicar esse resultado.

Del-Pozo Insfran et al (2006) também relataram que os polifenóis do açaí apresentavam antiproliferação e induziam apoptose nas células da leucemia humana HL-60. As interações entre antocianinas e antocianinas-polifenólicas reduzem a proliferação celular de 56 a 86%, provavelmente devido à ativação da caspase-3. Este estudo corrobora com nossos achados, sugerindo que o extrato de açaí antitumoral é gerado pela associação das moléculas bioativas, produzindo um efeito sinérgico.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliado o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açaí) em células de câncer de próstata (DU 145) e células de câncer colorretal (HT-29) e o efeito genoprotetor em células de queratinócitos (HaCat) submetidas a um desbalanço farmacológico S-HP.

Assim, com base nos resultados descritos nessa investigação, podem ser feitas as seguintes conclusões:

1. No efeito do desbalanço S-HP nos indicadores de cito-genotoxicidade de queratinócitos saudáveis:
 - a exposição ao paraquat diminuiu a viabilidade celular, aumentou a lipoperoxidação e a apoptose;
 - o tratamento com porfirina aumentou a viabilidade e a proliferação celular, a produção de ROS e NO e gerou danos às proteínas e ao DNA;

- o desequilíbrio de $O_2 \cdot -H_2O_2$ regula diferencialmente o metabolismo oxidativo da linhagem de queratinócitos HaCaT via de expressão do gene *Keap1-Nrf2*;

2. No efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açai) em células de câncer de próstata (DU 145):

- O extrato de açai diminuiu significativamente a proliferação celular, bem como o crescimento de colônias formadas.

- O extrato inibiu a expressão do gene *Bcl-2*, responsável pelo efeito antiproliferativo, porém não induziu significativamente a apoptose celular.

- O efeito do extrato de açai foi evidente no ciclo celular, retendo as células nas fases G0/G1, portanto impedindo o crescimento e proliferação das células de câncer de próstata DU 145.

3. No efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* (açai) em células de câncer colorretal (HT-29), e a ação dos principais compostos bioativos do açai:

- o extrato de açai apresenta atividade antitumoral ao reduzir a viabilidade celular devido à regulação positiva do gene da via da apoptose (caspase-3) e à parada do ciclo celular;

- a atividade antitumoral do açai se deve ao efeito sinérgico de suas moléculas bioativas;

REFERÊNCIAS

ALGARVE, T. D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human 121ntio blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Research**. v. 12, p. 5134-5144, 2013.

ALESSANDRA-PERINI, J. et al. Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC Complement Altern. Med**. v. 18, n.1, p. 116, 2018.

AMBROSONE, C. B. et al. Cigarette smoking, N- acetyltransferase 2 genetic polymorphism, and breast cancer risk. **Jama**. V.276, p. 1494- 1501, 1996.

AN, F. et al. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. **Oncology letters**. V.10, n. 4, p. 2627-2633, 2015.

ANTONINI, T. et al. 121ntioxida functional determinants on 5.5-year mortality in Amazon riparian elderly. **Revista Panamericana de Salud Publica-pan American Journal of Public Health**. v.40, p. 9-15, 2016.

AZZOLIN, V. F. et al. Superoxide- hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology in Vitro**. v.32, p. 8-15, 2016.

BAUMANN, L.; WOOLERY-LLOYD, H.; FRIEDMAN, A. "Natural" ingredients in cosmetic dermatology. **J. Drugs Dermatol**. V. 8, n. 6, p.5-9, 2009.

BACELAR JÚNIOR, A. J. et al. Prostate cancer: diagnostic methods, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. V. 10, n. 3, p. 40-46, 2015.

BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PlosOne**. V.9, n. 10, 2014.

BARBISAN, F. et al. The in vitro influence of a genetic superoxide- hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. **Rejuvenation Research**. V.1, p.1, 2017.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de nutrição**. V.23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARRETO, R. C et al. The Double Role of Inflammation in the Emergence of Cancerous Lesions. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. V. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.

BICA, C.G., et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. **Pathol Oncol Res**. v. 15, p. 19-24, 2009.

BOAM T. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. **E. cancer medical science**. V. 9, n. 585, 2015.

BOO, Y. C. p- coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: a review focusing on its antimelanogenic effects. **Antioxidants**. V. 8, n. 275, p. 1-16, 2019.

BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer**. v.132, n.5, p. 1133–45, 2013.

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**. v. 47, n. 10, p. 781-792, 2013.

CADONÁ, F. C. et al. Guaraná a richest caffeine food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation. **Anticancer Agents Med. Chem**; in press. 2015.

CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CEJUP, p.271, 1991.

CERUTTI, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**. V. 227, p. 375 – 381, 1985.

CHA, T. et al. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. **American association for cancer research**. V. 65, n.6, p. 2287-2295, 2005.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenetics: gene expression regulation at transcriptional level and its implications. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. V. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

DAL BERTO, M., et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. **Med Oncol**. v. 32, p. 1-10, 2015.

D' ALESSANDRO, A., et al. Mediterranean diet and cancer risk: na open issue. **Int J Food Sci Nutr**. v.26, n.6, p. 593-605, 2016.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quim. Nova**. V. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

DELLAFIORA, L. M. et al. Modelling the effect of phase II conjugations on topoisomerase I poisoning: pilot study with luteolin and quercetin. **J Agric Food Chem**. V. 62, n. 25, p. 5881–5886, 2014.

DEL POZO-INSFRAN D., PERCIVAL S. S., TALCOTT S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **J. Agric. Food Chem**. V. 54, n. 4, p. 1222-9, 2006.

DEMBINSKA-KIEC A. et al. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **Br. J. Nutr.** V. 99; n. 1; p. 109-17, 2008.

DIAS M. M. et al. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutr Cancer.** V. 66, n. 8, p. 1394-405, 2014.

DINU, M. et al. Mediterranean diet and multiple health outcomes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomized trials. **Eur J Clin Nutr.** V.72, n.1, p. 30-43, 2017.

DORNELLES, E. B. et al. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala- MnSOD gene polymorphism. **Environmental Science and Pollution Research International.** V.1, p.1-3, 2016.

DUARTE, T. et al. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-123 antioxidant gene polymorphism. **Pharmacogenomics Journal.** V.16, p. 501-506, 2016.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B., Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Rev. Bras. De Cancerol.**, v. 52, n. 2, p.165-171, 2006.

FAVACHO H. A. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. **Rev. bras. Farmacogn.** V. 21, n. 1, 2010.

FERNANDES, A. G.; MAFRA, D. Zinc and Cancer: A review. **Rev. Saúde. Com.** V. 1, n. 2, p. 144-156, 2005.

FRAGOSO M. F. et al. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleracea* Martius) intake. **Plant. Foods Hum. Nutr.** V. 67, n. 3, p. 235-41, 2012.

FREITAS, D. D. S. et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 69, n. 9, p. 714-721, 2017.

FUGANTI, P. E.; MACHADO, M. T.; WROCLAWSKI, E. R. Diet and prostate cancer: recent issues about chemoprevention. **RBM.** P. 39-46, 2003.

GARÓFOLO, A. et al. Diet and cancer: An epidemiological view. **Rev. Nutr.** V. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.

GIBBS, A. et al. Sulforaphane inhibits the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. **Cell Biology.** V.106, n. 39, p. 16663-16668, 2009.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HAN, K. et al. Luteolin inhibited proliferation and induced apoptosis of prostate cancer cells through mir-301. **Oncotargets and Therapy**. V.9, p. 3085- 3094, 2016.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae). **New York: New York Botanical Garden**, p. 90, 1996.

HODGE, W.H. Palm cabbage. **Principes**. V.9, p. 124-131, 1965.

HU, P. et al. Near infrared-assisted Fenton reaction for tumor-specific and mitochondrial DNA-targeted photochemotherapy. **Biomaterial**. V.141, p. 86-95, 2017.

INCA. Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. **ABC do Câncer**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

INCA. Estimativas de câncer. 2013. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014. Acesso em: 29jul 2016.

JANSEN, M. C. et al. Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the Seven Countries Study. **Int J Cancer**. V. 81, n. 2, p. 174-9, 1999.

JOGANATHAN, S. K.; SUPRYANTO, E.; MANDAL, M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology**. V. 19, n. 43, p. 7726- 7734, 2013.

KALLIFATIDIS, G.; HOY, J.; LOKESHWAR, B. L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration- resistant prostate cancer. **Seminars in Cancer Biology**. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.semancer.2016.06.003>. 2016.

