



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CINTHIA VIDAL MONTEIRO DA SILVA COUTO

**EFEITO DO AÇAÍ JUÇARA NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL:  
ANÁLISE NO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES,  
LESÕES E DA EXPRESSÃO DE SOD1, GPx E OGG1 EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE COLORRETAL**

VITÓRIA

2019

CINTHIA VIDAL MONTEIRO DA SILVA COUTO

**EFEITO DO AÇAÍ JUÇARA NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL:  
ANÁLISE NO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES,  
LESÕES E DA EXPRESSÃO DE SOD1, GPx E OGG1 EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

VITÓRIA

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C871e COUTO, CINTHIA VIDAL MONTEIRO DA SILVA, 1988-  
EFEITO DO AÇAÍ JUÇARA NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL: ANÁLISE NO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES, LESÕES E DA EXPRESSÃO DE SOD1, GPx E OGG1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE COLORRETAL / CINTHIA VIDAL MONTEIRO DA SILVA COUTO. - 2019.

116 f. : il.

Orientadora: ADRIANA MADEIRA ÁLVARES DA SILVA.

Coorientador: LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Reto - Câncer. 3. Imunohistoquímica. I. DA SILVA, ADRIANA MADEIRA ÁLVARES. II. TRIVILIN, LEONARDO OLIVEIRA. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

CINTHIA VIDAL MONTEIRO DA SILVA COUTO

**EFEITO DO AÇAÍ JUÇARA NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL:  
ANÁLISE NO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES,  
LESÕES E DA EXPRESSÃO DE SOD1, GPx E OGG1 EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Madeira Álvares da Silva  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera  
Membro Interno

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa  
Membro Externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Aparecida da Silva  
Membro Externo

---

Prof. Dr. Marcelo dos Santos  
Membro Externo



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DA CANDIDATA AO GRAU DE DOUTORA PELO PPGBIOTEC/RENORBIO.**

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "EFEITO DO AÇAÍ JUÇARA NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL: ANÁLISE NO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES, LESÕES E DA EXPRESSÃO DE SOD1, GPx E OGG1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE COLORRETAL" elaborada por **Cynthia Vidal Monteiro da Silva Couto**, candidata ao Grau de Doutora em Biotecnologia, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 09 de setembro de 2019, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada

Reprovada

*[Assinatura]*

-----

*[Assinatura]*

-----

*[Assinatura]*

-----

*[Assinatura]*

-----

*[Assinatura]*

-----

-----

-----



*Dedicatória:*

*Aos amores da minha vida,  
meu marido Rodolfo Couto e nossa Sarah*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que em sua infinita misericórdia me capacitou, colocou anjos em meu caminho e me permitiu realizar mais esse sonho. É para Sua Honra e Glória mais essa conquista em minha vida!

À minha doce Mãezinha Maria por sempre ser o espelho daquela pessoa que almejo ser, por me fortalecer e amparar nos momentos de dificuldades. À Ti querida Mãezinha, todo meu amor e minha gratidão.

À Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do RENORBIO e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela oportunidade de capacitação nessa importante área da ciência, por me permitir cursar o doutorado em uma instituição respeitada e ainda pelos auxílios financeiros.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo pela concessão dos animais, maravalha e ração utilizados nesse experimento.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Alegre - FAFIA pela concessão do Biotério para manutenção dos animais.

À querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Madeira, por todos esses 8 anos de amizade e caminhada juntas. Espero que nossa parceria possa durar muitos e muitos anos! Todo meu amadurecimento profissional é dedicado a você pois foi seu carinho e docilidade que me estimularam a alçar vôos inimagináveis. Obrigada por acreditar naquela menina insegura e inexperiente e me estimular a cada dia a crescer mais como pesquisadora. Por seu exemplo de mulher forte, professora divertida e dinâmica, e por sempre acreditar que eu era capaz de superar todas as minhas limitações.

Ao querido amigo, co-orientador, boymagia, parceiro de bancada e amansador de tempestades, Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin, por toda dedicação e doação neste projeto. Obrigada por acreditar no meu potencial e confiar a mim uma responsabilidade que nem eu mesma sabia que poderia dar conta. Obrigada por entender todas as limitações e os desafios que ocorreram nestes anos de projeto. Obrigada pela dedicação incondicional para que eu pudesse viver esse momento e por esta parceria que pretendo levar para a vida toda! Obrigada pelas inúmeras horas de bancada, loucuras na estatística e por toda a paciência com minha inexperiência e insegurança. Obrigada por acreditar e confiar este projeto em minhas mãos e por toda a força nos momentos de desespero em que eu mesma não acreditava que seria possível. Por me ensinar a amar a pesquisa e me doar aos nossos animais. Pela pessoa sensível, professor incrível e orientador fora de sério que você é. Quando crescer, quero ser como você! Sem você não teria projeto, defesa e nem essa conquista do tão sonhado título de Doutora em Biotecnologia. Esse título também é seu. Minha eterna gratidão!

À banca examinadora pelos ensinamentos agregados e a disposição em melhorar este estudo.

À querida colega de bancada Juliana Dalbó, que nesta jornada tornou-se uma grande amiga. Obrigada pelas loucuras na aplicação do DMH, pelas longas horas de bancadas, pelas paranóias na hora do DNA e RNA, por todo o trabalho no Hovet. Sem você Juju nada disso seria possível, pois sua dedicação e amor a este projeto foram essenciais para nosso sucesso. E sem sua ajuda e apoio acredito que não teria sido capaz de chegar até aqui.

Ao Leandro, guerreiro de bancada, que se doou comigo para que as imunos dessem certo no desespero do prazo apertado. Meu muito obrigada pela sua disponibilidade sempre.



Aos alunos e estagiários Giselly, Filipe, Isabelly, Brunella e Liliane, sem as longas semanas de dedicação ao biotério e laboratório não seria possível realizar este projeto e não teríamos os excelentes resultados desta pesquisa. Minha eterna gratidão!

Aos amigos de bancada, Joaquim Gasparini, Gabriela Tonini, Aline Borçoi, Mayara Mota, Lucas Maia, Suzanny Mendes e Juliana Kruger, por todo aprendizado, companheirismo, risadas e longas horas de laboratório. Sem a companhia de vocês essa jornada seria muito mais árdua, sem graça e eu não conseguiria chegar até aqui.

Às amigas Tamires Luz e Schalana dos Reis por terem iniciado esse projeto e idealizado o piloto da nossa pesquisa. Sua colaboração foi essencial para obtermos esses resultados.

Aos meus pais Aldanir e Edna, por toda dedicação, abdicção e amor dados a mim durante toda a minha vida. Por todos os valores que me passaram, pela atenção dedicada, por acreditarem em mim e por não medirem esforços para que eu possa alcançar meus objetivos, por torcerem pelo meu sucesso e principalmente por todo o amor que me tem dado durante toda a vida. Este título de Doutora em Biotecnologia é fruto do suor e de cada abdicção que vocês fizeram durante minha vida para me dar o melhor que pudessem. Vocês são meus exemplos e meus grandes amores!

Aos meus irmãos Leonardo e Fabiana, pelo apoio incondicional, pelos momentos passados juntos e por torcerem por mim durante toda minha vida. Às minhas lindas sobrinhas Isabela e Laura, por deixarem meu mundo muito mais feliz. Amo vocês!

Ao meu amigo, confidenteiro, companheiro e marido, Rodolfo Couto, por todas as noites em claro, por todas as trocas de maravalha, pesagem dos animais, participação nas eutanásias, ajuda no preparo e análise das lâminas. E por segurar

todo o resto para que eu pudesse me dedicar a esta pesquisa. Este título é tão seu quanto meu! Meu anjo, quero que saiba que nada disso seria possível sem você ao meu lado. Obrigada por ser meu apoio e suporte nos momentos de desespero e insegurança, por todos os sacrifícios que fez para que eu pudesse chegar até aqui e por todo o carinho dedicado a mim nestes 12 anos juntos. Obrigada, meu amor, por acreditar que eu era capaz de muito mais do que eu acreditava e por enxergar em mim uma força que nem eu sabia que tinha. Obrigada também pelas risadas, incentivo, pelos ensinamentos que me fizeram crescer tanto, obrigada ainda pelos momentos de insana alegria e por me dar o maior presente que eu poderia ganhar, nossa linda e amada Sarah. Só nós dois sabemos o quanto foi difícil chegar até aqui! Te amo incondicionalmente. NEOQEAV!

Aos meus queridos sogros, Adair e Fátima, por me acolherem tão bem em sua família, pelo carinho e incentivo. Vocês hoje são como pais para mim.

Àqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

*Epigrafe*

*"A perfeição não consiste na multiplicidade das coisas feitas, mas no fato de serem bem feitas".*

*São Vicente de Paulo*

## RESUMO

O Açaí Juçara (*Euterpe edulis* Martius) é uma palmeira nativa da Mata Atlântica que pertence à família Arecaceae. Ela produz pequenos frutos que possuem alto valor energético e consideráveis níveis de compostos antioxidantes, como as antocianinas. O Câncer Colorretal é uma doença de “estilo de vida”, desta forma, uma dieta rica em antioxidantes auxilia na sua prevenção ativando vias de citoproteção e a resposta celular antioxidante por meio da indução da transcrição de diversos genes. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito da suplementação do Juçara, na forma de suco e extrato liofilizado, no processo de desenvolvimento tumoral por meio da contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) e análise da expressão dos genes SOD1, GPx e OGG1, das vias de estresse oxidativo e reparo do DNA, em ratos induzidos à carcinogênese colorretal. Para tanto, foram utilizados 38 ratos Wistar, 10 com intestino saudável como controle negativo DMH-/Juçara- e os 28 na qual foram induzidos à tumorigênese colorretal com 1,2dimetilhidrazina (DMH) e divididos em 3 grupos, Grupo induzido a carcinogênese (DMH+/Juçara-), contendo 12 animais, Grupo suplementado com o suco do Juçara (DMH+/Juçara+), com 10 animais, Grupo suplementado com o extrato do Juçara (DMH+/Extract), contendo 6 animais. A suplementação com suco e extrato liofilizado ocorreu três vezes por semana por gavagem, até completarem as 23 semanas. Na 10<sup>a</sup> semana, quatro animais do grupo DMH-/Juçara-, DMH+/Juçara- e DMH+/Juçara+ e dois animais do grupo DMH+/Extract foram eutanasiados para análise das lesões pré-neoplásicas. E, na 23<sup>a</sup> semana o demais animais de todos os grupos foram eutanasiados para a retirada das lesões maiores que 0,1 centímetros, que foram fixadas, processadas histologicamente e coradas com hematoxilina-eosina para diagnóstico. As lesões classificadas como Adenocarcinoma Tubular foram submetidas à Imunohistoquímica para as proteínas SOD1, GPx e OGG1. O grupo DMH+/Juçara+ apresentou redução significativa ( $p=0,0054$ ) no número total de FCA na mucosa colorretal de ratos induzidos à carcinogênese, quando comparado ao grupo DMH+/Juçara-. Da mesma forma, análise considerando focos iguais ou inferiores a 3 criptas ( $p=0,0381$ ) e superiores a 3 criptas ( $p=0,0024$ ) também apresentaram redução no número de FCA do grupo DMH+/Juçara+ quando comparado ao grupo DMH+/Juçara-. Quanto à análise da expressão das enzimas de estresse oxidativo, o grupo DMH+/Extract apresentou menor expressão de SOD1 comparado ao grupo DMH+/Juçara- no infiltrado inflamatório intratumoral ( $p = 0,012$ ) e nas células tumorais ( $p=0,022$ ). Além disso, o grupo DMH+/Juçara+ apresentou uma expressão de GPx significativamente maior ( $p<0,019$ ) do que o mostrado no grupo DMH+/Juçara- nas células do infiltrado inflamatório intratumoral. Por outro lado, não houve diferença significativa entre a expressão de OGG1, tanto no infiltrado inflamatório intratumoral quanto nas células tumorais ( $p=0,102$ ). Observou-se neste experimento que o açaí Juçara pode ser um aliado na prevenção nos estágios iniciais do câncer colorretal, visto a redução do número de FCA no epitélio do cólon e ainda que as espécies reativas de oxigênio geradas após a administração de DMH foram efetivamente eliminadas pelo tratamento com suplementação de Juçara, aliviando o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Câncer colorretal, estresse oxidativo, imunomarcadores, biomarcadores, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

The Acai Juçara (*Euterpe edulis Martius*) is a native palm tree from the Atlantic Forest, which belongs to the Arecaceae family. It produces small fruits that have high energy value and considerable levels of antioxidant compounds, such as anthocyanins. Colorectal cancer is a “lifestyle” disease, so an antioxidant-rich diet helps prevent it by activating cytoprotection pathways and the antioxidant cell response by inducing transcription of various genes. Thus, the objective of this project was to evaluate the effect of Juçara supplementation, in the form of lyophilized juice and extract, on the tumor development process by counting aberrant crypt foci (FCA) and analyzing the expression of SOD1, GPx and OGG1, oxidative stress pathways and DNA repair in rats induced by colorectal carcinogenesis. For this, 38 Wistar rats were used, 10 with healthy bowel as negative control DMH-/Juçara- and the remaining 28 were induced by 1,2dimethylhydrazine (DMH) colorectal tumorigenesis and divided into 3 groups: carcinogenesis-induced group (DMH+/Juçara-), containing 12 animals, group supplemented with Juçara juice (DMH+/Juçara+), with 10 animals, group supplemented with Juçara extract (DMH+/Extract), containing 6 animals. Supplementation with juice and lyophilized extract occurred three times a week by gavage until the 23 weeks. At week 10, four animals from the DMH-/Juçara-, DMH+/Juçara- and DMH+/Juçara+ groups and two animals from the DMH+/Extract group were euthanized for analysis of pre-neoplastic lesions. And at week 23 the remaining animals from all groups were euthanized for removal of lesions larger than 0.1 cm, which were fixed, histologically processed and stained with Hematoxylin-eosin for diagnosis. Lesions classified as tubular adenocarcinoma were submitted to immunohistochemistry for proteins SOD1, GPx and OGG1. The DMH+/Juçara+ group showed a significant reduction ( $p=0.0054$ ) in the total number of ACF in the colorectal mucosa of rats induced by carcinogenesis, when compared to the DMH+/Juçara- group. Similarly, analysis considering foci equal to or less than 3 crypts ( $p=0.0381$ ) and greater than 3 crypts ( $p=0.0024$ ) also showed a reduction in the number of ACF from the DMH+/Juçara+ group when compared to the DMH+/Juçara- group. Regarding the analysis of the expression of oxidative stress enzymes, the DMH+/Extract group showed lower SOD1 expression compared to the DMH+/Juçara group in the intratumoral inflammatory infiltrate ( $p=0.012$ ) and in the tumor cells ( $p=0.022$ ). In addition, the DMH+/Juçara+ group showed significantly higher GPx expression ( $p<0.019$ ) than that shown in the DMH+/Juçara group in the cells of the intratumoral inflammatory infiltrate. On the other hand, there was no significant difference between the expression of OGG1 in both intratumoral inflammatory infiltrate and tumor cells ( $p=0.102$ ). It was observed in this experiment that acai Juçara may be an ally in the prevention of the early stages of colorectal cancer, given the reduction in the number of ACF in the colon epithelium and that reactive oxygen species generated after DMH administration were effectively eliminated. by treatment with Juçara supplementation, relieving oxidative stress.

