

Efeitos da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara na tumorigênese colorretal em modelo experimental *in vivo*

Effects of supplementation with products based on juçara fruit pulp on colorectal tumorigenesis in an *in vivo* experimental model

DOI:10.34117/bjdv8n10-174

Recebimento dos originais: 16/09/2022

Aceitação para publicação: 17/10/2022

Leonardo Oliveira Trivilin

Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo
Instituição: Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre - ES, Brasil
E-mail: leotrivilin@gmail.com

Cinthia Vidal Monteiro da Silva Couto

Pós-Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo
Instituição: Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Centro de Ciências da
Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço: Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP: 29047-105, Vitória - ES,
Brasil
E-mail: cinthiavidalcouto@gmail.com

Juliana Dalbó

Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo
Instituição: Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Centro de Ciências da
Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço: Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP: 29047-105, Vitória - ES,
Brasil
E-mail: julianadalbo@hotmail.com

Leandro André Milholli

Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Espírito Santo
Instituição: Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço: Alto Universitário, s/nº, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre - ES, Brasil
E-mail: andremilholli@gmail.com

Luciano de Paulo Moreira

Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Espírito Santo
Instituição: Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço: Alto Universitário, s/nº, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre - ES, Brasil
E-mail: lucianomoreira1999@gmail.com

Pollyanna Ibrahim Silva

Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Departamento de Engenharia de Alimentos – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre - ES, Brasil

E-mail: pollyannaibrahim@gmail.com

Jankerle Neves Boeloni

Doutorado em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

Instituição: Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre - ES, Brasil

E-mail: jankerle@gmail.com

Adriana Madeira Álvares da Silva

Pós-doutorado em Biologia Molecular pela Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço no Hospital Heliópolis

Instituição: Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo

Endereço: Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP: 29047-105, Vitória - ES, Brasil

E-mail: adriana.biomol@gmail.com

RESUMO

Substâncias antioxidantes podem proteger contra o desenvolvimento do câncer colorretal, reduzindo focos de criptas aberrantes (FCA) e o desenvolvimento neoplásico. O fruto da palmeira juçara possui consideráveis níveis de compostos antioxidantes, como as antocianinas. Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara sobre os FCA, bem como o desenvolvimento e características histopatológicas de neoplasias colorretais em modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal. Assim, a indução carcinogênica colorretal ocorreu com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em 31 ratos distribuídos em três grupos: Grupo controle positivo (DMH+/Juçara-); Grupo suplementado com polpa do fruto juçara (DMH+/Juçara+); Grupo suplementado com extrato do fruto juçara (DMH+/Juçara Extract). Outros 10 ratos foram mantidos como controle negativo (DMH-/Juçara-). O suco e extrato liofilizado reconstituído da polpa do fruto juçara, na proporção 1:10 equivalente a 0,10708 mg/mL de cianidina-3-glicosídeo, foram disponibilizados três vezes por semana, por gavagem, durante 18 semanas, considerando 1 mg/Kg de cianidina-3-glicosídeo. Na 10ª semana foram avaliados os FCA. Na 23ª semana foram analisadas as lesões macroscópicas acima de 0,1 cm em sua maior porção em mucosa intestinal, por meio da histopatologia. Houve redução significativa no número total de FCA ($p = 0,0151$) e no número de FCA com mais de 3 criptas ($p=0,0049$) no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado ao grupo DMH+/Juçara-. O percentual de redução dos FCA total foi de 50,12% no grupo DMH+/Juçara+, e 23,23% no grupo DMH+/JuçaraExtract. Quanto aos FCA > 3, a redução foi de 64,02% no grupo DMH+/Juçara+ e de 21,34% no grupo DMH+/JuçaraExtract. Lesões benignas predominaram nos grupos induzidos à carcinogênese colorretal e não foram dependentes da suplementação com produto à base da polpa do fruto juçara. Foram observados adenocarcinoma tubular colorretal, esse com o desenvolvimento reduzido com a suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara (principalmente com o extrato liofilizado); e o adenocarcinoma anel em sinete,

com desenvolvimento favorecido pelos produtos oriundos da polpa de juçara. A inflamação no microambiente tumoral sofreu influência da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara, com destaque para a diminuição de inflamação intensa e ganho no abrandamento da inflamação no grupo DMH+/Juçara+. Os produtos à base da polpa do fruto juçara influenciaram a dinâmica da tumorigênese colorretal, promovendo, principalmente, a redução dos focos de criptas aberrantes com o uso do suco da polpa. Além disso, foram capazes de reduzir o aparecimento de adenocarcinoma tubular colorretal e a intensidade da inflamação no microambiente tumoral, porém, favorecendo o surgimento de adenocarcinoma anel em sinete.

Palavras-chave: biocompostos, antioxidantes, carcinogênese experimental, tumorigênese colorretal.