KHAN, F. et al. Structure-Activity relationship studies on Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) based flavonoid orientin and its analogue for cytotoxic activity in liver cancer cell line HepG2. **Comb Chem High Throughput Screen**. 2016 [Epub ahead of print].

KYPRIANOU, N.; ISAACS, J.T. Expression of transforming growth factor β in rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. **Mol Endocrinol**. v. 3, p. 1515-1522, 1989.

KOÇAK-TOKER N. et al. Peroxynitrite induced decrease in Na^+ , K^+ -ATPase activity is restored by taurine. **World J Gastroenterol**. V. 11, p. 3554-3557, 2005.

KREWER, C. C. et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytotherapy Research (Online)**. v. 25, p. 1-8, 2011.

KREWER, C. C. et al. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. **European Food Research & Technology (Print)**. v. 238, p. 1, 2014.

LAM, K. Y. et al. A Review on Medicinal Properties of Orientin. **Advances in Pharmacological Sciences**. P. 1- 9, 2016.

LEE, H. H. et al. Antitumor and anti-invasive effect of apigenin on human breast carcinoma through suppression of IL-6 expression. *Int J Mol Sci*. v. 20, n. 13, p. 1-16, 2019.

LEYVA-LOPES, N. et al. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**. V. 17, n. 6, 2016.

LICHTENTHÄLER R. et al. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. **Int. J. Food Sci. Nutr**. v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LU, M. et al. The Keap1–Nrf2–ARE Pathway as a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. **Med Res Rev**. v. 36, p. 924-963, 2016.

MAIA- RIBEIRO, E. A. et al. Functional, balance and health determinants of falls in a free living community Amazon riparian elderly. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 55, p. 1, 2012.

MARCHIORI, J. N. C. Elementos de dendrologia. **Santa Maria: UFSM**. P. 163, 1995.

MARTIN I.; JONES M. A.; GROTEWIEL M. Manipulation of Sod1 expression ubiquitously, but not in the nervous system or muscle, impacts age-related parameters in Drosophila. **FEBS Lett**. V. 583, n. 13, p. 2308-14, 2009.

MONGE-FUENTES, V. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (Euterpe oleracea Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **J. Photochem. Photobiol. B**. v. 166, p. 301-310, 2017.

MONTAGNER, G. F. F. S., et al. Toxicological effects of 125ntioxidante radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**. V. 5, p. 1410-1416, 2010.

MORI, A. et al. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. **American association for cancer research**. V. 66, n. 6, p. 3222- 3229, 2006.

MULHEM, E.; FULBRIGHT, N.; DUNCAN, N. Prostate Cancer Screening. **Am. Fam. Physician**. V. 92, n. 8, p. 683-8, 2015.

NABAVI, S. F. et al. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: a brief review. *Brain Research Bulletin*. V. 119, p. 1-11, 2015.

OBERLEY, L.W., et al. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. **Med Hypotheses**. V. 6, p. 249-68, 1980.

OLIVEIRA, M. do S. P. et al. Variação fenotípica em acessos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) para caracteres relacionados à produção dos frutos. **Belém: Embrapa-CPATU**. P.23, 1998.

PARK S.; IMLAY, J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. **J Bacteriol**. V. 185, p. 1942-1950, 2003.

PARKER, J. R.; MAITLAND, N. J. The Molecular and Cellular Origin of Human Prostate Cancer. **Molecular Cell Research**. V. 1863, n. 6 Pt A, p. 1238- 1260. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.016. 2016.

PASSOS, C. J. S. et al. Daily 126ntioxi intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**. v. 18, n. 1, p. 76-87, 2008.

PEI, K. et al. p- Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 96, n. 9, p. 2952- 2962, 2016.

PERIN, L.; ZANARDO, V. P. S. Functional foods: a possible protection against the development of 126ntiox. **Perspectiva, Erechim**. v. 37, n. 137, p. 93-101, 2013.

PIACENTINI, A. B.; MENEZES, H. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Revista Saúde e Pesquisa**. V. 5, n. 3, p. 593-604, 2012.