**Keywords:** Colorectal cancer, oxidative stress, Immunomarkers, biomarkers, immunohistochemistry

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de Instabilidade Cromossômica de modelo genético de carcinogênese colorretal em várias etapas. O passo inicial ocorre pela inativação do Gene APC. A progressão do Adenoma Inicial ao Adenoma tardio requer mutações que ativem o oncogenes KRAS que levam ao aumento da expansão celular clonal. Mutações nos genes TP53 e a perda da heterozigosidade do braço longo do cromossomo 18 (LOH 18q) conferem vantagens adicionais de crescimento das células tumorais invasivas. Mutações no gene PI3KCA ocorrem em pequenas proporções na sequência adenoma-carcinoma. Adaptado de Mundade et al. (2014).....24

Figura 2. Via de Instabilidade de Microssatélite (MSI) envolvida no processo de desenvolvimento do CCR. A via MSI é conduzida por mutações no gene APC e, é determinada pelo silenciamento de genes de reparo (MMR). Esta falha no sistema de reparo celular gera mutações em genes relacionados a proliferação e diferenciação celular, como o TGF $\beta$ RII e, proteínas envolvidas na regulação da apoptose, como BAX e outros. A mutação nestes genes leva a progressão de adenomas para câncer invasivo. Adaptado de Mundade et al. (2014).....26

Figura 3. Via dos Pólipos Serrilhados. Esta via é desencadeada por mutações no gene BRAF que geram aumento da sinalização da via MAPKs / ERK, levando a mutações e metilações em outros genes tais como TP53, p16, entre outros que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de câncer colorretal. Adaptado de Mundade et al. (2014).....27

Figura 4. Estrutura química básica das antocianinas. Ligações de diferentes açúcares no anel C nas posições R3 e R5, além de diferenças do estado de agregação, pH local e complexação por moléculas orgânicas são os fatores que permitem a variedade cores encontradas em vegetais ricos em antocianinas. Adaptado de Quina et al. (2009).....35

Figura 5. Via de Reparo por Excisão de Bases (BER). Esquema simplificado da via curta de excisão de bases mostrando os passos chave e principais proteínas envolvidas no reparo da lesão oxidativa 8-oxoG, que se inicia pela OGG1, uma DNA glicosilase, que libera a base danificada para a formação de um sítio AP. Em seguida, APE1 hidrolisa a ligação fosfosdiéster 5' no sítio abásico para gerar formar uma lacuna. Assim, há a inserção do primeiro nucleotídeo pela DNA polimerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) que recrutam DNA ligase III (Lig III), PARP-1 e XRCC1 para promover a ligação da fita de DNA reparada. Adaptado de Patrono et al. (2014).....40

Figura 6. Geração de ROS na mitocôndria e o Sistema de Defesa Antioxidante. Como resultado da fase final do processo de respiração celular libera-se oxigênio pela Cadeia de Transporte de Elétrons. Este O<sub>2</sub> livre, naturalmente ou através da presença de estresse oxidativo, é convertido no radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que será convertido pela SOD em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por ser um radical livre, neste momento o sistema de defesa antioxidante irá transformar esta molécula em H<sub>2</sub>O através de dois mecanismos dependentes de NADPH. Pelo sistema GPx, a conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O ocorre através da oxidação de GSH em GSSG pela GPx, processo esse dependente da enzima GR que utilizar o NADPH como doador de elétrons Adaptado de Ribas et al. (2014).....42

## **CAPÍTULO I - Açaí Juçara (*Euterpes edulis* Martius) inibe a formação de Focos de Criptas Aberrantes em modelo animal de carcinogênese colorretal**

**Figura 1.** Número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) em modelo experimental de carcinogênese colorretal. **A)** O número médio de FCA encontrado na mucosa colorretal de ratos suplementados com Juçara (DMH+/Juçara+) foi significativamente menor que em ratos não suplementados (DMH+/ Juçara-) ( $p=0,0054$ ). **B)** Comparação do número de FCA com menos de três criptas ( $FCA \leq 3$ ) e mais de três criptas ( $FCA > 3$ ). Note a redução no número de  $FCA > 3$  ( $p=0,0024$ )\*\* e  $FCA \leq 3$  ( $p=0,0381$ )\*\*\* no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado com o grupo controle positivo (DMH+/Juçara-). **C)** Fotomicrografia de mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidenciação de focos de criptas aberrantes.....58

## **CAPÍTULO II - Juçara supplementation (*Euterpes edulis* Martius) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats**

Figura 1. Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on SOD1 expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline, Juçara fruit or Juçara Extract three times a week during 18 weeks. A) Immunohistochemistry of tumor cells. B) Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. Immunohistochemistry were performed and SOD1 expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$  compared to the DMH+/Juçara- group. C) Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.....90

Figura 2: Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on GPX expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline or Juçara fruit three times a week during 18 weeks. A) Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells were performed and GPX expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$  compared to the DMH+/Juçara- group. B) Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.....91

Figura 3: Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on OGG expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline or Juçara fruit three times a week during 18 weeks. A) Immunohistochemistry of tumor cells. B) Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. Immunohistochemistry were performed and OGG expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA. C) Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.....92

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - Açaí Juçara (*Euterpes edulis* Martius) inibe a formação de Focos de Criptas Aberrates em modelo animal de carcinogênese colorretal**

Tabela 1. Resultados das leituras em triplicata dos tampões de Cloreto de Potássio (pH 1,0) e Acetato de Sódio (pH 4,5) nas diluições de 1:10 e 1:25 para quantificação de antocianinas.....55

Tabela 2. Média e Percentual de Redução dos focos de cripta aberrante (FCA) nos grupos experimentais induzidos ao câncer e suplementados com açaí Juçara e seu extrato.....60

Tabela 3. Descritivo em número e percentual das características histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal de ratos induzidos a carcinogênese pertencentes aos grupos DMH+/Juçara-, DMH+/Juçara+ e Grupo DMH+/Juçara Extract.....63

### **CAPÍTULO II - Juçara supplementation (*Euterpes edulis* Martius) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats**

**Table 1.** Number and percentage of intestinal mucosal lesions in an experimental model of colorectal cancer between DMH+/Juçara-, DMH+/Juçara+ DMH+/Extract groups according to their diagnoses.....81



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCR - Câncer Colorretal

APC - *Adenomatous polyposis coli*

BRAF - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

SOD-1 - Superóxido Dismutase

GPx - Glutathione Peroxidase

Trx - Tiorredoxina

Ahr - Aril-hidrocarboneto

APE1 - endonuclease apurínica/apirimídica 1

OGG1 - 8-oxoguanina DNA glicosilase

INCA – Instituto Nacional do Câncer

FCA - Focos de Criptas Aberrantes

CIN - Via de Instabilidade Cromossômica

MSI - Via de Instabilidade de Microsatélite

MMR - mismatch repair

APC - *Adenomatous polyposis coli*

TGFβRII - Receptor II do fator de crescimento transformante β

HNPCC - Síndrome de Lynch

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PAFA - Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

$O_2^-$  - Superóxido

$RO_2^\bullet$  - Radical Peroxil

$RO^\bullet$  - Radical Alcoxil

$O_2$  - Oxigênio singlet

$ROO^-$  - Peróxido

$H_2O_2$  - Peróxido de Hidrogênio

OH - Radical hidroxila

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

$O_3$  – Ozônio

BER - *Base excision repair*

NER - *Nucleotide excision repair*

MGMT - *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*  
DSBs - Reparo de quebras de fita dupla  
HR – Recombinação Homóloga  
APE1/REF1 - *AP endonuclease/Redox Factor 1*  
GR - NADPH-GSSG reductase  
Prx - Perorredoxina  
NRF2 - *Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]—related factor 2*  
CNC - *Cap'n'Collar*  
bZIP - *Basic region leucine zipper*  
Neh - *Nrf2-ECH homology*  
MAF - *Musculoaponeurotic Fibrosarcoma*  
ARE - *Antioxidant-response element*  
E2E3 - *Ubiquitin-conjugating enzyme*  
CBP - *CREB-binding protein*  
RXR $\alpha$  - *Retinoic X receptor alpha*  
Keap1 - *Kelch-like ECH-associated protein 1*  
NTR - Região Amino-Terminal  
BTB - *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a' brac*  
IVR - Região de Intervenção  
DGR - *Double-glycine*  
CTR - Região Carboxi-terminal  
Cul3 - *Cul3-based ubiquitin E3 ligase complex*  
sMaf - *Small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*  
PI3K- Fosfatidilinositol-3 quinase  
Akt - proteína quinase A  
PKC - Proteína quinase C  
GSK3 $\beta$  - Glicogênio sintase quinase-3 $\beta$   
LDLox - Lipoproteína de baixa densidade oxidada  
RXR $\alpha$  - *Retinoic X receptor alpha*  
Cu/ZnSOD - Cobre/Zinco-Superóxido Dismutase  
GSH - Glutathiona reduzida  
DMH - 1,2-dimetilhidrazina  
DAB - 3,3'-diaminobenzidina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia do Câncer Colorretal .....	21
2.2 Etiopatogênese .....	22
2.3 Sobrevida e Prognóstico .....	29
2.4 Fatores de Risco e Proteção .....	30
2.5 Açaí Juçara .....	33
2.6 Antocianinas .....	35
2.7 Estresse Oxidativo e o Sistema de Defesa Antioxidante .....	37
2.7.1 8-guanina DNA glicosilase (OGG1) .....	43
2.7.2 Gutationas Peroxidases (GPx) .....	45
2.7.3 Superóxido Dismutase 1 (SOD1) .....	46
CAPÍTULO I: Suplementação com polpa do fruto juçara ( <i>Euterpes edulis</i> Martius): efeito sobre Focos de Criptas Aberrantes e desenvolvimento tumoral em modelo de carcinogênese colorretal .....	49
Resumo: .....	50
1 INTRODUÇÃO .....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
2.1 Aspectos Éticos .....	53
2.2 Polpa de açaí Juçara .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3 Extração e Quantificação de Antocianinas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.4 Modelo Experimental .....	56
2.6 Estatística .....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
3.1 Análise do número de Focos de Criptas Aberrantes .....	58
3.2 Avaliação do número e características histopatológicas de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental para câncer colorretal, suplementados e não suplementados com açaí Juçara .....	61
4. REFERÊNCIAS .....	67
CAPÍTULO II: Juçara supplementation ( <i>Euterpes edulis</i> Martius) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats	73
Abstract: .....	75

Introduction.....	76
Materials and Methods .....	79
2.1. <i>Ethics</i> .....	79
2.2. <i>Subjects</i> .....	79
2.3. <i>Juçara fruit pulp and extract</i> .....	79
2.4. <i>Cancer induced protocol</i> .....	79
2.5. <i>Experimental design</i> .....	80
2.5. <i>Imunohistochemistry</i> .....	80
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	81
3. Results .....	81
3.1 <i>Expression of antioxidant proteins SOD1, GPx and OGG1 in colorectal tubular adenocarcinoma</i> .....	82
Discussion .....	85
Acknowledgments .....	88
References .....	88
CONCLUSÕES GERAIS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças que atinge mais de 14 milhões de adultos no mundo. Para o ano de 2018, ocorreram 18,1 milhões de novos casos, com 9,6 milhões de morte por câncer mundialmente. Sua distribuição geográfica está estritamente relacionada a fatores ambientais e ao estilo de vida, gerando enorme impacto socioeconômico, pois exige tratamento individualizado, longo, exaustivo e ainda caro para os sistemas de saúde (GLOBOCAN, 2019).

Em relação ao Câncer Colorretal (CCR), observa-se heterogenicidade em sua etiopatogênese sendo descritas três diferentes vias para o seu desenvolvimento. A maioria dos tipos de CCR surge a partir da mutação do gene APC que permite a proliferação descontrolada de células epiteliais com a formação do adenoma. As vias que correspondem a este tipo de mutação são a Via de Instabilidade Cromossômica e de Instabilidade de Microssatélites. A terceira via, conhecida como Via do Serrilhado inicia-se como mutações no gene *BRAF* que culmina com desenvolvimento de lesões serrilhadas que levam a formação de pólipos (SNOVER, 2011).

Em seguida, em todas as vias ocorrem eventos de mutações adicionais, em ordem relativamente aleatória, com a progressão eventual de um pequeno subconjunto de adenomas convencionais para carcinoma com estádios intermediários, mostrando graus crescentes de displasia e, conseqüentemente, no carcinoma *in situ*. Todo este processo evolui gradativamente por 10 a 15 anos, o que propicia condições ideais à sua detecção precoce e aumenta a chance de sobrevivência do paciente (SAHA et al., 2002; SNOVER, 2011; HABR-GAMA et al., 2012).

Como muitas outras neoplasias, o CCR é uma doença também heterogênea em relação ao fenótipo tumoral, fatores de risco, predisposição genética e resposta ao tratamento. E, como resultado pode ser classificado em grupos com relevância clínica usando características de patologia molecular (YOUNG, 2007).

O CCR é considerado uma doença do “estilo de vida”, pois as maiores incidências ocorrem em países com hábito alimentar rico em consumo de carnes vermelhas e carnes processadas, pouca ingestão de frutas, legumes e verduras, alta

prevalência de obesidade e sobrepeso, inatividade física, consumo de álcool e tabagismo (TORRE et al., 2016).

Além do estilo de vida, fatores genéticos e ambientais influenciam diretamente nos estágios de iniciação, promoção e desenvolvimento do câncer colorretal. Cerca de 75% dos casos são de origem esporádica, causadas por fatores ambientais (dieta, depressão, uso de álcool, tabaco e micro-organismos) e 20% são de origem hereditária. No entanto, alimentação diversificada em frutas, legumes e verduras auxilia na proteção da mucosa intestinal. Desta forma, o consumo de alimentos ricos em compostos bioativos com características antioxidantes é essencial para a redução do risco de desenvolvimento deste tipo tumoral (CRUZ et al., 2004; ASSIS, 2011).

Neste contexto, o fruto da palmeira Juçara vem se destacando no cenário nacional devido a sua composição rica em compostos antioxidantes, principalmente antocianinas e, por isso ela apresenta efeitos benéficos à saúde reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, do mesmo modo que estão associadas a efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênico, antidiabético e antimicrobiano (HE e GIUSTI, 2010; TSUDA, 2012).

Alguns compostos fenólicos, presentes no Juçara, atuam na regulação de várias vias de sinalização, como a via de transcrição de genes citoprotetores, que abrange a superóxido dismutase (*SOD-1*), glutathione peroxidase (*GPx*), tioredoxina (*Trx*) e Ahr (*aryl-hidrocarboneto*), além de genes relacionados ao reparo do DNA como a endonuclease apurínica/apirimídica 1 (*APE1*) e 8-oxoguanina DNA glicosilase (*OGG1*) (MITSUISHI et al., 2012). Algumas destas substâncias atuam na neutralização das espécies reativas de oxigênio, atuando na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes além de ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade (WEIJL et al., 1997).

Desta forma, este trabalho traz em discussão os efeitos da alimentação na expressão de proteínas relacionadas ao desenvolvimento de câncer colorretal, a fim de avaliar o impacto que a suplementação com produto rico em compostos bioativos, como é o fruto da palmeira Juçara, possui na tumorigênese e assim, auxiliar no entendimento e avaliação da evolução clínica do paciente portador de câncer colorretal ou mesmo na conduta terapêutica a ser tomada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia do Câncer Colorretal

O câncer colorretal está entre as principais causas de morbimortalidade em todo o mundo, representando assim grande problema de saúde pública mundial (FAVORITI et al., 2016). Atualmente, é a quarta maior causa de mortalidade no mundo e a terceira causa mais comum de câncer, sendo superado em incidência apenas pelos tumores de pulmão e mama (LABIANCA et al., 2013; TORRE et al., 2015, WHO, 2018).