ABSTRACT

Antioxidant substances can protect against the development of colorectal cancer by reducing of the aberrant foci crypts (AFC) and neoplasm development. The fruit of the juçara palm has considerable levels of antioxidant compounds, such as anthocyanins. Thus, the objective was to evaluate the effects of supplementation with products based on juçara fruit pulp on AFC, as well as the development and histopathological characteristics of colorectal neoplasms in an *in vivo* model of colorectal carcinogenesis. Thus, colorectal carcinogenic induction occurred with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in 31 rats distributed in three groups: Positive control group (DMH+/Juçara-); Group supplemented with juçara fruit pulp (DMH+/Juçara+); Group supplemented with juçara fruit extract (DMH+/Juçara Extract). Another 10 rats were maintained as negative control (DMH-/Juçara-). The juice and lyophilized extract reconstituted from the pulp of the juçara fruit, in the proportion 1:10 equivalent to 0.10708 mg/mL of cyanidine-3-glycoside, were made available three times a week by gavage for 18 weeks, considering 1 mg/kg of cyanidine-3-glycoside. In the 10th week, the AFC were evaluated. In the 23rd week, macroscopic lesions above 0.1 cm in their largest intestinal mucosa were analyzed through histopathology. There was a significant reduction in the total number of AFC ($p = 0.0151$) and in the number of AFC with more than 3 crypts ($p = 0.0049$) in the DMH+/Juçara+ group when compared to the DMH+/Juçara- group. The percentage of total AFC reduction was 50.12% in the DMH+/Juçara+ group, and 23.23% in the DMH+/JuçaraExtract group. Regarding AFC > 3, the reduction was 64.02% in the DMH+/Juçara+ group and 21.34% in the DMH+/JuçaraExtract group. Benign lesions predominated in the groups induced by colorectal carcinogenesis and were not dependent on supplementation with a product based on the pulp of the juçara fruit. Colorectal tubular adenocarcinoma was observed, with reduced development with supplementation with products based on the pulp of the juçara fruit (mainly with lyophilized extract); and signet ring cell carcinoma of the colon, with development favored by products derived from juçara pulp. Inflammation in the tumor microenvironment was influenced by supplementation with products based on the pulp of the juçara fruit, with emphasis on the reduction of intense inflammation and gain in the relaxation of inflammation in the DMH+/Juçara+ group. The products based on the pulp of the juçara fruit influenced the dynamics of colorectal tumorigenesis, mainly promoting the reduction of AFC with the use of pulp juice. In addition, they were able to reduce the appearance of colorectal tubular adenocarcinoma and the intensity of inflammation in the tumor microenvironment, however, favoring the appearance of signet ring cell carcinoma of the colon.

Keywords: biocompounds, antioxidants, experimental carcinogenesis, colorectal tumorigenesis.

1 INTRODUÇÃO

A *Euterpe edulis* Martius (açai juçara) é uma palmeira nativa da Mata Atlântica, encontrada nos remanescentes desta floresta desde o Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, e também no Paraguai e na Argentina (SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2008), que produz pequenos frutos com alto valor energético e consideráveis níveis de compostos fenólicos, como as antocianinas, que são importantes devido sua atividade antioxidante (BATAGLION et al., 2014). Estudos mostraram que amostras de açai juçara provenientes de Santa Catarina apresentam quatro vezes mais antocianinas em comparação ao açazeiro amazônico (*Euterpe oleracea* Martius) (Iaderoza et al., 1992; Schultz, 2008).

Além da capacidade antioxidante, as antocianinas podem promover vários benefícios à saúde devido suas ações anti-inflamatória, vasodilatadora e antimicrobiana (FREGONESI et al., 2010; PATRAS et al., 2010; TSUDA, 2012). Segundo Moraes e colaboradores (2019), as antocianinas atuam no tecido tumoral intestinal suprimindo a proliferação de células epiteliais anormais, induzindo a apoptose mediada por mitocôndrias e inibindo a invasão e metástase tumoral. Ainda, a suplementação com polpa do fruto juçara foi capaz de reduzir lesões colorretais pré neoplásicas e aumentar a presença de superóxido dismutase nessas mesmas lesões em modelo experimental de câncer colorretal (REIS et al., 2020). Além disso, pesquisas com extratos de açai amazônico encontraram resultados expressivos na redução da progressão tumoral (FRAGOSO et al., 2013; CHOI et al., 2017).

O processo de tumorigênese colorretal é iniciado por mutações genômicas na mucosa intestinal que culminam com alterações morfológicas nas criptas de Lieberkühn caracterizadas por aberturas terminais anormais, tamanho maior que as criptas adjacentes e espessamento epitelial com células proeminentes, as quais são denominadas focos de criptas aberrantes (FCA) (CHENG & LAI, 2003). Em seguida, ocorre uma sucessão de mutações adicionais com a progressão eventual de um pequeno subconjunto de adenomas convencionais para carcinoma, com estadios intermediários mostrando graus crescentes de displasia, consequentemente evoluindo para carcinoma *in situ* (SNOVER, 2011).

O câncer colorretal é a neoplasia que acomete a porção final do sistema gastrointestinal e em 2020 foi considerado, mundialmente, como o segundo tipo de câncer que mais mata - estimando-se um milhão de mortes - e o terceiro mais diagnosticado, obtendo-se cerca de dois milhões de novos casos notificados (IARC, 2021). No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais prevalente em ambos os sexos, com taxas de incidência e mortalidade de 19,4 e 9, respectivamente. Além disso, ocorrerá, para cada ano do triênio

de 2020-2022, 20.540 casos em homens e 20.470 em mulheres, significando 19,64 novos casos a cada 100.000 homens e 19,03 para cada 100.000 mulheres, e 20.578 óbitos (INCA, 2019; IARC, 2021).