PORTELLA, R. L. et al. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: An in vitro and in vivo study. **Lipids in Health and Disease**. V. 12, n.12, p. 1–9, 2013.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Beneficial effects of açai. **International Journal of Nutrology**. v. 5, n. 1, p.15-20, 2012.

REINER, T. et al. Betulinic acid selectively increases protein degradation and enhances prostate cancer- specific apoptosis: possible role for inhibition of deubiquitinase activity. **PlosOne**. V.8, n. 2, p. 1-11, 2013.

RIBEIRO, E. E. et al. Projeto Idoso da Floresta: indicadores de saúde dos idosos inseridos na Estratégia de Saúde da Família (ESF- SUS) de Manaus- AM, Brasil. **Ver. Bras. Geriatr. Gerontol**. v.11, n.3, p. 307-326, 2008.

RIBEIRO, E.E.; CRUZ, I.B.M. Dieta Amazônica: Saúde e longevidade. Ed Da Amazônia, 2012.

RIBEIRO, E. E. et al. Aspects of the health of Brazilian elderly living in a riverine municipality of Amazon rainforest. **Revista Amazonense de Geriatria e Gerontologia**. v.1, p. 2, 2013.

RODRIGUES, S. et al. Carcinoma da próstata metastático resistente à castração – novas abordagens terapêuticas. **Acta Urológica Portuguesa**. V. 31, n.1-2, p. 36-40, 2014.

SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G. Does a Mediterranean- type diet reduce cancer risk?. **Curr Nutr Rep**. v.5, p. 9-17, 2016.

SCHOTT, KL. Et al. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. **Chem Biol Interact**. V.273, p. 18-27, 2017.

SHAFI, S. et al. The impact of natural antioxidants on the regenerative potential of vascular cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. V.6, n. 28, p. 1-9, 2019.

SHAMALADEVI, N. et al. Ericifolin: a novel antitumor compound from allspice that silences androgen receptor in prostate cancer. **Carcinogenesis**. V.34, n.8, p.1822–1832, 2013.

SHAO, D. et al. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. **J Mol Cell Cardiol**. V. 52, n. 3, p. 550– 558, 2012.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharm Res**. V. 27, n. 6, p. 962- 978, 2010.

SHUKLA, S. et al. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. **Apoptosis**. V. 19, p. 883-894, 2014.

SILVA, D. A. et al. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). **Nat Prod Res**. v. 26, n. 4, p. 364-369.

SILVA, D. F. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complement Altern Med**. V. 29, n. 14, p. 175, 2014.

SILVA, C. T.; JASIULIONS, M. G. Relação entre esse 127ntioxida, alterações epigenéticas e cancer. **Câncer**. P. 38-42, 2014.

SILVA, T. O. et al. Association between Advanced Oxidized Protein Products and 5-Year Mortality Risk among Amazon Riparian Elderly Population. **Free Radical Research**. v. 1, p. 1-27, 2014.

SILVA, T. O. et al. Association between T102C 5-HT2A receptor gene polymorphism and 5-year mortality risk among Brazilian Amazon riparian elderly population. **American Journal of Human Biology**. v. 29, p. e23016-11, 2017.

SILVA, I. C. V. et al. Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and 127ntioxidante activity of an enriched flavonoid extract and from *Passiflora mucronata*. **Anticancer Agents Med Chem**. 2018.

SOUZA-MONTEIRO, J. R. et al. Anticonvulsant properties of Euterpe oleracea in mice. **Neurochem Int.** v. 90, p. 20-7, 2015.

STONER, G. D. et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. **Pharm. Res.** V. 27, n. 6, p. 1138-45, 2010.

SULEIMAN, L. et al. Guaraná Supplementation Modulates Tryglicerides and Some Metabolic Blood Biomarkers in Overweight Subjects. **Annals of Obesity & Disorders.** v.1, p.1-5, 2016.

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

TANAGHO, E. A.; MCANINCH J. W. Urologia Geral de Smith- 16 ed.- Barueri, SP: Manole. p 406-414, 2007.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** V. 60, n. 4, p. 145-157, 2005.

TUORKEY, M. J. Molecular targets of luteolin in cancer. **Eur J Cancer Prev.** V. 25, n. 1, p. 65–76, 2016.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods.** V. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

WANG, X. et al. Suppression of rat and human androgen biosynthetic enzymes by apigenin: Possible use for the treatment of prostate cancer. **Fitoterapia.** V. 111, p. 66-72, 2016.