No mundo, surgem anualmente 1 milhão de novos casos de CCR. O índice de mortalidade desta doença é superior a 500 mil e sua distribuição mundial varia entre os diferentes países de acordo com o estilo de vida da população. Países desenvolvidos da América do Norte, Europa, Austrália, Nova Zelândia e na parte sul da América do Sul juntos apresentam 60% da incidência de CCR. A sobrevida média global para este tipo de câncer se encontra em torno de 59% em países desenvolvidos e 42% em países em desenvolvimento, podendo chegar a 90% se a doença for diagnosticada em estágio inicial. Em países como os Estados Unidos, onde há diagnóstico precoce e remoção de lesões pré-neoplásicas, nota-se padrão estável ou de diminuição da incidência nos últimos anos (JEMAL et al., 2011; LEE et al., 2013; INCA, 2016; FAVORITI, 2016).

Esta distribuição desigual do CCR ocorre devido à condição socioeconômica das populações, variabilidade de exposição aos principais fatores de risco, com nítido aumento da prevalência em países desenvolvidos, e ainda um constante crescimento dos casos de CCR nos países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; FAVORITI, 2016).

A grande extensão do território brasileiro também permite incidência diferencial do CCR. Dados obtidos do INCA mostraram que na Região Sudeste, o CCR é o segundo mais frequente, com 23,29 a cada 100 mil, ao passo que nas regiões Sul e Centro-Oeste, ele ocupa a terceira colocação com 22,17/100 mil e 16,95/100 mil, respectivamente. Se considerarmos as Regiões Nordeste (7,98/100 mil) e Norte (4,97/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA, 2019).

Com o aumento da expectativa de vida, a progressiva industrialização e a globalização, está ocorrendo aumento dos casos desta neoplasia. O CCR é o tipo de câncer mais frequente para ambos os sexos, estima-se para o ano de 2018, no Brasil, o surgimento de 36.360 novos casos de câncer colorretal, sendo 17.380 em homens e 18.980 em mulheres. Para o ano de 2020, estima-se o surgimento de 86.154 casos de câncer colorretal em todo o território nacional (INCA, 2019; GLOBOCAN, 2018).

Além da alta incidência do CCR, há discreta predileção por indivíduos com idade superior a 40 anos, prevalecendo os maiores índices em pessoas com idade acima de 60 anos e pertencentes ao sexo feminino (FIGUEIREDO et al., 2014). Devido a alta incidência, estratégias de rastreamento que visem detecção precoce são essenciais para a diminuição das mortes em decorrência deste tipo de tumor.

## **2.2 Etiopatogênese**

O Câncer Colorretal refere-se às neoplasias que acometem o cólon, a junção retossigmóide, o reto, o ânus e o canal anal. Devido a vasta distribuição anatômica e diferenças de estrutura, serão utilizadas diferentes modalidades de tratamentos. A distribuição deste tipo de câncer ao longo do intestino grosso apresenta uma predominância pelos segmentos distais (GOMEZ et al., 2004), sendo cerca de 40% de casos no cólon proximal (cólon, ascendente e cólon transversal), 30% no cólon distal (cólon descendente e cólon sigmoide), e 30% no reto (HOWLADER et al., 2015).

O principal tipo histológico de câncer colorretal é o adenocarcinoma, responsável por cerca de 95% dos casos. Os demais tipos histológicos incluem o adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células escamosas e carcinomas indiferenciados (VASQUES e PERES, 2010).

O processo de tumorigênese colorretal se caracteriza pelo acúmulo de mutações epigenéticas em genes supressores tumorais, oncogenes e genes associados ao reparo do DNA que resultam na transformação celular do epitélio colorretal. Este processo é percebido pelo aparecimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e lesões pré-neoplásicas no epitélio do cólon, que são caracterizadas por alterações morfológicas nas criptas de Lieberkühn com aberturas



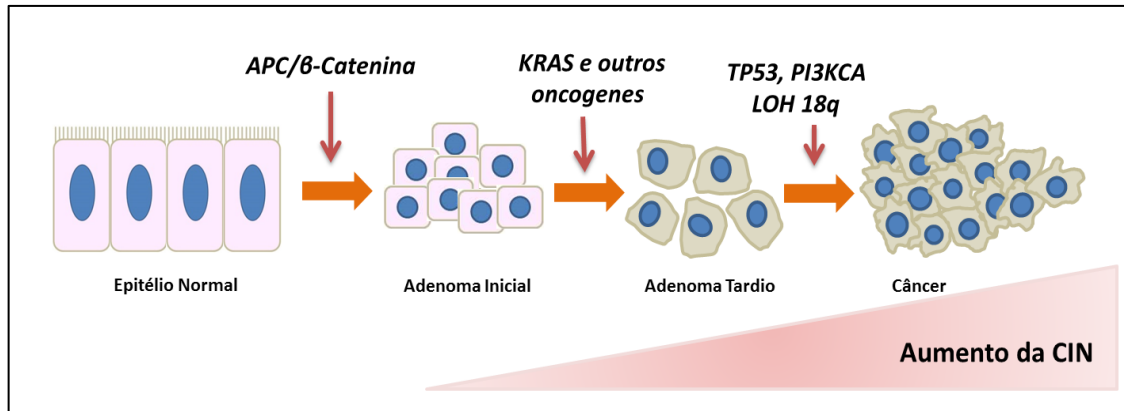
terminais alteradas, tamanho maior que as criptas adjacentes e espessamento epitelial com células proeminentes (SIU et al., 1997; CHENG e LAI, 2003).

Os FCA podem ser abaulados, côncavos ou planos e quando corados com azul de metileno ficam mais escuros que o tecido epitelial normal, permitindo assim o seu reconhecimento. Eles podem ser avaliados e caracterizados quanto ao número, distribuição ao longo do colón e tamanho. Nem todos os FCA evoluem para uma displasia, porém sabe-se que o processo de tumorigênese inicia-se com o seu surgimento (FENOGLIO-PREISER e NOFFSINGER, 1999).

O conhecimento e desenvolvimento da Biologia Molecular permitiu a compreensão dos mecanismos e vias moleculares responsáveis pelo desenvolvimento do CCR. São conhecidas três vias moleculares responsáveis pela progressão tumoral: a via de Instabilidade Cromossômica (CIN), a via de Instabilidade de Microssatélite (MSI) e a via do Serrilhado. Essas diferentes vias permitirão que haja diferença histopatológica que acarretam em diferentes fenótipos, prognóstico e tratamentos (FEARON e VOLGESTEIN, 1990).

A via de Instabilidade Cromossômica, primeiramente descrita por Fearon e Volgestein em 1990, apresenta mutações que geram uma série de eventos ordenados em que transformações nas mucosas normais do cólon ou reto culminam com adenoma precoce, em seguida, ao adenoma avançado e finalmente, com o carcinoma invasivo, em um processo conhecido como Modelo Adenoma-Carcinoma (FEARON e VOLGESTEIN, 1990; PINO e CHUNG, 2010). Todo este modelo é baseado em mutações em diferentes tipos de genes que estão envolvidos nos diferentes estágios de formação de adenomas e adenocarcinoma colorretais (PINHO e ROSSI, 1999).

A mutação chave inicial de transformação (mucosa normal-adenoma precoce) é resultado da mutação no gene supressor tumoral *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), seguida pela ativação de mutações no oncogene *KRAS* (Figura 1). Sequencialmente, a transformação maligna segue com mutações em vários outros genes como *TP53*, fator de crescimento- $\beta$  e *PI3KCA* (PINO e CHUNG, 2010; VARELA-REY et al., 2013).



**Figura 1. Via de Instabilidade Cromossômica de modelo genético de carcinogênese colorretal em várias etapas.** O passo inicial ocorre pela inativação do gene *APC*. A progressão do Adenoma Inicial ao Adenoma tardio requer mutações que ativem o oncogenes *KRAS* que levam ao aumento da expansão celular clonal. Mutações nos genes *TP53* e a perda da heterozigossidade do braço longo do cromossomo 18 (LOH 18q) conferem vantagens adicionais de crescimento das células tumorais invasivas. Mutações no gene *PI3KCA* ocorrem em pequenas proporções na sequência adenoma-carcinoma. Adaptado de Mundade et al. (2014).

Os genes *KRAS* e *APC* estão envolvidos em processos iniciais, como na formação de Focos de Criptas Aberrantes e adenomas, e *TP53* está envolvido na formação de adenocarcinomas (FEARON e VOLGESTEIN, 1990).

O *APC* é um gene supressor de tumor que age como uma barreira na sequência adenoma-carcinoma, tendo como uma de suas funções a regulação intracelular de  $\beta$ -catenina. Em condições fisiológicas, o *APC* é responsável pela manutenção de níveis baixos dessa proteína no núcleo, por meio da formação de ao complexo APC/ $\beta$ -catenina que permite o transporte da  $\beta$ -catenina do núcleo ao citoplasma onde a mesma será degradada, impedindo assim, a transcrição de múltiplos genes envolvidos na proliferação celular. Desta forma, a APC mutada não consegue se ligar a  $\beta$ -catenina que então, no núcleo, irá transcrever genes responsáveis pela proliferação, apoptose e controle das mudanças de fase do ciclo celular. Estas mutações da APC originam a polipose adenomatosa familiar (HERNEGGER et al., 2002; KNUDSEN et al., 2003; KIM et al., 2008; MARKOWITZ et al., 2009; MUNDADE et al., 2014).

Para que ocorra a próxima fase da carcinogênese colorretal (adenoma inicial em adenoma tardio), é necessário que ocorra mutação no oncogene *KRAS* (frequentemente nos códons 12 e 13). O *KRAS* pertence à família de oncogenes *RAS* e está mutado em aproximadamente 30-50% dos cânceres colorretais. As proteínas pertencentes a esta família têm importante papel na sinalização e proliferação celular, diferenciação, invasão local, metástase e apoptose

(MALUMBRES e BARBACID, 2003; SEBOLT-LEOPOLD e HERRERA, 2004; TAN e DU, 2012). Apesar da sua importância, a mutação neste gene não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, havendo necessidade de alterações genéticas em genes supressores de tumor tais como o gene *TP53* e oncogenes como o *PI3KCA* (FEARON, 2011).

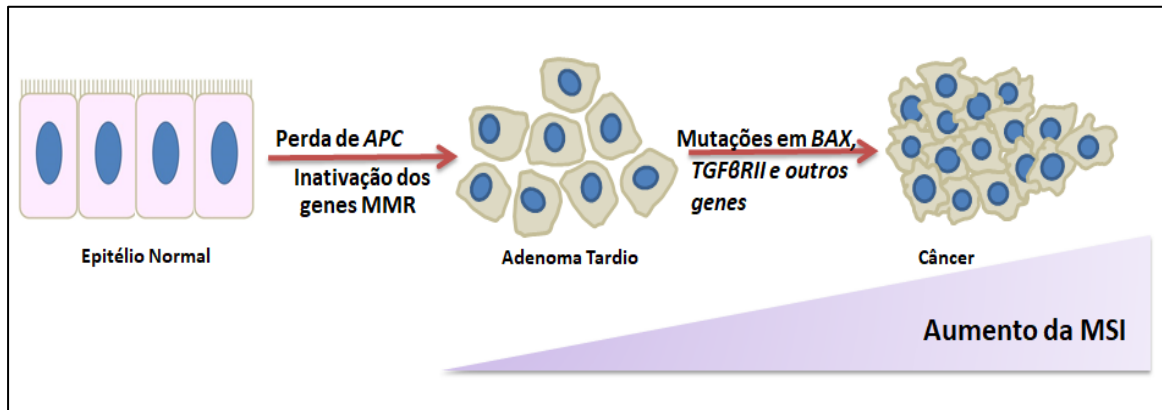
Também pertencente à via de instabilidade cromossômica, o gene *TP53* é ativado para reparo de danos celulares ou então induzindo a apoptose celular quando tal reparo não é possível (JORDE et al., 2000; OIKAWA et al., 2005). Esses mecanismos celulares ativados pela p53 são uma importante etapa na carcinogênese colorretal. Mais de 50 tipos diferentes de tumores estão relacionados ao gene *TP53* e, a interação de p53 com outras proteínas permite que haja a promoção da inflamação e proliferação celular em CCR (LOSI et al., 1996; SWAMY et al., 2003; OIKAWA et al., 2005). Mutações no gene *TP53* já são marcadores universais em diversos tipos de tumores e, perda de função desta proteína é relatada em 4%-26% de adenomas, 50% dos adenomas invasivos e em 50%–75% dos CCRs, mostrando assim, seu papel na transição adenoma-carcinoma (LESLIE et al., 2002).

Além da via de Instabilidade Cromossômica, existe outro mecanismo envolvido no desenvolvimento do câncer colorretal que é a Via de Instabilidade de Microssatélites. Aproximadamente 15% dos CCR esporádicos estão associados a esta via que se manifesta com a inativação das proteínas de reparo do DNA (*mismatch repair* – MMR). Estas proteínas são responsáveis pela correção dos erros de emparelhamento de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do DNA (LOSSO et al., 2012; MUNDADE et al., 2014).

A causa mais frequente para a via de Instabilidade de Microssatélites ocorre pela hipermetilação das ilhas CpG de vários genes, entre eles o gene *MLH1*. Essas mudanças epigenéticas afetam a função dos genes, sem mudanças genéticas, e impedem que estes genes sejam transcritos, causando assim, o silenciamento do gene e a expressão deficiente da proteína (SOREIDE et al., 2006; GEIERSBACH e SAMOWITZ, 2011).

Assim como a via de Instabilidade Cromossômica, a via de instabilidade de microssatélites é conduzida pelo dano do gene de *APC*. E, o silenciamento ou expressão deficiente dos genes *MMR* permite que ocorra maior número de mutações em genes alvos específicos envolvidos na proliferação e diferenciação

celular, tais como receptor II do fator de crescimento transformante  $\beta$  (*TGF $\beta$ RII*), proteínas envolvidas na regulação da apoptose e outros, levando a tumores mais invasivos (Figura 2) (ARMAGHANY et al., 2012; MUNDADE et al., 2014).