Dada as evidências da atividade sobre o desenvolvimento tumoral em câncer colorretal que possui o fruto da palmeira juçara, rico em compostos fenólicos como a antocianina, bem como a morbimortalidade desse neoplasma e seu impacto sobre a saúde pública, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara sobre os FCA, bem como o desenvolvimento e características histopatológicas de neoplasias colorretais em modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os animais utilizados nesse estudo foram mantidos de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde e Cuidados no uso de Animais de Laboratório (NIH Publications Nº 8023), revisado em 2011 e com a Lei Brasileira de Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008). Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 043/2014.

2.2 POLPA DE AÇAÍ JUÇARA, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Utilizou-se um único lote de polpa de açaí juçara, isenta de corantes artificiais e conservantes, adquirido de um produtor da região Sul do Estado do Espírito Santo (20°48'30"S and 41°00'00"W). As polpas foram armazenadas em freezer -20°C, hermeticamente condicionadas ao abrigo da luz. A extração, quantificação e liofilização de compostos fenólicos presente na polpa utilizou protocolos preconizados pelo Laboratório de Análises Químicas de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo.

A extração e quantificação dos compostos fenólicos e antocianinas ocorreram de acordo com a metodologia adaptada de Francis (1982). Para a extração, 20g de polpa do açaí juçara foram diluídos em 200mL de álcool de cereais 70% e ajustado o pH para 2,5 com ácido cítrico. A solução foi hermeticamente acondicionada ao abrigo da luz e oxigênio atmosférico à 4°C por duas horas, sendo em seguida filtrada, concentrada em

rotoevaporador, liofilizada e armazenada ao abrigo da luz a 4°C até sua utilização.

A quantificação das antocianinas foi realizada por meio do método de pH diferencial em espectrofotômetro utilizando dois tampões diferentes, o Tampão de Cloreto de Potássio 0,025 M (pH 1,0) e o Tampão de Acetato de Sódio 0,4 M (pH 4,5). O extrato de antocianina foi diluído em cada tampão nas proporções 1:10 e 1:25 e as absorvâncias obtidas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 510 nm e 700 nm.

Os resultados de antocianina total foi expresso em miligrama de cianidina-3-glicosídeo por grama de polpa, considerando massa molar de 449,2 g.mol⁻¹ e absorvidade molar de 26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹. A partir do resultado das quantificações, determinou-se 107,08 mg de cianidina-3-glicosídeo por grama de polpa.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento utilizou 41 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos jovens, pesando em média 181±35 gramas no início do experimento, mantidos em grupos de cinco a seis animais por gaiola em sala com temperatura controlada entre 21° e 24°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55% e ciclo luz escuridão de 12 horas. Os animais receberam ração comercial para a espécie e água *ad libitum*.

A indução à carcinogênese colorretal com o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) foi realizada em 31 animais e 10 animais foram mantidos como grupo controle negativo (intestino normal). A indução ocorreu conforme metodologia modificada por Lorangeira e colaboradores (1998) baseada no estudo de Nauss e colaboradores (1984). Neste, o DMH foi dissolvido em NaCl 0,9% contendo como veículo 1,5% de EDTA, em pH final de 6,5 que foi atingido com o uso de solução de NaOH 1N quando necessário. A aplicação do agente químico foi realizada por via subcutânea, semanalmente, durante cinco semanas, na dose final de 240 mg/kg.

Após uma semana da última aplicação de DMH, os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, a saber: Grupo controle negativo (DMH-/Juçara-) = 10 animais; Grupo controle positivo (DMH+/Juçara-) = 11 animais; Grupo suplementado com polpa do fruto juçara (DMH+/Juçara+) = 11 animais; Grupo suplementado com extrato do fruto juçara (DMH+/Juçara Extract) = 9 animais.

Os produtos do fruto juçara (suco da polpa e extrato liofilizado reconstituído) foram imediatamente disponibilizados após a separação dos grupos experimentais, três vezes por semana, por gavagem, até completarem as 23 semanas. O suco e o extrato foram

preparados na proporção 1:10, equivalente a 0,10708 mg/mL de cianidina-3-glicosídeo. Para a suplementação, considerou-se a ingestão de 1 mg/Kg de cianidina-3-glicosídeo.

Na 10^a semana (cinco semanas de indução e cinco de suplementação), dois ratos do grupo DMH+/Juçara Extract e quatro ratos de cada um dos demais grupos foram eutanasiados para contagem dos focos de criptas aberrantes. O intestino grosso e reto foram separados do bloco intestinal e abertos pela inserção do mesentério, seguida da retirada do conteúdo fecal e lavagem em solução PBS para fixação em formalina tamponada 10%. Em seguida, corou-se os intestinos em solução azul de metileno 1%, e análise por dois observadores previamente treinados para identificação dos focos de criptas aberrantes na mucosa intestinal, sob microscopia óptica em aumento de 400X (BIRD, 1987). Após análise, obteve FCA total e a categorização em FCA com menos de três criptas (≤ 3 criptas) e FCA com mais de três criptas (> 3 criptas), de acordo com Henriques (2009), seguido do cálculo do percentual de redução.

Na 23^a semana todos os demais ratos de cada grupo foram eutanasiados para análise das lesões macroscópicas em mucosa intestinal. Nesse momento, o intestino grosso e reto foram retirados do bloco intestinal e abertos pela inserção do mesentério para remoção das lesões acima de 0,1 cm em sua maior porção. As amostras teciduais coletadas foram fixadas em formalina tamponada 10% e submetidos ao processamento rotineiro de inclusão em parafina, e cortes histológicos de 3 μ m de espessura foram dispostos em lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina.