WATSON, P. A.; ARORA, V. K.; SAWYERS, C. L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. **Nat. Rev. Cancer.** V. 15, n. 12, p. 707- 711, 2015.

WEEDEN, CE; ASSELIN-LABAT, ML. Mechanism of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** V.1864, n.1, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 30Jul 2019.

WU, X.; GU, J. Heritability of prostate cancer: a tale of rare variants and common single nucleotide polymorphisms. **Ann Transl Med.** V. 4, n. 10, 2016.

YAMAGUCHI, K. K. et al. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chem.** V. 179, p. 137-51, 2014.

ZHANG, W.; LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Res.** V. 12, p. 9-18, 2002.

ZHANG L. et al. Effect of different stunning methods on antioxidant status, in vivo myofibrillar protein oxidation, and the susceptibility to oxidation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during 72 h post-mortem. **Food Chem.** V. 246, p. 121-128, 2018.

ZHOU, Y. et al. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. **Nutrients.** V. 8, n. 156, doi: 10.3390/nu8030156, 2016.

ZHU, H. et al. Protective properties of Huperzine A through activation Nrf2/ARE-mediated transcriptional response in X-rays radiation-induced NIH3T3 cells. **J Cell Biochem.** V. 119, p. 8359-8367, 2018.

ANEXO 1

★ → Decision on your Manuscript #MOLE-D-19-01131R1

Enviado em: 25/07/2019 | 12:17

De: "Molecular Biology Reports (MOLE)" <em@editorialmanager.com>

Para: micheli.l.j@bol.com.br

Dear Dr Lamberti Jobim:

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway", which you submitted to Molecular Biology Reports.

Based on the advice received, your manuscript could be accepted for publication should you be prepared to incorporate minor revisions. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which are attached, and submit a list of responses to the comments. Your list of responses should be uploaded as a file in addition to your revised manuscript.

Molecular Biology Reports
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05012-1>

ORIGINAL ARTICLE



Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway

Micheli Lamberti Jobim¹ · Verônica Farina Azzolin¹ · Charles Elias Assmann² · Vera Maria Melchior Morsch² · Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,3} · Liliane de Freitas Bauermann¹

Received: 8 May 2019 / Accepted: 30 July 2019
 © Springer Nature B.V. 2019

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of a superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance of the superoxide dismutase manganese dependent (SOD2) gene, generated by paraquat and porphyrin exposure, on the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism. Paraquat acts increasing superoxide (O_2^-) levels, while porphyrin increases hydrogen peroxide (H_2O_2) levels, acting as VV-SOD2-like and AA-SOD2-like molecules, respectively. First of all, HaCaT cells were treated with different concentrations of paraquat and porphyrin (1; 10; 30, and 70 μ M) to determine the concentration of both that causes imbalance. After defining the concentration of paraquat and porphyrin (70 μ M), a time curve was performed (1, 3, 6, and 24 h) to evaluate ROS production levels. Other oxidative parameters, such as nitric oxide (NO), lipoperoxidation (TBARS) and protein carbonyl, were evaluated after 24 h of incubation, as well as genotoxic analyses, apoptosis detection, and gene expression. Our findings revealed that paraquat exposure decreased cell viability, increasing lipoperoxidation, DNA damage, and apoptosis. On the other hand, porphyrin treatment increased cell viability and proliferation, ROS and NO production, triggering protein and DNA damage. In addition, porphyrin up-regulated Keap1 and Nrf2 gene expression, while paraquat decreased Nrf2 gene expression. In this sense, we suggested that the superoxide-hydrogen peroxide imbalance

ANEXO 2

Ms. Ref. No.: JFF-D-19-01999

Title: Açai (Euterpe oleracea, Mart.) and Its Major Bioactive Molecules Present Antitumor Effect Against Colorectal Cancer Cells (HT-29) by Inhibiting Apoptosis Pathway
Journal of Functional Foods

Dear Dr. Micheli Jobim,

Your submission "Açai (Euterpe oleracea, Mart.) and Its Major Bioactive Molecules Present Antitumor Effect Against Colorectal Cancer Cells (HT-29) by Inhibiting Apoptosis Pathway" will be handled by Associate Editor ELVIRA DE MEJIA.