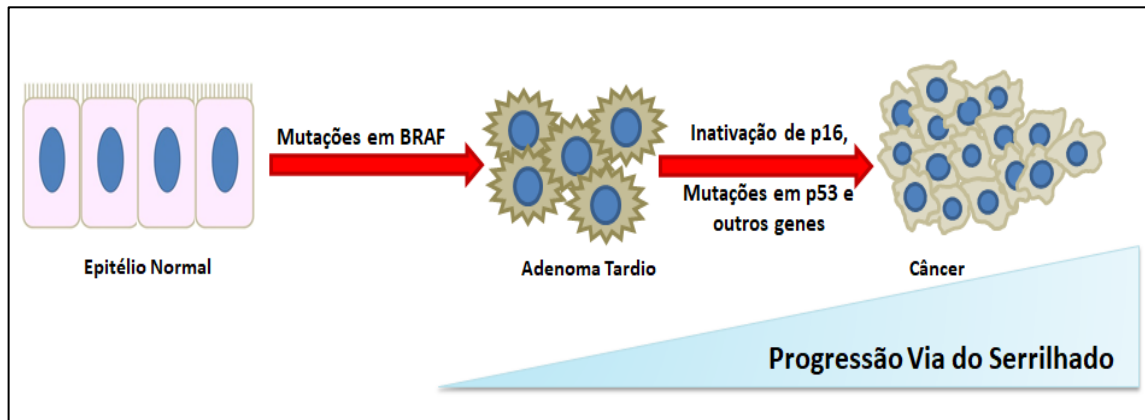


**Figura 2. Via de Instabilidade de Microssatélite (MSI) envolvida no processo de desenvolvimento do CCR.** A via MSI é conduzida por mutações no gene *APC* e, é determinada pelo silenciamento de genes de reparo (*MMR*). Esta falha no sistema de reparo celular gera mutações em genes relacionados a proliferação e diferenciação celular, como o *TGF $\beta$ RII* e, proteínas envolvidas na regulação da apoptose, como *BAX* e outros. A mutação nestes genes leva a progressão de adenomas para câncer invasivo. Adaptado de Mundade et al. (2014).

Existe outra via recentemente descrita, denominada via dos Pólipos Serrilhados que recebeu este nome pela aparência morfológicamente serrilhada das lesões precursoras. Esta via corresponde a aproximadamente 30% dos CCR e, diferentemente das vias de Instabilidade Cromossômica e Instabilidade de Microssatélite que são principalmente iniciadas por mutações no gene *APC*, a via do Serrilhado é desencadeada por mutações e silenciamento dos genes *BRAF* e *KRAS*, envolvidos em processos de diferenciação celular, reparo de DNA e controle do ciclo celular, além de inibir a apoptose normal das células epiteliais do cólon (SNOVER, 2011; MUNDADE, 2014).

Ambos os genes *KRAS* e *BRAF* codificam quinases que pertencem à cascata das MAPK que, por sua vez, regulam processos vitais no controle da proliferação, diferenciação e apoptose. Mutações nestes genes resultam em ativação constitutiva da via MAPK/ERK que resultará na inativação ou perda de função de genes como o *p16*, *p53*, *PI3KCA* que são responsáveis pela proliferação celular descontrolada, aumento da sobrevivência celular, invasão e metástase. As alterações genéticas que ocorrem nessa via ainda não são totalmente esclarecidas e existe grande

variabilidade de mudanças moleculares descritas (Figura 3) (YAMADE, 2014; JSPEERT et al., 2015).



**Figura 3. Via dos Pólipos Serrilhados.** Esta via é desencadeada por mutações no gene BRAF que geram um aumento da sinalização da via MAPKs / ERK, levando a mutações e metilações em outros genes tais como *TP53*, *p16*, entre outros que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de câncer colorretal. Adaptado de Mundade et al. (2014).

Toda essa descoberta molecular do desenvolvimento do câncer colorretal somente foi possível por meio do estudo das síndromes genéticas como a síndrome de Lynch (HNPCC) e a polipose adenomatosa familiar (PAF). As mutações relativas a PAF frequentemente estão relacionadas ao cromossomo 5 e, aquelas da síndrome de Lynch caracterizam-se por modificações nos genes de reparo (*MMR*) (LYALL et al., 2006). Apesar do vasto conhecimento sobre essas síndromes, elas correspondem a apenas 20% de todos os casos de CCR. Os demais 80% dos casos de CCR ocorrem de forma esporádica (ASSIS, 2011; MUNDADE et al., 2014).

A polipose adenomatosa familiar (PAF) é uma doença hereditária, autossômica dominante, causada por mutação no gene *APC*, localizado no braço longo do cromossomo 5 (WOOD et al., 2014). Esta doença é caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos adenomas ou pólipos no colón e reto, durante a segunda ou terceira década de vida, com alto risco de desenvolvimento tumoral se não tratado precocemente. Pacientes com PAF tem forte predisposição para início precoce de CCR, bem como outras malignidades (ARNASON et al., 2014; LEOZ et al., 2015). A ocorrência da PAF varia entre 1/7.000 a 1/16.000 nascidos vivos, sendo responsável por menos de 1% dos casos de câncer colorretal, apresentando penetrância de aproximadamente 100% aos 35-40 anos (BURT et al., 1990; GALIATSATOS e FOULKES, 2006).

Nos últimos anos tem se dado muita atenção para as formas atenuadas da doença que podem ser ocasionadas por mutações no éxon 9 do gene *APC* ou por mutações bialélicas nos genes *MUTYH*, apresentando padrão de herança recessivo. A Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA), por sua vez, é caracterizada por apresentar idade tardia no diagnóstico, aparecimento do CRR, presença de menos de 100 pólipos e maior distribuição proximal dos pólipos nas neoplasias do cólon (HERNEGGER et al., 2002; KNUDSEN et al., 2003).

Existe ainda outra síndrome autossômica dominante rara, a Polipose Juvenil, em que mutações no gene *SMAD4/DPC4* levam ao aparecimento de 10 ou mais pólipos juvenis que ocorrem principalmente no cólon. A manifestação desta síndrome ocorre geralmente entre quatro e 14 anos de idade (MANGO et al., 1994; HAMILTON e AALTONEN, 2000).

Também, a síndrome de Peutz-Jeghers, é uma doença hereditária autossômica dominante rara que está associada ao CCR. O desenvolvimento desta síndrome gera o surgimento de múltiplos pólipos em todo o trato gastrointestinal, acompanhada de pigmentação escura geralmente ao redor dos lábios, mucosa oral, língua, nariz e às vezes também em volta dos olhos (HYER, 2001). Além disso, pacientes com esta síndrome tem elevado risco de desenvolvimento de neoplasias em múltiplos órgãos como cólon, mama, ovário, útero, cérvix, pulmão e testículo (LOPES et al., 2004).

Assim, como as mutações nos genes supressores tumorais, as mutações nos genes de reparo são outro passo-chave no desenvolvimento do CCR. Dentre as síndromes associadas a mutações nestes genes, a Síndrome de Lynch é a mais comum delas e aumenta em até 80% o risco de desenvolvimento de CCR (MENSENKAMP et al., 2014). Esta síndrome é definida pela inativação dos genes de reparo (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*) (CARETHERS et al., 2013).

Além do câncer do intestino grosso a HNPCC desencadeia outros tipos de câncer, como do endométrio, estômago, intestino delgado, retroperitônio, trato urinário, ovários e cérebro (WIN, et al., 2012; MILLS et al., 2014). Este tipo de câncer apresenta pequeno número de pólipos e penetrância de 80% a 90% (LYNCH, 1996).

### 2.3 Sobrevida e Prognóstico

A sobrevida de pacientes com CCR em 5 anos está entre 50% e 60% e é maior nos estágios iniciais (65 a 92%) do que nos estágios avançados (12%) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Muitos casos de CCR são detectados a partir da presença de sinais ou sintomas, que normalmente aparecem somente em fases mais avançadas da doença. Os principais sintomas do câncer colorretal são alteração nos hábitos intestinais, incluindo diarreia ou constipação, mudança na consistência das fezes em período maior de quatro semanas, sangramento retal ou sangue nas fezes, desconforto abdominal persistente como cólicas, gases ou dor, fraqueza ou fadiga e perda de peso sem causa conhecida (SCHMOLL et al., 2012).

No entanto, a maioria das pessoas não apresentam sintomas nos estágios iniciais da doença e nestes casos a neoplasia pode vir a ser detectada por meio de rastreamento ou vigilância (SCHMOLL et al., 2012). O rastreamento é recomendado para todos os adultos com idade superior a 50 anos e baseia-se no exame de colonoscopia e na detecção de sangue nas fezes. Ele é capaz de identificar o CCR ainda nas fases iniciais, antes mesmo que o paciente comece a apresentar algum tipo de sintoma, uma vez que, o diagnóstico precoce é uma das armas mais poderosas para prevenção deste tipo de câncer (CARROLL et al., 2014; LIN et al., 2013). Embora, no Brasil as políticas públicas de prevenção e rastreamento do câncer colorretal não sejam tão eficientes, esta prática é orientada e preconizada por sociedades médicas e organizações de saúde (GELLAD e PROVENZALE, 2010).

A detecção do CCR se baseia em teste de sangue oculto nas fezes, exame físico com toque retal ou por diagnóstico por imagem que permitem além da detecção, o estadiamento clínico. A colonoscopia, além da detecção da lesão neoplásica, permite a detecção de lesões sincrônicas e a biópsia do tumor para o diagnóstico histopatológico em um mesmo procedimento (SCHMOLL et al., 2012; LIN et al., 2013). Estudos realizados nos Estados Unidos e Reino Unido vêm demonstrando que esta detecção precoce reduz a taxa de mortalidade dos pacientes e também a incidência de CCR (ATKIN et al., 2010; SCHOEN et al., 2012).

Desta forma, a mortalidade dos pacientes com CCR depende do estágio em que a doença é diagnosticada, sendo que quanto mais cedo é o diagnóstico, maior é a sobrevida. Maringe e colaboradores (2013) realizaram um estudo comparando a

fase de diagnóstico e sobrevivência por CCR em seis países durante os anos de 2000 a 2007. A partir dos dados de registros de câncer de base populacional da Austrália, Canadá, Dinamarca, Noruega, Suécia e Reino Unido, os pesquisadores observaram que mesmo em países desenvolvidos há discrepância nas taxas de sobrevida e isto pode ser explicado pelas diferenças e atrasos no diagnóstico, o desconhecimento dos sintomas e as dificuldades de acesso ao rastreamento ou ao diagnóstico endoscópico. Assim, países que tenham boa política de prevenção e consequentemente melhor acesso aos serviços de saúde apresentam as melhores taxas de sobrevida.

O tratamento do câncer colorretal depende, principalmente, do estadiamento, da localização do tumor e da extensão da doença. A ressecção cirúrgica é o procedimento mais utilizado, porém, em alguns casos intervenções de quimioterapia e radioterapia podem ser necessárias (LABIANCA, 2013; INCA, 2016).

## **2.4 Fatores de Risco e Proteção**

O câncer colorretal, uma doença multifatorial, apresenta um conjunto de fatores de risco responsáveis pelo desenvolvimento da doença (BRENNER et al., 2011). Os hábitos de vida como tabagismo, ingestão de álcool, consumo de carne vermelha ou processada, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus, síndromes metabólicas, sedentarismo e obesidade são considerados os principais fatores de risco desencadeadores desta neoplasia (SIEGEL et al., 2017).

O uso de tabaco é considerado um importante fator de risco, pois, a fumaça do cigarro apresenta mais de 7.000 substâncias, dentre elas, compostos carcinogênicos e genotóxicos que podem chegar ao cólon por meio do sistema circulatório ou pela ingestão direta (LIMSUI et al., 2010).

Diversas pesquisas mostram a relação entre o tabagismo e o câncer colorretal (CHENG et al., 2015; JAYASEKARA et al., 2018, LEE et al., 2019). Rasool e colaboradores (2013) observaram aumento das taxas de mortalidade e redução na idade do surgimento do CCR, quando compararam fumantes e ex-fumantes. Além de acumularem comorbidades, influenciando a mortalidade por outras causas, os fumantes têm maior risco de desenvolvimento tumoral, uma vez que o uso de tabaco em até 20 anos permite o surgimento de pequenos pólipos, mas, quando o uso



ultrapassa 20 anos ocorre o desenvolvimento de pólipos grandes e a exposição superior a 35 anos favorece o aparecimento de carcinoma colorretal (GIOVANNUCCI, 2001; RASOOL et al., 2013; WALTER et al., 2014).

Além disso, o consumo de álcool associado ao tabagismo é considerado como o maior fator de risco para o desenvolvimento do CCR. O álcool potencializa os efeitos do tabaco além de suprimir a vigilância imunológica de tumor, induzindo alterações que incluem a atraso no reparo do DNA, metilação de genes supressores de tumor e desacetilação das histonas. Também altera o metabolismo do folato, efeito genotóxico do acetaldeído e aumento dos níveis de estrogênio (CHAN et al., 2011; MESSINA et al., 2012; SONG et al., 2015).

Estudos epidemiológicos têm destacado o papel da dieta e estilo de vida para o risco de desenvolvimento tumoral, dados mostraram que a obesidade e o sedentarismo associados levam ao risco de cerca de 60% de desenvolvimento de câncer de cólon (ALEKSANDROVA et al., 2013).

A prática regular de atividade física está associada a redução na incidência e mortalidade por câncer colorretal, enquanto obesidade e excesso de peso corporal aumentam as chances de adenomas colorretais, que são precursores da doença (MORIKAWA et al., 2013). Isto ocorre, pois o exercício físico diminui concentração de leptina, as taxas da proteína C reativa e a pressão arterial, além de facilitar a perda de peso, diminuir a insulina e fatores de crescimento semelhantes a insulina, melhorar a resposta imune e promover a produção de IL-6 e diminuição da expressão do iNOS e TNF- $\alpha$  no plasma e na mucosa colônica, aumentando a imunidade (DURKO e MALECKA-PANAS, 2014).

A alimentação inadequada pode aumentar a vulnerabilidade da mucosa a agentes carcinógenos, além de influenciar diretamente os estágios de iniciação, promoção e progressão do CCR. Uma vez ingeridos, os alimentos promoverão uma modificação na mucosa do cólon, causando danos diretos ao DNA pelos produtos da peroxidação lipídica, mudanças no metabolismo da microbiota intestinal e redução da proteção devido a inadequada ingestão de antioxidantes (LESER e SOARES, 2001; SCOTT-STUMP e MAHAN, 2002).

As gorduras, quando presentes em excesso no duodeno, estimulam maior secreção de sais biliares que, por sua vez, exercem função detergente, podendo gerar danos ao tecido e aumentar a proliferação celular (LESER e SOARES, 2001). Ainda, o consumo diário de carnes processadas eleva em 25% o risco de

desenvolvimento de câncer de cólon e, a 31% para o câncer de reto. Este aumento ocorre, pois o ferro quando em excesso produz radicais livres, que levam ao estresse oxidativo e compostos nitrosos que danificam a mucosa intestinal. O estresse oxidativo por sua vez, estimula expressão de várias citocinas, aumentando assim, a citotoxicidade e estímulo à resposta inflamatória (SCOT-TSTUMP e MAHAN, 2002; CROSS et al., 2004; CHAN et al., 2011).

Por outro lado, a dieta tradicional mediterrânea, com alto consumo de verduras, frutas e vegetais está relacionada à redução do risco de câncer colorretal. Isto ocorre devido ao efeito de alguns compostos bioativos presentes nesses alimentos, como as vitaminas A, E e C, carotenóides, selênio, folato, tocoferóis e compostos fenólicos, que constituem os principais antioxidantes derivados da dieta (LESER e SOARES, 2001). Segundo o Relatório Mundial da Saúde (2003), uma dieta pobre nestes alimentos está listada entre os 10 principais fatores de risco que contribuem para a mortalidade no mundo (WHO, 2003).

As fibras presentes em grande quantidade nesta dieta mediterrânea possuem capacidade de absorver ou diluir substâncias cancerígenas fecais, reduzir o tempo de trânsito no cólon, reduzir o pH do cólon ou aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (CHAN et al., 2010). Dieta pobre em fibras pode gerar problemas de constipação crônica e diverticulite, considerados fatores de risco para o CCR (LESER e SOARES, 2001).