As amostras dos grupos experimentais foram diagnosticadas de acordo com Perse e Cerar (2011). Nas amostras pertencentes aos Grupos DMH+/Juçara-, DMH+/Juçara+ e DMH+/JuçaraExtract foram avaliadas as seguintes características histopatológicas: processo inflamatório (tipo e intensidade), pleomorfismo celular (intensidade), figuras de mitose (ausente, ≤ 3 /campo, > 3 /campo), invasão de submucosa (ausência ou presença), invasão perineural (ausência ou presença), invasão linfática (ausência ou presença), invasão sanguínea (ausência ou presença), desmoplasia (ausência ou presença), debris glandulares (ausência ou presença), necrose (ausência ou presença).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com o estudo foram tabulados e submetidos à análise estatística no programa GraphPad Prism 7.00 (Versão Demo). Para a análise do efeito dos produtos da polpa do fruto juçara sobre os focos de criptas aberrantes considerou-se como padrão para comparação o grupo controle positivo (DMH+/Juçara-), utilizando o Teste *t* para

amostras não pareadas ($p = 0,05$). A análise para os focos agrupados de acordo com a quantidade de criptas foi realizada a partir do Teste t múltiplo ($p = 0,05$), também considerando como padrão de comparação o grupo controle positivo. O percentual médio de redução foi apresentado de forma descritiva.

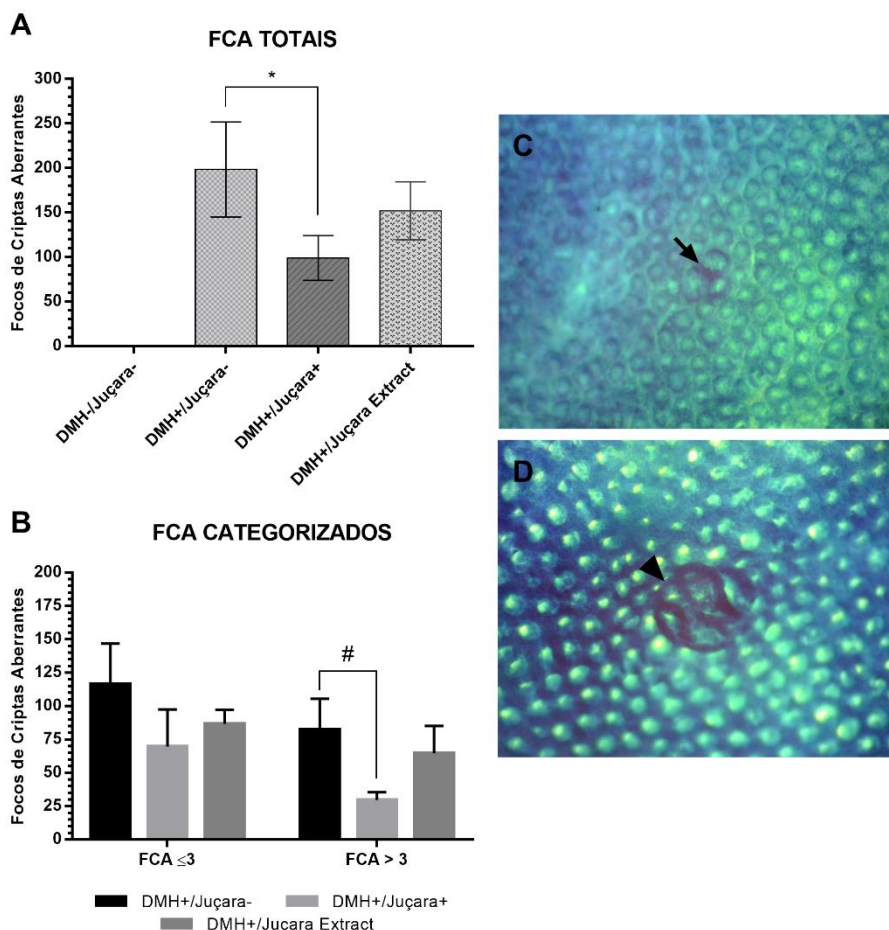
O número de lesões em mucosa colorretal às 23 semanas de experimento foi analisado pelo teste ANOVA para um fator ($p = 0,05$). Os diagnósticos microscópicos e as características microscópicas (para neoplasmas) das lesões foram analisados quanto a dependência do tipo de produto da polpa do fruto juçara utilizando o Teste G com correção de Williams ($p = 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

O grupo controle positivo (DMH+/Juçara-), o grupo suplementado com polpa do fruto juçara (DMH+/Juçara+) e o que recebeu o extrato do fruto juçara (DMH+/Juçara Extract) foram comparados quanto a quantidade de focos criptas aberrantes (FCA). (Figura 1A). Também houve redução significativa no número de focos com mais de 3 criptas no grupo DMH+/Juçara+ em relação ao grupo controle positivo ($p=0,0049$) (Figura 1B).