Os antioxidantes estão associados à neutralização das espécies reativas de oxigênio. Podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade. Existem evidências que o uso de antioxidantes na intervenção terapêutica junto à quimioterapia auxilia na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (WEIJL et al., 1997).

Os compostos fenólicos, por exemplo, além do efeito antioxidante também ajudam na redução da incidência de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Do mesmo modo que estão associados a efeitos anti-inflamatório, anticarcinogênico, antidiabético e antimicrobiano. As frutas como uva, mirtilo, framboesa, amora, açaí da amazônia e o açaí Juçara são grandes fontes destes compostos com atividade antioxidante e por isso, diversos estudos têm buscado entender como a alimentação baseada nestes alimentos pode interferir no processo de carcinogênese (HE e GIUSTI, 2010; TSUDA, 2012).

## 2.5 Açaí Juçara

O Açaí Juçara (*Euterpe edulis* Martius) é uma palmeira nativa do bioma da Mata Atlântica, sendo encontrada nos remanescentes desta Floresta do Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, podendo também ser encontrado do Paraguai e Argentina. Botanicamente o gênero *Euterpe*, pertencente à família Arecaceae, que se encontra distribuído na América Central e na América do Sul. No Brasil, existem três espécies pertencentes a este gênero que apresentam elevado valor econômico, *Euterpe oleraceae*, *Euterpe uterpe precatória* Martius e *Euterpe edulis* Martius (SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2008).

O Juçara é popularmente conhecido como palmito, Juçara, içara, ripa, entre outros (SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2008). Esta espécie produz um palmito de excelente qualidade que tem grande aceitação no mercado nacional e também para exportação. Por isso, sua regeneração natural ficou reduzida nas reservas naturais, colocando-o como espécie ameaçada de extinção. A descoberta de alternativas para o uso sustentável do Juçara representa uma alternativa de exploração da palmeira, que além de agregar valor, contribuir para a conservação da espécie e ainda aumentar a renda de produtores (BECKMANN-CAVALCANTE et al., 2012; MARTINELLI e MORAES, 2013).

A polpa do Juçara é extraída de pequenos frutos arredondados que possuem alto valor energético devido ao elevado teor de lipídeos, além de possuir consideráveis níveis de carboidratos, proteínas e minerais, especialmente potássio, ferro e zinco (SILVA et al., 2004; FREGONESI et al., 2010). Além disso, apresenta intensa coloração roxo-escuro devido à elevada concentração de antocianinas e, possuem propriedades organolépticas e nutritivas similares às do açaí da Amazônia (BORGES et al., 2011; FELZENSZWALB et al., 2013).

Estudos que avaliaram a caracterização bromatológica da polpa mostraram composição, em base seca, constituída de lipídeos (28,3 a 46,6%), sendo que ácido oleico (39,4%) e ácido linoleico (35,9%) são os ácidos graxos insaturados encontrados em maior proporção, e os outros componentes foram proteínas (6 a 7,5%) e cinzas (1,5 a 3,3%). Quanto ao conteúdo de carboidratos, diversos estudos apresentam dados com valores variando desde 28,3% a 42,5%, sendo que deste

montante, cerca de 64% compreendem fibras (SCHAUSS et al., 2006; MENEZES et al., 2008; DA SILVA et al., 2014; INADA et al., 2015; SCHULZ et al., 2015).

O total de minerais descritos na literatura para o Juçara foi de 8,8%, e, estes compreendem 17 elementos químicos: potássio, cálcio, magnésio, fósforo, sódio, ferro, manganês, zinco, enxofre, cobre, níquel, cobalto, selênio, cádmio, boro e alumínio, sendo os 8 primeiros encontrados em maior abundância no Juçara (DA SILVA et al., 2013; INADA et al., 2015). Uma revisão realizada por Schulz e colaboradores (2016) apresentou dados de diversos trabalhos com a polpa do Juçara e do Açaí da Amazônia e encontrou diferença significativa na composição das duas espécies, mostrando que o Juçara tem teores muito maiores que o Açaí Amazônico. A caracterização mineral evidenciou que os níveis de potássio, ferro e zinco encontrados no Juçara foram de 47%, 37,5% e 21,6% superiores, respectivamente, aos encontrados no açaí amazônico.

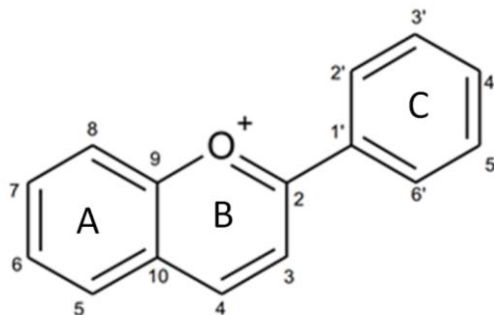
O conteúdo de vitaminas no Juçara também apresenta ótimas taxas podendo ser considerado grande fonte de ácido ascórbico, uma vez que, uma porção de 100g de Juçara contém 147 mg de ácido ascórbico, valor superior ao recomendado, que varia de 15 a 120 mg/dia, dependendo da idade e sexo (RUFINO et al., 2010; SCHULZ et al., 2016). Este fruto também possui consideráveis conteúdos de vitamina C (186 mg/100g), flavonóides (91,3 a 375 mg/100g) e clorofila (20,8 e 21,5 mg / 100g) (RUFINO et al., 2010; RUFINO et al., 2011).

Os compostos fenólicos são importantes devido a sua atividade antioxidante que reduz o estresse oxidativo e evita ou atrasa a oxidação eliminando os radicais livres (BATAGLION et al., 2014). O Juçara é fonte excepcionalmente rica de compostos fenólicos e, foram identificados 11 diferentes compostos fenólicos em sua composição, sendo os principais os ácidos fenólicos flavonoides, fenol aldeído e antocianinas. Dentre as antocianinas encontradas, destaca-se principalmente a cianidina 3-glicosídeo (1358 mg/100g de peso seco) (RUFINO et al., 2010; RUFINO et al., 2011; SCHULZ et al., 2016). As antocianinas encontradas neste fruto têm grande importância para a indústria alimentícia, uma vez que este fruto é amplamente utilizado como fonte para a pigmentação de alimentos (SCHULZ et al., 2015).

## 2.6 Antocianinas

As antocianinas pertencem à classe dos flavonoides (polifenóis), compreendem o maior grupo de pigmentos solúveis do reino vegetal e encontram-se predominantemente em chás, mel, vinhos, frutas, vegetais, nozes, óleo de oliva, cacau e cereais (LILA, 2004; GONG et al., 2014). O termo antocianina (do Grego *antho*, flor, e *kyano*, azul), foi utilizado pela primeira vez por Marquat (1835) para descrever a cor azul de algumas flores. Atualmente, sabe-se que além da cor azul, as antocianinas são responsáveis pela ampla gama de vermelho, rosa, laranja e violeta de diversos frutos e flores (MARKAKIS, 1982; GLOVER e MARTIN, 2012).

A estrutura química básica das antocianinas é composta por um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (B) contendo um oxigênio, que por sua vez, liga-se a outro anel aromático por uma ligação carbono-carbono (C) (Figura 4) (CASTÑEDA-OVANDO et al., 2009). A esta estrutura são ligados açúcares na posição 3 (sempre glicosilada, 3-O-monoglicosídeo) e na posição 5 (ocasionalmente glicosilada, 3,5-O-diglicosídeo). O anel C, por sua vez, tem um ou mais substituintes hidroxila e metoxila. As porções de açúcares ligados a esta estrutura podem variar, sendo frequentemente encontrados glicose, ramnose, galactose ou arabinose. Esta variação dos açúcares ligados ao anel C, bem como o pH local, o estado de agregação das antocianinas e a complexação por moléculas orgânicas são os fatores que permitem a ampla gama de cores manifestadas pelas antocianinas (GOULD et al., 2009; QUINA et al., 2009).



**Figura 4. Estrutura química básica das antocianinas.** Ligações de diferentes açúcares no anel C nas posições R3 e R5, além de diferenças do estado de agregação, pH local e complexação por moléculas orgânicas são os fatores que permitem a variedade cores encontradas em vegetais ricos em antocianinas. Adaptado de Quina et al. (2009).

Foram descritas mais de 500 diferentes tipos de antocianinas na natureza e, o que permite esta grande diversidade são as diferenças no número de grupos hidroxilados, no número e tipo de açúcares ligados à sua estrutura, os carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula e a posição destas ligações (KONG et al., 2003). As formas predominantes são a perlargonidina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delfinidina (Dp), petunidina (Pt) e malvidina (Mv) que juntas compreendem mais de 90% do total de antocianinas (CASTÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As antocianinas são moléculas hidrossolúveis, instáveis em pH alcalino, sensíveis a luz, degradadas em temperatura acima de 25°C e presença de oxigênio (LOPES et al., 2007). Sua capacidade antioxidante é atribuída a estrutura fenólica, que permite se ligar aos elétrons desemparelhados das moléculas das espécies reativas de oxigênio (EROs) como o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido ( $ROO^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Quando essas espécies reativas atingem as células e tecidos do organismo causam danos oxidativos relacionados com algumas doenças como o câncer (VOLP et al., 2008, WANG e STONER, 2008).

Além de sua capacidade antioxidante, esse grupo de flavonoides pode promover vários benefícios à saúde, como a capacidade anti-inflamatória, vasodilatadora e antimicrobiana. As antocianinas ainda atuam na prevenção da hiperglicemia, estimulam a secreção de insulina, diminuem o risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (FREGONESI et al., 2010; HE e GIUSTI, 2010; PATRAS et al., 2010; TSUDA, 2012). Alguns estudos ainda relacionam estes compostos à inibição da proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em diferentes partes do corpo como: estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central (FALCÃO et al., 2003; BORKOWSKI et al., 2005; LIMA et al., 2006; PATRAS et al., 2010).

Dentre as principais frutas que contêm antocianinas estão incluídas a amora, as framboesas vermelhas e pretas, a cereja, a groselha, as uvas vermelhas, a romã, a maçã de casca vermelha, a acerola, o jambolão, o açaí entre outras. O teor de antocianinas nestes frutos varia de acordo com a espécie, de forma que algumas frutas são mais ricas nestes compostos que outras. Comparando o teor de antocianinas de diferentes frutos tropicais como acerola (*Malpighia emarginata*), Juçara (*Euterpe edulis*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiri (*Chrysobalanus icaco*), De Brito e colaboradores (2007) observaram que a maior quantidade de antocianina

totais encontrada estava presente no açaí Juçara (290mg/100g de peso fresco). Neste trabalho, também foram analisados os diferentes tipos de antocianinas encontrados no Juçara e observou-se que a antocianina mais frequente foi a cianidina-3-glicosídeo (1358mg/100g de peso seco). Outros estudos ainda indicaram que o Juçara possui maior teor de antocianinas do que o Açaí Amazônico que é amplamente comercializado no Brasil (RIBEIRO et al., 2011; INÁCIO et al., 2013). Kang e colaboradores (2003) encontraram redução de adenomas intestinais em ratos que consumiram extrato de antocianinas em sua dieta. Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Cooke e colaboradores (2006). Considerando que o Juçara é uma rica fonte de compostos fenólicos, ele pode ter um efeito sobre vias de sinalização de detoxificação celular por meio da ativação de enzimas antioxidantes.

## **2.7 Estresse Oxidativo e o Sistema de Defesa Antioxidante**

O estresse oxidativo foi descrito por Sies (1986) como o desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante (ou de defesa), prevalecendo o pró-oxidante. Essa condição é gerada porque as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) podem atuar em várias vias de sinalização celular e levam a um dano celular por meio da oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas, DNA e, conseqüentemente, ao descontrole do sistema redox e ao estresse oxidativo (JONES, 2006; VALKO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; VASCONSELOS et al., 2007;).

Os efeitos biológicos das EROs foram primeiro caracterizados por Henry John Horstman Fenton (1894) demonstrando que a oxidação catalítica de ácido tartárico na presença de sais ferrosos e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi capaz de oxidar biomoléculas. Quarenta anos após a primeira observação do que seria a chamada “Reação de Fenton”, Haber e Weiss (1934) propuseram que, na verdade, o radical hidroxila é a espécie oxidante neste sistema, capaz de oxidar várias classes de compostos orgânicos. Somente em 1971, a produção de peróxido de hidrogênio pode ser medida na respiração mitocondrial de fígados de ratos e coração de pombo (CHANCE e OSHINO, 1971; LOSCHEN et al., 1971).

Sabe-se que EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos pois o oxigênio é necessário para as reações bioquímicas das rotas de geração de energia, sendo essencial para a respiração celular, produção de ATP e manutenção da vida. Cerca de 3 a 5% do oxigênio presente nas células pode diariamente se transformar em radicais livres, como radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Além desta produção endógena, fatores externos como a exposição aos raios UV, radiação ionizantes, quimioterápicos e xenobióticos também podem gerar espécies reativas de oxigênio (VASCONSELOS et al., 2007).

Para combater os efeitos do estresse oxidativo originado pelos radicais livres, o organismo desenvolveu um mecanismo de defesa eficiente, composto por diversos antioxidantes e enzimas com diferentes funções, que permitirão equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs (BEHL e MOOSMANN, 2002). Neste sentido, vários antioxidantes agem de diferentes maneiras a fim de manter o equilíbrio redox do organismo. Os antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação, gerando compostos com baixa ou nenhuma toxicidade (HALLIWEL, 1995; MAGALHÃES et al., 2008; NIKI, 2010; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

O Sistema de Defesa Antioxidante pode atuar em três diferentes frentes, o Sistema de Prevenção, impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais; o Sistema de Varredores, que impede a ação dos radicais livres, o Sistema de Reparo, que atua favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (CLARKSON e THOMPSON, 2000; KOURY e DONANGELO, 2003).

O Sistema de Reparo é composto por várias vias que levam ao reparo do DNA e incluem vias de reparo de bases e quebras na fita simples pela BER (*base excision repair*), reparo de adutos de DNA e grandes lesões pela NER (*nucleotide excision repair*), reconhecimento e reparo de incompatibilidades ou desalinhamentos de segmentos curtos de nucleotídeos pela MMR (*mismatch repair*), reparo direto de adutos de alquila pela MGMT (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) e reparo de quebras de fita dupla (DSBs) pela recombinação homóloga (HR). Cada uma dessas vias emprega vários conjuntos especializados de enzimas e proteínas (SANCAR et al., 2004; KELLEY e FISHEL, 2008; LUO et al., 2010; FUNG e DEMPLE, 2011; RODRIGUES et al., 2013; KAUR et al., 2014).

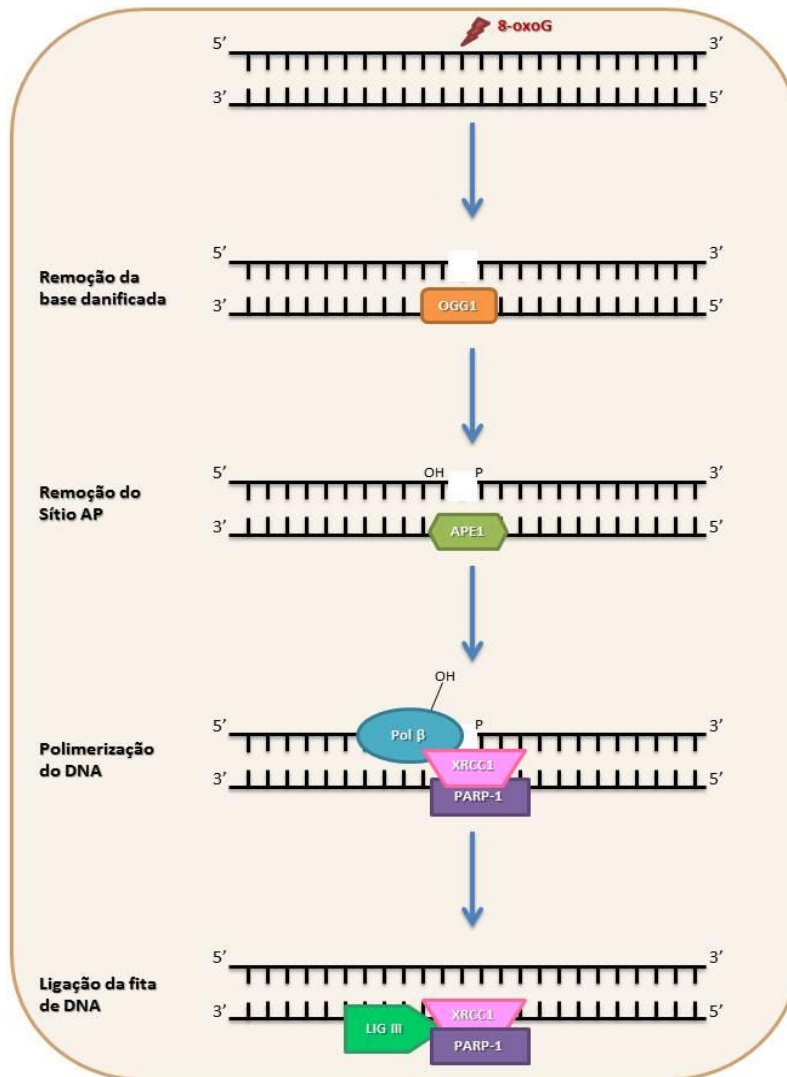


A via de reparo de excisão de base (BER) é a primeira linha de defesa da célula contra danos no DNA que ocorrem por processos como a oxidação, alquilação, desaminação, radiação ionizante e espécies reativas de oxigênio (LUO et al., 2010; KHANNA, 2015). As enzimas que compõem esta via são sensíveis a danos no DNA e algumas delas são tão específicas que sua ativação depende do tipo de lesão que irá ocorrer (SANCAR et al., 2004; ROBERTSON et al., 2009).

A BER inicia-se com o reconhecimento e excisão das bases danificadas por DNA glicosilases específicas, como a OGG1, seguido pela clivagem de ligações N-glicosídicas, formando um sítio abásico (AP). Assim, endonucleases como a APE1 irá promover a excisão do sítio (AP) e recrutar proteínas adicionais para promover a síntese e ligação da fita de DNA (Figura 5) (SANCAR *et al.*, 2004; ROBERTSON *et al.*, 2009).

Existem diversas glicosilases diferentes que apresentam especificidade para substratos específicos. Algumas delas reconhecem um mesmo tipo de substrato. Em eucariotos, a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) é a principal enzima que reconhece e cliva 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina), uma das lesões oxidativas mais estáveis e mutagênicas. Esta enzima ainda excisa outras bases oxidadas como 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) e 8-oxo-7,8-dihydroadenina (8-oxoAde) (DIZDAROGLU et al., 2008).

O sítio AP é utilizado como substrato para a próxima etapa de BER e, sua presença é mais citotóxica e mutagênica do que a lesão removida. Assim, para garantir reparos rápidos e precisos, a maioria das glicosilases permanece ligada ao sítio AP até que enzimas adicionais se liguem e executem a próxima etapa de reparo. Este processo de "transferência de bastão" parece existir para todos os passos de BER assegurando que os intermediários prejudiciais gerados em cada etapa nunca sejam deixados "desacompanhados" (LINDAHL, 1993; VIDAL et al., 2001; GUILLET e BOITEUX, 2002; HEGDE et al., 2010; WILLIAMS e KUNKEL, 2011).



**Figura 5. Via de Reparo por Excisão de Bases (BER).** Esquema simplificado da via curta de excisão de bases mostrando os passos chave e principais proteínas envolvidas no reparo da lesão oxidativa 8-oxoG, que se inicia pela OGG1, uma DNA glicosilase, que libera a base danificada para a formação de um sítio AP. Em seguida, APE1 hidrolisa a ligação fosfodiéster 5' no sítio abásico para formar uma lacuna. Assim, há a inserção do primeiro nucleotídeo pela DNA polimerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) que recrutam DNA ligase III (Lig III), PARP-1 e XRCC1 para promover a ligação da fita de DNA reparada. Adaptado de Patrono et al., (2014).

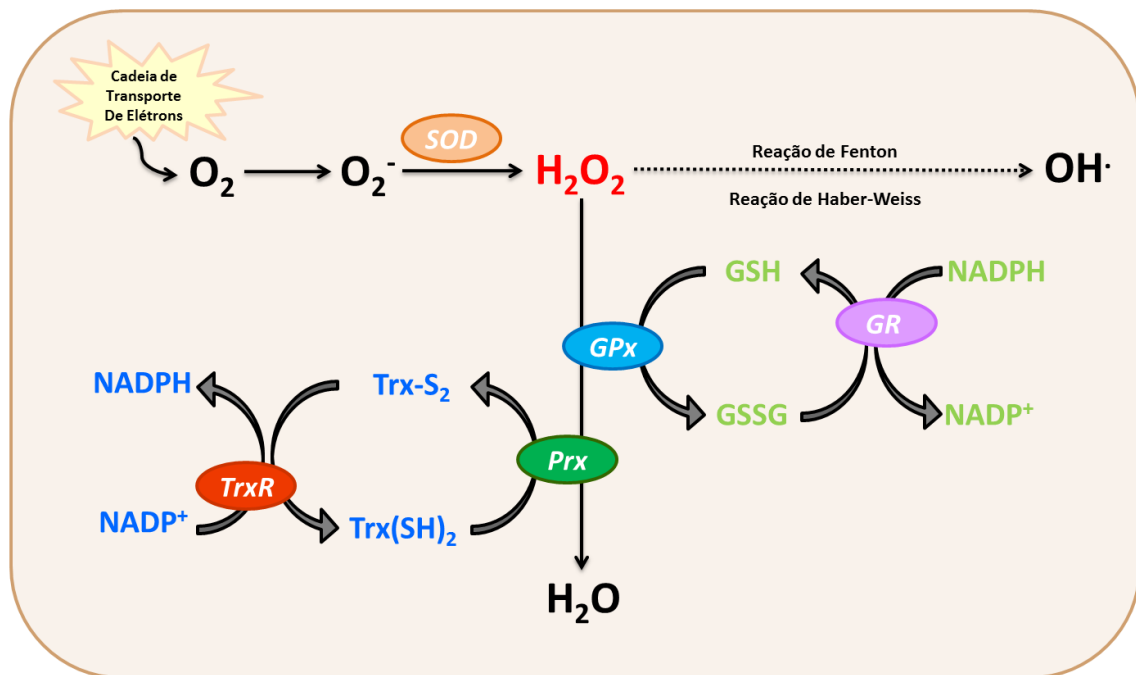
As glicosilases podem ser monofuncionais ou bifuncionais e, no primeiro caso, ocorre a hidrólise das ligações N-glicosídicas gerando um sítio AP que é reconhecido pela enzima APE1/REF1 (*AP endonuclease/Redox Factor 1*) ou simplesmente APE1. Esta enzima processa as extremidades soltas que permanecem após a excisão da lesão por meio da clivagem da fita de DNA, na posição 5' imediatamente após o sítio AP, formando os terminais 5' desoxirribose fosfato (5'dRP) e 3'OH. Além disso, APE1 também recruta proteínas adicionais para

o local a fim de concluir o reparo. Quando a glicosidase é bifuncional, após a hidrólise e formação do sítio AP, a fita de DNA é clivada, na posição 3' imediatamente após o sítio AP, formando um grupamento fosfato ou aldeído  $\beta,\alpha$ -insaturado (PUA), que em seguida, é removido e substituído por uma hidroxila (3'-OH) (HEGDE et al., 2010; LUO et al., 2010; WALLACE et al., 2012; IYAMA e WILSON, 2013; KELLEY et al., 2014).

Os antioxidantes que compõem esse sistema de defesa podem ser classificados conforme sua estrutura molecular, sendo divididos em enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo e não enzimático, fazendo parte deste grupo as vitaminas (A, C e E), carotenóides e outras substâncias, como os flavonóides, hormônios como a progesterona, licopeno e bilirrubina (RAY et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014). O primeiro tipo está presente de forma predominante no meio intracelular, e é formado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), Tiorredoxina (Trx) e glutaciona peroxidase (GPx). Este tipo de sistema de defesa também é o primeiro a agir para evitar o acúmulo de radicais livres (RAHMAN et al., 2006).

O processo de respiração celular leva a produção de oxigênio que será utilizado pelas células para a manutenção da vida. Uma parte deste oxigênio pode se transformar em  $O_2^{\cdot-}$ , radical livre de reatividade moderada, que irá gerar compostos secundários mais reativos. A reação catalisada pela enzima SOD leva a conversão do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , oxidante pouco reativo. De fato, o acúmulo de  $H_2O_2$  possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical livre altamente reativo contra o qual não existe defesa enzimática (figura 6) (KUMAR et al., 2013; RIBAS 2014).

O  $H_2O_2$  será então rapidamente convertido em  $H_2O$  por meio de dois sistemas de defesa, o sistema GPx e o sistema Trx. No primeiro caso, a detoxificação de  $H_2O_2$  ocorre via oxidação, pela enzima GPx, da molécula de GSH que será convertida em GSSG, e esta irá promover ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. O GSSG, por sua vez, será reciclado em GSH pela enzima dependente de NADPH-GSSG redutase (GR). A ação da enzima GR é importante para controlar os níveis de GSSG na mitocôndria (YIN et al., 2011; RIBAS 2014). Por meio do sistema Trx, a Perorredoxina (Prx) oxida  $H_2O_2$  que, por sua vez, reage com o  $Trx-(SH)_2$  que será convertido em  $Trx-S_2$  pela enzima Tiorredoxina redutase (TrxR) na presença de NADPH (figura 6) (RIBAS, 2014).



**Figura 6. Geração de ROS na mitocôndria e o Sistema de Defesa Antioxidante.** Como resultado da fase final do processo de respiração celular libera-se oxigênio pela Cadeia de Transporte de Elétrons. Este  $O_2$  livre, naturalmente ou através da presença de estresse oxidativo, é convertido no radical  $O_2^{\cdot-}$  que será convertido pela SOD em  $H_2O_2$ . Por ser um radical livre, neste momento o sistema de defesa antioxidante irá transformar esta molécula em  $H_2O$  através de dois mecanismos dependentes de NADPH, pela GPx e Prx. Pelo sistema GPx, a conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  ocorre através da oxidação de GSH em GSSG pela GPx, processo esse dependente da enzima GR que utilizará o NADPH como doador de elétrons. Adaptado de Ribas et al. (2014).

Apesar deste complexo sistema de defesa antioxidante, a exposição contínua a xenobióticos, radiação e outros compostos leva ao desequilíbrio do balanço redox, ao acúmulo de EROS e ao estresse oxidativo que pode resultar em lesão ou morte celular e danos nos tecidos (SAGIT et al., 2011). Diversos estudos relacionam a presença de EROs e a desregulação dos sistemas Trx e GPx com várias doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus, esclerose múltipla, cirrose hepática e alguns tipos de câncer (BENHAR et al., 2009; ZHANG e FORMAN, 2012; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

O estresse oxidativo é conhecido por causar aberração cromossômica, danos ao DNA e mutações em genes supressores tumorais (ZIECH et al., 2011; PRESCOTT et al., 2012). Estudos têm mostrado evidências que o estresse oxidativo apresenta papel importante na promoção e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o câncer colorretal. Isso se dá pelo fato de que ROS atuam como segundos mensageiros em cascatas de sinalização intracelular que induzem e mantêm o fenótipo oncogênico de células cancerosas, além de estimular a

proliferação e sobrevivência celular, angiogênese e metástase (VALKO et al., 2006; KILIC et al., 2014; HECHT et al., 2016).

Porém, estudos relataram um dúbio papel de ROS no desenvolvimento de tumores. De acordo com Antelmann e Helmann (2011), o aumento do estresse oxidativo pode induzir as células cancerígenas à morte celular como resultado ao dano irreversível causado ao DNA, lipídios e proteínas, além da modulação de várias vias celulares relacionadas à sobrevivência celular. ROS também está associado à senescência celular e apoptose e pode, portanto, funcionar como fator anti-tumoral. Além disso, a presença de ROS nos tumores potencializa os efeitos da quimioterapia e radioterapia (POPRAC et al., 2017).

Nesse sentido, pesquisas têm se concentrado na identificação de marcadores moleculares para avaliação do estresse oxidativo com o intuito de acelerar o processo de diagnóstico, bem como auxiliar no tratamento e aumentar a sobrevivência do paciente (YIN e XU, 2011; NIKI, 2009; NIKI, 2014).

### 2.7.1 8-guanina DNA glicosilase (OGG1)

O gene *OGG1* humano, localizado no cromossomo 3p25.2, consiste em sete exons e codifica dois tipos da proteína OGG1, a  $\alpha$ -hOGG1 de 345 aminoácidos e, a  $\beta$ -hOGG1 de 424 aminoácidos. A estrutura destas isoformas de OGG1 é similar possuindo os 316 primeiros aminoácidos idênticos e os 30 primeiros aminoácidos na extremidade do terminal amino com um sinal de direcionamento mitocondrial. No entanto, as extremidades do terminal carboxila são completamente diferentes (BOITEUX e RADICELLA, 2000).

A OGG1 é uma das proteínas mais importantes da via de Excisão de Bases tendo papel crucial na manutenção da integridade genômica. Ela é uma DNA-glicosilase com atividade AP-liase que catalisa a remoção da 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina) e da 8-oxoadenina, sendo que a 8-oxoguanina é a base oxidada mais bem estudada. Estima-se que  $10^3$  8-oxoguaninas sejam geradas por dia em células normais e este número pode chegar a  $10^5$  lesões por dia em células de tecidos cancerosos. A oxidação da guanina ocorre como resultado da exposição do DNA a espécies reativas de oxigênio e, a guanina oxidada consegue mimetizar

funcionalmente uma timina pareando com uma adenina, o que provoca uma mutação por transversão GC para TA. Isto ocorre, pois a guanina oxidada pode parear tanto com a citosina como com a adenina, quase que com a mesma frequência. Desta forma, OGG1 é uma das mais importantes enzimas de atuação no reparo ao dano no DNA (BOITEUX e RADICELLA, 2000; SUNAGA et al., 2001; ELAHI et al., 2002; PARK et al., 2007).

Além de catalisar a excisão 8-oxoguanina do DNA, a OGG1 tem atividade AP-liase clivando o sítio abásico. Após a clivagem do sítio AP, os resíduos de desoxirribose e fosfatos são retirados da fita de DNA, pela desoxirribose fosfodiesterase e então, a DNA polimerase reconhece o sítio vazio realizando o reparo com a inserção da base correta. Em seguida, a DNA ligase III e XRCC1 restauram a fita danificada (KLUNGLAND e BJELLAND, 2007; DUAN et al., 2012; KARAHALIL et al., 2012; BA et al., 2014).