Figura 1. Número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) em modelo experimental de carcinogênese colorretal suplementados com produtos à base da polpa do fruto juçara. A) FCA total. B) FCA categorizado em menos de três criptas (FCA \leq 3) e mais de três criptas (FCA $>$ 3). C) Fotomicrografia de mucosa colorretal de rato submetido à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidência de focos de FCA \leq 3 (seta). D) Fotomicrografia de mucosa colorretal de rato submetido à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidência de focos de FCA $>$ 3 (cabeça seta). Note a redução no número de FCA total * $p = 0,0151$) e FCA $>$ 3 # $p = 0,0049$ no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado com o grupo controle positivo (DMH+/Juçara-).



Em relação o percentual de redução dos focos de criptas aberrantes, total e categorizados, houve redução de 50,12% dos FCA total no grupo DMH+/Juçara+, e 23,23% no grupo DMH+/JuçaraExtract. Quanto aos FCA $>$ 3, a redução foi expressiva no grupo DMH+/Juçara+ (64,02%), enquanto no grupo DMH+/JuçaraExtract foi de 21,34%. Para os FCA \leq 3, houve redução de 40,09% para o grupo DMH+/Juçara+, e 25,43% para o grupo DMH+/JuçaraExtract (Tabela 1).

Tabela 1 – Média, desvio padrão e percentual médio de redução do número de focos de criptas aberrantes (FCA) em mucosa colorretal de modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal suplementados com produtos à base da polpa do fruto juçara.

FCA	DMH+/Juçara-		DMH+/Juçara+		DMH-/JuçaraExtract	
	Média (±DP)	Redução (%)	Média (±DP)	Redução (%)	Média (±DP)	Redução (%)
Totais	198,5 ±53,42	0	99 ±25,23	50,12	152 ±32,53	23,23
> 3 criptas	82 ±23,48	0	29,5 ±5,97	64,02	64,5 ±20,51	21,34
≤ 3 criptas	116 ±30,42	0	69,5 ±27,89	40,09	86,5 ±10,61	25,43

3.2 LESÕES MACROSCÓPICAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Quanto ao número de lesões macroscópicas em mucosa colorretal, foi observado que o Grupo DMH+/Juçara- apresentou média de 3,64 lesões por animal, com no mínimo duas e no máximo de oito lesões por animal. O Grupo DMH+/Juçara+ apresentou média de 3,36 lesões por animal, sendo no mínimo duas e no máximo seis por animal. No grupo DMH+/JuçaraExtract foram encontradas a média de 3,44 lesões por animal, com no mínimo duas lesões e máximo de nove por animal. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p = 0,2543$).

Lesões benignas predominaram nos grupos induzidos à carcinogênese colorretal, destacando-se a hiperplasia do tecido linfoide associado a mucosa (GALT). As lesões benignas encontradas não foram dependentes da suplementação com produto à base da polpa do fruto juçara (Tabela 2). As lesões malignas encontradas foram o adenocarcinoma tubular colorretal, esse com o desenvolvimento reduzido com a suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara (principalmente com o extrato liofilizado); e o adenocarcinoma anel em sinete, com desenvolvimento favorecido pelos produtos oriundos da polpa de juçara (Tabela 2).

Tabela 2 – Número, tipo e diagnóstico histopatológico de lesões em mucosa colorretal de modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal suplementados com produtos à base da polpa do fruto juçara.

Lesão	DMH+/Juçara-	DMH+/Juçara+	DMH+/Juçara Extract	p-valor
Benignas				
Displasia	3 (7,5%)	4 (10,81%)	2 (6,45%)	0,4349
Hiperplasia GALT	20 (50%)	11 (29,73%)	18 (58,06%)	
Malignas				
Adenocarcinoma Tubular	17 (42,5%)	16 (43,24%)	8 (25,81%)	0,0202
Adenocarcinoma Anel em sinete	0	6 (16,22%)	3 (9,68%)	
TOTAL	40	37	31	0,2543*

* Teste ANOVA para um fator ($p = 0,05$)

Considerando os neoplasmas malignos, as características microscópicas apresentadas em cada grupo experimental induzido à carcinogênese colorretal estão dispostas na Tabela 3. A inflamação no microambiente tumoral sofreu influência da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara, com destaque para a diminuição de inflamação intensa e ganho no abrandamento da inflamação no grupo DMH+/Juçara+. As demais características microscópicas não sofreram influência da suplementação, mesmo com as modulações pontuais nas frequências observadas (Tabela 3).

Tabela 3. Características microscópicas de neoplasmas malignos (adenocarcinoma tubular colorretal e adenocarcinoma anel em sinete) em mucosa colorretal de modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal suplementados com produtos à base da polpa do fruto juçara.