Por ser uma enzima crucial para a via de reparo do DNA, estudos relatam que deleção neste gene leva a redução na capacidade celular do reparo de lesões de bases, resultando no acúmulo de danos no DNA o que levaria a célula a vias de apoptose e morte celular. Alterações na expressão de OGG1 foram relacionadas ao desenvolvimento de doenças como Parkinson e câncer de pulmão e mama (PAZ-ELIZUR et al., 2003; FUKAE et al., 2005; OSORIO et al., 2014; XU et al., 2016; CORELLA 2018).

Alguns estudos demonstraram o aumento da expressão de OGG1 nos leucócitos de pacientes com CCR e ainda alta frequência de 8-oxoguanina nas células epiteliais e inflamatórias tanto nos modelos em animais e como nos humanos, neste caso incluindo o estudo de leucócitos e de biópsias de adenocarcinomas colorretais. Estes dados corroboram a afirmativa de que enzimas de reparo de BER estão relacionadas ao processo de carcinogênese, protegendo as células tumorais por meio da manutenção da sua estabilidade genômica e redução da apoptose (LIAO et al., 2008; TUDEK e SPEINA, 2012).

### 2.7.2 *Glutathionas Peroxidases (GPx)*

As Glutathionas peroxidases são uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas, encontradas em todos os tecidos de mamíferos em que ocorrem processos oxidativos. As GPxs fazem parte do sistema de defesa antioxidante prevenindo a produção de ROS e catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos à água ou álcoois correspondentes utilizando duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) como doadores de elétrons (VALKO et al., 2007; MARGIS et al., 2008; BALLATORI et al., 2009; REUTER et al., 2010; SINGH et al., 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Por muitos anos, a presença do selênio como unidade catalítica foi descrita como o fator primordial para a funcionalidade das GPxs tornando a reação de redução mais rápida (URSINI et al., 1995).

Esta teoria foi bem aceita enquanto somente quatro isoformas de GPx foram descritas (GPx1-4). Cada uma delas possui atividade antioxidante em diferentes locais e compartimentos celulares: (a) GPx clássica (GPx1) é encontrada no citossol e mitocôndrias sendo descrita nas células vermelhas, fígado, pulmão e rins; (b) GPx gastrointestinal (GPx2 ou GI-GPx) é encontrada no citosol e no núcleo; (c) GPx citoplasmática (GPx3), também encontrada no citosol e núcleo, está presente em diferentes órgãos como o rim, pulmão, epidídimo, vaso deferente, placenta, vesícula seminal, coração, músculos; (d) GPx fosfolipídica (GPx4 ou PHGPx4) que está presente no núcleo, citosol, mitocôndria e ligado às membranas é também encontrada em diferentes tecidos, reduzindo não somente peróxidos orgânicos e  $H_2O_2$ , mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (CHU et al., 1993; BROWN et al., 2000; HERBETTE et al., 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Com a descoberta das outras quatro GPxs (GPx5-8), foi comprovado que a presença do selênio não era fator determinante para a funcionalidade destas enzimas. A GPx5, contém cisteína no lugar da selenocisteína no centro catalítico da proteína e foi descrita no epidídimo (GHYSELINCK e DUFAURE, 1990). A GPx6, foi identificada em humanos e porcos e é uma selenoproteína encontrada no epitélio olfatório e tecidos embrionários (DEAR et al., 1991; KRYUKOV et al., 2003). A GPx7 foi primeiro caracterizada nos fibroblastos embrionários de ratos e também apresenta cisteína no lugar da selenocisteína em seu centro catalítico. Por sua homologia com a GPx4, a GPx7 também é conhecida como NPGPx (GHYSELINCK

et al., 1990; THISSE et al., 2003; UTOMO et al., 2004; PAPP et al., 2007). A GPx8, localizada no retículo endoplasmático, foi identificada em mamíferos e anfíbios e também contém cisteína no lugar da selenocisteína no centro catalítico da proteína (TOPPO et al., 2008).

Por fazer parte do principal sistema de defesa antioxidante, maior concentração de GPx garante ao organismo maior proteção contra o estresse oxidativo. Alguns estudos correlacionam o aumento da expressão desta proteína ao consumo de vegetais ricos em antocianinas. Isto provavelmente ocorre pelo fato de que os compostos fenólicos como as antocianinas e os ácidos gálico, ferúlico e p-cumárico atuam como ativadores indiretos de um fator de transcrição nuclear, capaz de promover a transcrição dessas enzimas (VICENTE et al., 2011; AL-JASABI et al., 2013; KIM et al., 2014; ZHAO et al., 2015).

Considerando o aumento da expressão de GPx, alguns estudos correlacionam esta superexpressão ao desenvolvimento de tumores, possivelmente por abolir a indução de apoptose mediada por EROs, acelerando a proliferação destas células (LU et al., 1997; MANTOVANI et al., 2003; COX et al., 2006; LI et al., 2009; EMMINIK, 2014). Outros estudos, porém, relatam o efeito protetor de GPx no desenvolvimento tumoral (CHANG et al., 2014; QI et al., 2014; LIU et al., 2015; CHEN et al., 2016).

### *2.7.3 Superóxido Dismutase 1 (SOD1)*

A superóxido dismutase é uma metaloenzima amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos (FRIDOVICH, 1999). Constitui-se importante membro do sistema de defesa antioxidante sendo encontrada em maiores concentrações no citoplasma e também no núcleo e espaço intermembranar da mitocôndria (PAPA et al., 2014). A SOD1 é uma das classes de enzimas mais conservadas ao longo da evolução, correspondendo a 1% do total de proteína celular (OKADO-MATSUMOTO e FRIDOVICH, 2001).

Em 1969, McCord e Fridovich descobriram a capacidade da cupreína em catalisar a transformação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Esta reação de oxirredução é distribuída em duas etapas com ciclagem do átomo de cobre (FRANCO et al., 2013). Até então, a cupreína e suas correlatas



eram consideradas simplesmente proteínas para o armazenamento de cobre. Foi a partir do trabalho de McCord e Fridovich que a atividade enzimática da cupreína foi determinada em diferentes tecidos, modificando seu nome para SOD1, bem como outras enzimas antioxidantes foram descobertas (FRIDOVICH, 1999). Nos anos seguintes, cientistas identificaram o íon zinco na estrutura da enzima que, a partir de então ficou também conhecida como Cobre/Zinco-Superóxido Dismutase (Cu/ZnSOD) (CARRICO e DEUTSCH, 1970).

Em humanos, o gene *SOD1* está localizado no cromossomo 21q22.11 e produz uma enzima homodimérica relativamente pequena, de 153 aminoácidos, 32 kDa, em que cada subunidade é formada da ligação de um íon cobre e um íon zinco ligados entre si por uma ponte de histidina (SON e ELLIOT, 2014; SHENG et al., 2014). O íon zinco tem o papel estrutural de manutenção conformacional das subunidades e, o íon cobre constitui o elemento catalítico da proteína, responsável pelas reações de transformação do radical superóxido (VALENTINE et al., 2005; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; NAKAMURA et al., 2017).

Em mamíferos existem três SODs com diferentes localizações celulares, que são classificadas de acordo com o cofator inorgânico ligado a região protéica. Cu/Zn-SOD ou SOD1 está localizada no citosol e espaço intermembranar da mitocôndria; a Mn-SOD ou SOD2, por sua vez, se localiza na matriz mitocondrial e a Fe-SOD ou SOD3 está localizada na matriz extracelular (FUKAI e USHIO-FUKAI, 2011). A localização subcelular da atividade das SODs é importante, pois contribui para a geração sítio-específica da molécula de sinalização  $H_2O_2$  (MARTCHENKO et al., 2004; SUZUKI et al., 2013).

De forma não surpreendente, distúrbios na função das isoformas de SOD estão relacionados a algumas doenças como o câncer. Redução da expressão de SOD é observada em alguns estudos como o relatado para carcinoma hepatocelular (CASARIL et al., 1994), câncer colorretal (VAN DRIEL et al., 1997) e câncer gástrico (WANG et al., 2005).

Por outro lado, a constante exposição das células tumorais ao estresse oxidativo gera aumento na expressão de SOD (KOHEN e NYSKA, 2002) quando comparado ao grupo controle, o que foi observado para câncer colorretal (SKRZYDLEWSKA et al., 2005; TAGUCHI et al., 2015), de pâncreas (CRNOGORAC-JURCEVIC et al., 2002), de pulmão (SOMWAR et al., 2011), de próstata (JUNG et al., 1997), e mama (AIRD et al., 2012).

Pode-se observar ainda expressão diferenciada em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral. No estudo realizado por Amaral e colaboradores (2006) em modelo experimental de carcinogênese colorretal, observou-se um aumento da expressão de SOD1 nos focos de criptas aberrantes, estágios iniciais da lesão da mucosa colorretal, mostrando que a atividade dessa enzima aumenta quando lesões pré-cancerígenas são instaladas, uma vez que, neste estágio há uma grande exposição das células ao estresse oxidativo. No entanto, observa-se que, nos estágios mais avançados do desenvolvimento e diferenciação do tumor há redução das EROs levando a uma menor expressão de SOD indicando adaptação das células tumorais do câncer colorretal ao estresse oxidativo (SKRZYCKI et al., 2009).

Estudos como inibidores de SOD1 demonstraram que esta proteína tem importante papel na progressão tumoral. Na presença destes inibidores, houve redução dos efeitos mediados pela inflamação na progressão do tumor e metástase de células de fibrossarcoma, bem como o crescimento e a proliferação de células de câncer de próstata (OKADA et al., 2006; LIN et al., 2013).

Como observado, uma série de eventos bioquímicos e adaptativos podem ser afetados tanto pelo desenvolvimento neoplásico, quanto pela ingestão de alimentos ricos em substâncias bioativas. Desta forma, entender o efeito da polpa do Juçara na regulação e ativação das vias de citoproteção e reparo do DNA auxilia nos estudos que tornam essas vias alvos moleculares promissores para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento do câncer, inclusive os que acometem o sistema digestivo como o câncer colorretal, e abre caminho para estudos sobre ativadores farmacêuticos. Pesquisas acerca deste conhecimento se fazem de suma importância para a geração de novas fontes diagnósticas, preventivas e terapêuticas, principalmente as envolvidas com estresse oxidativo.

**CAPÍTULO I: Suplementação com polpa do fruto juçara (*Euterpes edulis* Martius): efeito sobre Focos de Criptas Aberrantes e desenvolvimento tumoral em modelo de carcinogênese colorretal**

Artigo não submetido.

**Título: Suplementação com polpa do fruto juçara (*Euterpes edulis Martius*): efeito sobre Focos de Criptas Aberrantes e desenvolvimento tumoral em modelo de carcinogênese colorretal**

Authors and affiliations: Cinthia Vidal Monteiro da Silva Couto<sup>1</sup>, Leandro André Milholi<sup>1</sup>, Aline Ribeiro Borçoi<sup>1</sup>; Juliana Dalbó<sup>1</sup>, Schalana Oliveira dos Reis<sup>1</sup>, Tamires Conceição da Luz<sup>1</sup>; Mayara Mota de Oliveira<sup>1</sup>; Joaquim Gasparini dos Santos<sup>1</sup>; Gabriela Tonini Peterle<sup>1</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Lucas Lima Maia<sup>1</sup>, Jankerle Neves Boeloni, Adriana Madeira Álvares da Silva<sup>1</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.

**Resumo:** Substâncias antioxidantes presentes nos alimentos podem agir como um fator de proteção contra o desenvolvimento do câncer colorretal reduzindo a formação de focos de criptas aberrantes (FCA). O Juçara (*Euterpe edulis Martius*) possui alto valor energético e consideráveis níveis de compostos antioxidantes, como as antocianinas. Desta forma, objetivou-se com este estudo analisar os efeitos da suplementação com produto à base da polpa do fruto Juçara sobre os FCA, bem como o desenvolvimento de neoplasias colorretais em modelo experimental. A indução carcinogênica ocorreu com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em 38 animais que foram distribuídos em 3 grupos, Grupo induzido a carcinogênese (DMH+/Juçara-), contendo 12 animais, Grupo suplementado com o suco do Juçara (DMH+/Juçara+), com 10 animais, Grupo suplementado com o extrato do Juçara (DMH+/Extract), contendo 6 animais. Os outros 10 animais foram mantidos como controle negativo (DMH-/Juçara-). A suplementação com suco e extrato liofilizado ocorreu três vezes por semana por gavagem, até completarem 10 semanas. Na 10ª semana, quatro animais do grupo dos grupos DMH-/Juçara-, DMH+/Juçara- e DMH+/Juçara+ e dois animais do grupo DMH+/Extract foram eutanasiados para análise das lesões pré-neoplásicas. E, na 23ª semana os demais animais de todos os grupos foram eutanasiados para a retirada das lesões maiores que 0,1 centímetros, que foram fixadas, processadas histologicamente e coradas com hematoxilina-eosina para diagnóstico tumoral. Houve redução significativa no número de focos de criptas aberrantes no grupo DMH+/Juçara+ em relação ao grupo DMH+/Juçara- ( $p=0,0054$ ). Da mesma forma, análise considerando focos iguais ou inferiores a 3 criptas ( $p=0,0381$ ) e superiores a 3 criptas ( $p=0,0024$ ) também apresentaram redução significativa no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado ao grupo DMH+/Juçara-. Em relação ao número de lesões neoplásicas, no grupo DMH+/Juçara- predominou as lesões benignas (20/39), seguida das lesões malignas (16/39) e encontrou-se lesões displásicas, benignas e malignas classificadas como adenocarcinoma tubular e adenocarcinomas de células em anel em cinete e inflamação branda a moderada e pleomorfismo moderado. Nos grupos DMH+/Juçara+ e DMH+/Juçara Extract encontraram lesões displásicas, benignas e malignas, classificadas como adenocarcinoma tubular e adenocarcinomas de células em anel em cinete. Com base nos resultados, a ingestão de polpa do fruto Juçara apresenta atividade antitumoral nos estágios iniciais da carcinogênese colorretal em modelo animal abrindo novas possibilidades para seu uso na suplementação dietética.

**Palavras-chave:** antioxidantes, flavonoides, modelo animal, Tumorigênese colorretal, focos de criptas aberrantes.

## 1 INTRODUÇÃO

O Açaí Juçara (*Euterpe edulis* Martius) é uma palmeira nativa da Mata Atlântica, encontrada nos remanescentes desta Floresta do Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, podendo também ser encontrado no Paraguai e na Argentina (SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2008). Ela produz pequenos frutos que possuem alto valor energético e consideráveis níveis de compostos fenólicos, como as antocianinas. Os compostos fenólicos são importantes devido sua atividade antioxidante que evita ou atrasa a oxidação eliminando os radicais livres (BATAGLION et al., 2014).

Além da capacidade antioxidante, as antocianinas podem promover vários benefícios à saúde, como capacidade anti-inflamatória, vasodilatadora e antimicrobiana (FREGONESI et al., 2010; HE e GIUSTI, 2010; PATRAS et al., 2010; TSUDA, 2012). Segundo Moraes (2019), as antocianinas atuam no tecido intestinal tumoral suprimindo a proliferação de células epiteliais anormais, induzindo a apoptose mediada por mitocôndrias e inibindo a invasão e metástase tumoral. Estudos com o uso de extratos de açaí encontraram resultados muito expressivos de redução da progressão tumoral com o uso de extratos do alimento (CHOI et al., 2017; FRAGOSO et al., 2018).