	DMH+/Juçara-	DMH+/Juçara+	DMH+/Juçara Extract	p-valor
Inflamação				
Branda	0 (0%)	5 (22,73%)	1 (9,09%)	0,0484
Moderada	9 (52,94%)	14 (63,64%)	8 (72,73%)	
Intensa	8 (47,06%)	3 (13,63%)	2 (18,18%)	
Pleomorfismo				
Ausente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,0703
Brando	1 (5,88%)	7 (31,82%)	0 (0%)	
Moderado	12 (70,59%)	7 (31,82%)	6 (54,54%)	
Intenso	4 (23,53%)	8 (36,36%)	5 (45,46%)	
Mitose				
Ausente	0 (0%)	2 (9,09%)	0 (0%)	0,4947
< 3 campos	17 (100%)	20 (90,91%)	11 (100%)	
> 3 campos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Invasão Submucosa				
Ausente	3 (17,65%)	3 (13,64%)	3 (27,27%)	0,6294
Presente	14 (82,35%)	19 (86,36%)	8 (72,73%)	
Invasão Perineural				
Ausente	14 (82,35%)	15 (68,18%)	11 (100%)	0,0551
Presente	3 (17,65%)	7 (31,82%)	0 (10%)	
Invasão Linfática				
Ausente	17 (100%)	21 (95,46%)	11 (100%)	0,6175
Presente	0 (0%)	1 (4,54%)	0 (0%)	
Invasão Sanguínea				
Ausente	17 (100%)	22 (100%)	11 (100%)	1,00
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Desmoplasia				
Ausente	9 (52,94%)	13 (59,09%)	6 (54,54%)	0,9265
Presente	8 (47,06%)	9 (40,91%)	5 (45,46%)	
Debris Glandular				
Ausente	2 (11,76%)	4 (18,18%)	0 (0%)	0,2093
Presente	15 (88,24%)	18 (81,82%)	11 (100%)	
Necrose				
Ausente	16 (94,12%)	15 (68,18%)	9 (81,82%)	0,1248
Presente	1 (5,88%)	7 (31,82%)	2 (18,18%)	
Percentual Glandular				
>95%	6 (35,29%)	10 (45,45%)	5 (45,46%)	0,0944
50-95%	9 (52,94%)	3 (13,64%)	3 (27,27%)	

	<50%	2 (11,77%)	9 (40,91%)	3 (27,27%)	
Grau de Diferenciação					
Pouco diferenciado		2 (11,77%)	9 (40,91%)	3 (27,27%)	0,0944
Moderadamente diferenciado		9 (52,94%)	3 (13,64%)	3 (27,27%)	
Bem diferenciado		6 (35,29%)	10 (45,45%)	5 (45,46%)	
TOTAL		17	22	11	

4 DISCUSSÃO

Esse estudo verificou a influência que os produtos à base da polpa do fruto juçara (*Euterpe edulis* Martius) possuem sobre a carcinogênese colorretal induzida em modelo animal, verificando a redução do número de focos de criptas aberrantes (total e categorizados), e também seu impacto no desenvolvimento de lesões macroscópicas em mucosa colorretal.

As criptas aberrantes são consideradas lesões iniciais no colón intestinal com indicativo de risco para a carcinogênese (OGATA et al., 2010; YANG et al., 2016). Em modelos experimentais de carcinogênese colorretal, os focos de criptas aberrantes (FCA) são as primeiras alterações detectáveis na mucosa colorretal (BIRD, 1987; ALRAWI et al., 2006; KHARE et al., 2006), e devido a similaridade genética entre os mecanismos de desenvolvimento de FCA de roedores e humanos, estas lesões podem ser utilizadas nos estudos de prevenção, rastreamento e detecção de fatores de risco e de proteção associados progressão ou recorrência do câncer colorretal (CORPET & PIERRE, 2005; FEMIA & CADERNI, 2008). Dessa forma, a utilização do modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal desse estudo permitiu a avaliação dos FCA sob a influência da suplementação do suco e do extrato liofilizado reconstituído da polpa do fruto juçara.

Verificou-se que, tanto o FCA total e o FCA > 3 criptas, tiveram seus números reduzidos na presença de suco da polpa do fruto juçara, com seis semanas de suplementação, perfazendo percentuais de redução de 50,12% e 64,02%, respectivamente. Semelhante ao encontrado, a suplementação com açaí amazônico (*Euterpe oleracea* Martius) atenuou em 41% a formação de FCA após indução com 1,2-dimetilhidrazina (FRAGOSO et al., 2013). Também com açaí amazônico, administrado na forma de pó na alimentação durante 14 semanas, houve redução de FCA em camundongos induzidos à carcinogênese colorretal (ROMUALDO et al., 2015). O suco do fruto juçara na concentração 0,3% administrados *ad libitum*, a cada dois dias, durante 14 semanas em modelo experimental de carcinogênese reduziu em 25% o número de FCA (REIS et al., 2020). Assim, é notória a influência dos produtos à base do fruto das palmeiras do gênero *Euterpe* spp. no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na mucosa colorretal. Ainda, esse resultado é compatível com a ideia da presença dos

biocompostos protetores ou bioativos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais encontrados nesse tipo de fruto que atuam em sinergismo para promover a fitoproteção (SCHULZ et al., 2015). Segundo estudo, estes compostos têm a capacidade de capturar as espécies reativas do oxigênio, promovendo o aumento da capacidade de absorção de radicais livres, com a consequente redução das células proliferativas pela modulação de vias de transdução de sinal, apoptose e angiogênese (NEMA et al., 2012).

Esse estudo evidenciou que a utilização da polpa integral na forma de suco promoveu melhores resultados de redução de FCA, e acredita-se que tenha relação com as substâncias que compõem a polpa. A polpa do fruto juçara possui alta capacidade antioxidante, sendo muito efetiva para radicais peróxido e superóxido (SCHULZ et al., 2015), isso por que é rica em vitamina C, β -caroteno, polifenóis, flavonoides (CARDOSO et al., 2015) e compostos fenólicos, principalmente antocianinas (INADA et al., 2015). O fruto da palmeira juçara ainda possui minerais como fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio e ferro (NOVELLO et al., 2015), e micronutrientes, como as saponinas (NOVELLO et al., 2015), catequinas, epicatequinas e quercetina, ácido ferúlico, gálico, hidroxibenzoico e cumárico (BORGES et al., 2011). Embasando ainda a hipótese da sinergia entre os compostos da polpa, não houve diferença significativa entre o grupo suplementado com extrato liofilizado (predominante de compostos fenólicos) e o grupo controle positivo.

Quanto às lesões macroscópicas na mucosa colorretal, o protocolo utilizando 1,2-dimetilhidrazina (DMH) induziu alterações passíveis de diagnóstico por meio da histopatologia. O número de lesões encontradas neste estudo não diferiram significativamente, porém, foi variável, mantendo número máximo de nove e mínimo de duas lesões. Larangeira e colaboradores (1998) também encontraram nove lesões, no máximo, em mucosa colorretal utilizando o DMH como indutor da carcinogênese colorretal. Este resultado viabiliza o modelo experimental para o estudo da suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara, no que diz respeito à patogênese, morfologia e alterações biomoleculares, assim como estudos de sobrevivência e prognóstico, bem como estratégias de tratamento.

As lesões benignas encontradas foram a displasia e a hiperplasia do GALT, e não sofreram influência da suplementação com os produtos à base do fruto juçara. Um estudo da associação de uma simples dose de 1,2-dimetilhidrazina como pró-carcinógeno seguido de colite ulcerativa crônica, encontrou alta incidência de displasia e câncer colorretal (WANG et al., 2004). Quanto a hiperplasia do GALT, acredita-se que seja uma

condição natural de resposta do sistema imunológico frente às alterações neoplásicas que ocorreram na mucosa colorretal.

Nossos achados estão de acordo com um estudo que verificou aumento no número de placa de Peyer em ratos suplementados com quinoa, grão rico em flavonoides e ácidos fenólicos. Os autores atribuíram a presença das placas de Peyer a uma possível ação protetora das mucosas (BERNUY-OSORIO et al., 2018).

A suplementação com produtos à base da polpa do fruto juçara alterou a dinâmica de desenvolvimento das lesões neoplásicas (Tabela 2). Pesquisa realizada com pacientes acometidos pelo câncer colorretal tem mostrado que o consumo de frutas ricas em compostos fenólicos pode reduzir a incidência de câncer colorretal (AFRIN et al., 2016). No entanto, os resultados aqui obtidos sugerem que em paciente com alto risco (portadores de polipose adenomatosa ou que apresentem pequenos pólipos com FCA e doenças inflamatórias intestinais), o consumo de juçara pode alterar o tipo neoplásico a ser desenvolvido. Por outro lado, em modelo experimental de câncer colorretal suplementados com frutos do açaí amazônico, houve redução da tumorigênese, bem como diminuição e estabilização do crescimento de células neoplásicas, e atribuíram esses resultados à ação direta de suplementação com compostos fenólicos presentes no açaí (CHOI et al., 2017). Observou-se essa dinâmica nesse estudo para o adenocarcinoma tubular colorretal na presença de produtos à base da polpa do fruto juçara.

O modelo *in vivo* de carcinogênese colorretal e suplementado com produtos do fruto juçara utilizados nesse estudo permitiu encontrar lesões com características histopatológicas semelhantes às aquelas encontradas em neoplasias colorretais em humanos. Sobre essas características, a inflamação no microambiente tumoral foi dependente da suplementação com produtos do fruto juçara. Diversos estudos vêm relatando o efeito da suplementação com compostos fenólicos na redução da inflamação em cultura de células e modelos animais de carcinogênese colorretal quando comparados aos grupos que não receberam a suplementação (LEE et al., 2010; PAUL et al., 2010; MURTHY et al., 2012; DIAS et al., 2014). A inflamação é importante para o desenvolvimento de câncer colorretal, pois, doenças inflamatórias como a colite ulcerativa e a doença inflamatória do intestino estão associadas ao maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal (EKBOM et al., 1990; ULLMAN & ITZKOWITZ, 2011).

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o juçara atua predominantemente sobre focos de criptas aberrantes e na discreta redução de adenocarcinoma tubular colorretal. Desta forma, mostram a importância do investimento em estudos com

substâncias naturais no desenvolvimento tumoral, especialmente nas fases iniciais da tumorigênese e abre perspectivas para o desenvolvimento de bioprodutos e bioprocessos que atuam na prevenção, e para a utilização do fruto juçara e seus produtos como coadjuvantes em processos que visem a modulação do desenvolvimento do câncer colorretal, bem como na melhoria na qualidade de vida dos indivíduos.

5 CONCLUSÃO

Os produtos à base da polpa do fruto juçara influenciaram a dinâmica da tumorigênese colorretal, promovendo, principalmente, a redução dos focos de criptas aberrantes com o uso do suco da polpa. Além disso, foram capazes de reduzir o aparecimento de adenocarcinoma tubular colorretal e a intensidade da inflamação no microambiente tumoral, porém, favorecendo o surgimento de adenocarcinoma anel em sinete.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) - Edital FAPES Universal nº 03/2017 [Termo de outorga 80707750/18].

REFERÊNCIAS

- AFRIN, S. et al. (2016). Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*, v. 21, n. 2, p. 169.
- ALRAWI, S. J. et al. (2006). Aberrant Crypt Foci. *Anticancer Research*, v. 120, p. 107–119.
- BATAGLION, G. A. et al. (2014). Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. *Food Research International*, v. 64, p. 472–481.
- BERNUY-OSORIO, N. D. et al. (2018). Influence of the consumption of quinoa on the biochemical parameters and intestinal histomorphometry in obese rats. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, v. 35, n. 2, p. 228–233.
- BIRD, R. P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters*, v. 37, p. 147 - 151.
- BORGES, G. D. S. C. et al. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v. 44, p. 2128-2133.
- CARDOSO, A. L. et al. (2015). Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 152–162.
- CHENG, L. & LAI, M. (2003). Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 9, n. 12, p. 2642-2649.
- CHOI, Y. J. et al. (2017). Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut and Liver*, v. 11, n. 2, p. 243-252.
- CORPET, D. E. & PIERRE, F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 1911–1922.
- DIAS, M. M. D. S. et al. (2014). Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, v. 66, p.1394–1405.
- EKBOM, A. et al. (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *New England Journal Medicine*, v. 323, p. 1228-1233.
- FEMIA, A. P. & CADERNI, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*, v. 74, n. 13, p. 1602–1607.
- FRAGOSO, M. F. et al. (2013). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 58, p. 68–76.
- FRANCIS, F. G. (1982). Analysis of Anthocyanins. Anthocyanins as Food colors. New

York: Academic Press, p. 182-208.

FREGONESI, B. M. et al. (2010). Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, n. 3, p. 387-395.

HENRIQUES, V. T. et al. (2009). Omega-3 fatty acids reduce the development of preneoplastic lesions. *Revista de Nutrição*. v. 22, p. 237-244.

IADEROZA, M. et al. (1992). Anthocyanins from fruits of açaí (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis*, Mart). *Tropical Science*, v. 32. p. 41-46.

INADA, K. O. P. et al. (2015) Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 422-433.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. (2019). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 117 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (2021). CANCER TODAY. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

KHARE, S. et al. (2006). Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. *Cancer Epidemiology*, v. 472, p. 373-386.

LARANGEIRA, L. L. S. et al. (1998). Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 13, n. 3, p. 177-182. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-86501998000300008>>. Acesso em 20 Ago 2020.

LEE, M. S.; LEE, Y. K.; PARK, O. J. (2010). Cherry silver berry (*Elaeagnus multiflora*) extracts exert antiinflammatory effects by inhibiting COX-2 and Akt signals in HT-29 colon cancer cells. *Food Science and Biotechnology*, v. 19, p. 1673–1677.

LIMA, L. S. H.; FRANCO, E. T. H.; SCHUMACHER, M. V. (2008). Crescimento de mudas de *Euterpe edulis* Martius em resposta a diferentes doses de fósforo. *Ciência Florestal*, v.18, n.4, p. 461-70.

MORAES, L. F. S. et al. (2019). Anthocyanins/Anthocyanidins and colorectal cancer: what is behind the scenes? *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. v. 59, p. 59-71.

MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. (2012). The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 688, p. 14–21.

NAUSS, K. M. et al. (1984). Morphology and distribution of 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-associated lymphoid tissue in the rat. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 73, n. 4, p. 915-924.

NEMA, R. et al. (2012). Flavonoid and cancer prevention – Mini review. *Research in Pharmacy*, v. 2, n. 2, p. 46-50.

NOVELLO, A. A. et al. (2015). Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 54, p. 101–112.

OGATA, D. C. et al. (2010). Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: Análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da β -catenina e ki-67. *Revista Do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*, v. 37, n. 2, p. 114–120.

PATRAS, A. et al. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 3-11.

PAUL, S. et al. (2010). Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the β -catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, v. 31, p. 1272–1278.

PERŠE, M. & CERAR, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 473964.

REIS, S. O. et al. (2020). Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation Reduces Aberrant Crypt Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of Carcinogenesis-Induced Rats. *Nutrition and cancer*, v. 72, n. 4, p. 610–619.

ROMUALDO, G. R. et al. (2015). Protective effects of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. *Food Research International*, v. 77, p. 432–440.

SCHULTZ, J. (2008). Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia), Universidade Federal Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis.

SCHULZ, M. et al. (2015). Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International*. v. 77, p. 125-131.

SILVA, M. G. C. P. C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. (2004). Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açai. Ilhéus: Centro de Pesquisa do Cacau, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes-outras-cadeias/comparacao-nutricional-da-polpa-de-jucara-e-acai#:~:text=Em%20trabalho%20realizado%20por%20pesquisadores,%2F%20100%20g%20%2F%20frutos%20frescos.>> Acesso em: 02 jul. 2022.

SNOVER, D. C. (2011). Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology*, v. 42, p. 1–10.

TSUDA, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 56, n. 1, p. 159- 170.

ULLMAN, T. A. & ITZKOWITZ, S. H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, v. 140, p. 1807-1816.

WANG, J. G. et al. (2004). A novel mouse model for colitis associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World*

Journal of Gastroenterology, v. 10, p. 2958.

YANG, K. et al. (2016). Risk factors for colorectal cancer in man induce aberrant crypt foci in rats: Preliminary findings. *Nutrition and Cancer*, v. 68, p. 94-104