O câncer representa importante problema de saúde pública, estima-se que em 2018 e 2019 ocorrerão 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer colorretal é o terceiro mais incidente na população brasileira, sendo superado em incidência apenas pelos tumores de pulmão e mama (LABIANCA et al., 2013; TORRE et al., 2015, WHO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde, até 2030, essas taxas devem aumentar em 60%, para mais de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes (ARNOLD et al., 2017).

O processo de tumorigênese colorretal é iniciado por mutações genômicas que culminam com o surgimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) que são alterações morfológicas nas criptas de Lieberkühn caracterizadas por aberturas terminais anormais, tamanho maior que as criptas adjacentes e espessamento epitelial com células proeminentes (CHENG e LAI, 2003). Em seguida, ocorre sucessão de mutações adicionais com a progressão eventual de um pequeno subconjunto de adenomas convencionais para carcinoma com estádios intermediários mostrando graus crescentes de displasia e, conseqüentemente, no

carcinoma *in situ* (SAHA et al., 2002; SNOVER, 2011; HABR-GAMA et al., 2012). Dados da literatura mostram redução na carcinogênese colorretal utilizando produtos à base de açaí amazônico (FRAGOSO et al., 2013; ROMUALDO et al., 2015).

Considerando que o açaí Juçara, alimento funcional rico em compostos fenólicos, possui um maior teor de antocianinas que o açaí amazônico e que seu consumo é crescente na população brasileira, o objetivo deste trabalho é avaliar se a ingestão do açaí Juçara atuaria no controle do estresse oxidativo, levando a redução do desenvolvimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e lesões neoplásicas em modelo experimental de carcinogênese colorretal.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Polpa de açaí Juçara**

Foi utilizado um único lote de polpa de açaí Juçara, isenta de corantes e conservantes, adquirido de um produtor da região Sul do Estado do Espírito Santo. 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 Bromatológicas do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAUE-UFES).

### **2.2 Extração e Quantificação de Antocianinas**

A extração e quantificação de antocianinas ocorreram de acordo com a metodologia adaptada de Francis e colaboradores (1982). Para a extração, 20g de polpa do Açaí Juçara foram diluídos em 200mL de álcool de cereais 70% e o ajuste de pH para 2,5 foi realizado com ácido cítrico. A solução foi deixada por 2 horas na geladeira no escuro a uma temperatura de 4°C e, em seguida, foi filtrada e armazenada no escuro à temperatura de 4°C até a quantificação e utilização.

A quantificação das antocianinas foi realizada através do método de pH diferencial em espectrofotômetro (Thermo) utilizando dois tampões diferentes, o Tampão de Cloreto de Potássio 0,025M (pH 1,0) e o Tampão de Acetato de Sódio 0,4M (pH 4,5). Foram realizadas diluições do extrato de antocianinas nas proporções de 1:10 e 1:25 para cada um dos dois tampões e todas as soluções foram lidas nos comprimentos de onda de 510nm e 700nm (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados das leituras em triplicata dos tampões de Cloreto de Potássio (pH 1,0) e Acetato de Sódio (pH 4,5) nas diluições de 1:10 e 1:25 para quantificação de antocianinas.

DILUIÇÃO	TAMPÃO	LEITURAS	VALORES OBTIDOS	MÉDIA
1:10	Cloreto de Potássio (pH 1,0)	510 nm	0,674	0,663
			0,671	
			0,644	
	Acetato de Sódio (pH 4,5)	700 nm	0,018	0,016
			0,014	
			0,017	
1:25	Cloreto de Potássio (pH 1,0)	510 nm	0,198	0,172
			0,123	
			0,197	
	Acetato de Sódio (pH 4,5)	700 nm	0,011	0,025
			0,025	
			0,040	
1:25	Cloreto de Potássio (pH 1,0)	510 nm	0,363	0,349
			0,364	
			0,320	
	Acetato de Sódio (pH 4,5)	700 nm	0,016	0,012
			0,010	
			0,010	
Cloreto de Potássio (pH 1,0)	510 nm	0,101	0,106	
		0,095		
		0,124		
Cloreto de Potássio (pH 1,0)	700 nm	0,014	0,012	
		0,092		
		0,011		

Em seguida, os valores medidos pelo espectrofotômetro foram utilizados na equação 1 para quantificar as antocianinas totais presentes neste extrato, como segue:

$$AT = \left[ \left( \frac{(Abs_{510} - Abs_{700}) \text{ pH } 1,0 \times 1000 \times PM \times fd}{\Sigma} \right) \times 100 \right]$$

onde;

AT são as antocianinas totais expressas em mg;

Abs<sub>510</sub> é a absorvância do extrato filtrado lida à 510nm;

Abs<sub>700</sub> é a absorvância do extrato filtrado lida à 700nm;

1000 é conversão de gramas para miligramas;



PM é o peso molecular da cianidina-3-glucosídeo (449,2 g/mol);

fd é o fator de diluição dado pela razão entre o volume final da solução após a adição do tampão e pelo volume da alíquota da amostra;

$\Sigma$  é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosídeo em solução etanólica acidificada à 535nm, cujo valor é 26900L/cm.mg;

100 é utilizado para expressar o valor por 100 gramas de amostra.

Após a quantificação das Antocianinas totais, foi quantificada a quantidade de antocianinas monoméricas (AM) do extrato por meio da equação 2:

$$AM = AT - \left[ \left( \frac{(Abs_{510} - Abs_{700})_{pH\ 4,5} \times 1000 \times PM \times fd}{\Sigma} \right) \times 100 \right]$$

A partir do resultado das quantificações, determinou-se a quantidade de antocianinas presente na polpa e ainda o volume de extrato e polpa a serem administrados nos animais.

Desta forma, utilizando os valores das médias e aplicando as equações 1 e 2 foi possível chegar a uma quantidade de 535,39 mg/g de antocianina totais e 413,79 mg/g de cianidina 3-glicosídeo.

Após o processo de extração, o extrato alcoólico obtido foi submetido ao processo de retirada do álcool no rotaevaporador à 60°C e protegido da luz. Em seguida o extrato foi liofilizado.

### 2.3 Aspectos Éticos

Os animais usados neste 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.

## 2.4 Modelo Experimental

O experimento utilizou 38 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos jovens, pesando em média 181 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 28 animais e 10 animais foram mantidos como grupo controle negativo (intestino normal). A indução ocorreu conforme metodologia modificada por Laranjeira 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, uma vez por semana, por um período de cinco semanas, na dose final de 240mg/kg.

Durante o processo de indução e promoção do câncer colorretal, os animais induzidos à carcinogênese foram divididos em quatro grupos experimentais, a saber:

- Grupo controle negativo DMH-/Juçara- = 10 animais;
- Grupo controle positivo DMH+/Juçara- = 12 animais;
- Grupo DMH+/Juçara+ = 10 animais;
- Grupos DMH+/Juçara Extract = 6 animais;

A suplementação com o açaí Juçara ocorreu uma semana após o término da indução da neoplasia. O suco do Juçara e o extrato foram disponibilizados três vezes por semana, por gavagem, até completarem as 23 semanas. O suco foi preparado na proporção de uma parte de polpa para nove de água, sendo preparados 60 mL de suco de forma que cada animal consumiu o suco a uma concentração de 0,3%. O extrato foi administrado diluído em água filtrada na proporção de 1:10.

Na 10ª semana dois animais do grupo DMH+/Juçara Extract e cinco animais dos demais grupos foram eutanasiados para contagem dos focos de criptas aberrantes. E, na 23ª semana quatro animais do DMH+/Juçara Extract, cinco animais dos grupos DMH-/Juçara- e DMH+/Juçara+ e sete animais do grupo

DMH+/Juçara- foram eutanasiados para análise das lesões e expressão proteica. Este processo de eutanásia ocorreu por meio da indução anestésica com a associação de ketamina (75mg/Kg) + xilasina (6mg/Kg), seguido da aplicação de cloreto de potássio hipersaturado. Os animais foram necropsiados e tiveram toda a extensão do intestino grosso aberto pela inserção do mesentério para a retirada das do intestino para análise dos focos de criptas aberrantes e lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção.

Os tecidos coletados foram fixados em formalina 10% tamponada e submetidos ao processamento rotineiro de inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina-eosina para análise e diagnóstico das lesões.

Todas as amostras dos grupos experimentais, com exceção do grupo controle negativo (intestinos normais) foram diagnosticadas de acordo com Perse e Cerar (2011). Nas amostras pertencentes aos Grupos DMH+/Juçara- , DMH+/Juçara+ e DMH+/Juçara Extract foram avaliadas as seguintes características histopatológicas: processo inflamatório (tipo e intensidade), pleomorfismo celular (intensidade), figuras de mitose (ausente,  $\leq 3/\text{campo}$ ,  $> 3/\text{campo}$ ), 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).

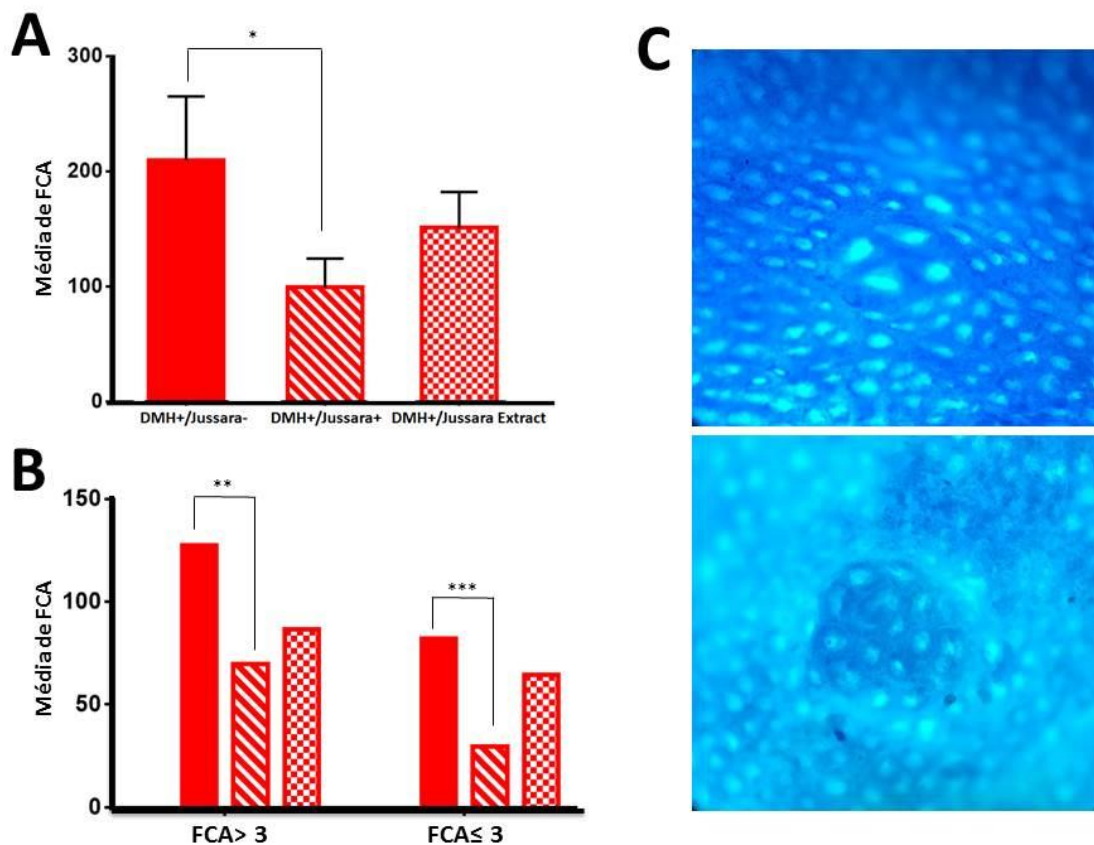
## 2.6 Estatística

Os dados referentes aos focos de criptas aberrantes, número de lesões macroscópicas encontradas na mucosa colorretal, bem como as características histopatológicas foram analisados utilizando o teste ANOVA para um critério, seguido pelo teste t de Student. Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada com o software BioEstat 5.3 e as figuras desenvolvidas no software GraphPad Prism 6 Demo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise do número de Focos de Criptas Aberrantes

A análise do número focos de criptas aberrantes foi realizada nos grupos induzidos ao câncer (DMH+/Juçara-), nos grupos suplementados com o Juçara (DMH+/Juçara+), com o extrato (DMH+/Juçara Extrato) e ainda no controle negativo (DMH-/Juçara-). Na figura 1 observa-se imagem de FCA encontrados no intestino grosso dos ratos submetidos ao protocolo de indução de câncer com DMH.



**Figura 1.** Número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) em modelo experimental de carcinogênese colorretal. **A)** O número médio de FCA encontrado na mucosa colorretal de ratos suplementados com Juçara (DMH+/Juçara+) foi significativamente menor que em ratos não suplementados (DMH+/Juçara-) ( $p=0,0054$ ). **B)** Comparação do número de FCA com menos de três criptas ( $FCA \leq 3$ ) e mais de três criptas ( $FCA > 3$ ). Note a redução no número de  $FCA > 3$  ( $p=0,0024$ )\*\* e  $FCA \leq 3$  ( $p=0,0381$ )\*\*\* no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado com o grupo controle positivo (DMH+/Juçara-). **C)** Fotomicrografia de mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina corada com azul de metileno e evidência de focos de criptas aberrantes.

Os Focos de Criptas Aberrantes são considerados biomarcadores para o câncer colorretal, pois são as primeiras alterações detectáveis no intestino de modelos animais quimicamente induzidos à carcinogênese (BIRD, 1987; ALRAWI et al., 2006; KHARE et al., 2006). Além disso, devido à similaridade genética encontrada entre os mecanismos de desenvolvimento de FCA de roedores e humanos, estas lesões pré-neoplásicas podem ser utilizadas para estudos de prevenção, rastreamento e detecção de fatores de risco e de proteção associados progressão ou recorrência do câncer colorretal (CORPET e PIERRE, 2005; FEMIA e CADERNI, 2008).

Por isso, a quantificação do número de criptas é um importante fator para análise do desenvolvimento das lesões, uma vez que, o surgimento e aumento do número e tamanho dos FCA parecem ser processos de divisão da própria cripta, ou seja, origem clonal (CHENG e LAI, 2003; TAKAYAMA et al., 2005; GUPTA e SCHOEN, 2009).

Os grupos de tratamento, controle positivo (DMH+/Juçara-), o grupo suplementado com suco de Juçara (DMH+/Juçara+) e o que recebeu o extrato de Juçara (DMH+/Juçara Extract) foram comparados (Figura 1) quanto à presença de criptas aberrantes. Na análise de focos totais, os resultados mostraram uma redução significativa no número total de focos no grupo DMH+/Juçara+ quando comparado ao grupo DMH+/Juçara- ( $p=0,0054$ ).

A análise das criptas aberrantes, considerando lesões pré-neoplásicas com mais de 3 criptas, mostraram diferenças significativas, com valores menores no grupo suplementado com suco (DMH+/Juçara+) quando comparado com o grupo DMH+/Juçara- ( $p=0,0024$ ). Da mesma forma, as análises considerando focos iguais ou inferiores a 3 criptas mostraram diferenças entre os dois grupos, o suplementado com suco (DMH+/Juçara+) e o controle positivo (DMH+/Juçara-) ( $p=0,0381$ ).

As análises dos grupos DMH+/Juçara- e DMH+/Juçara Extract não mostraram diferenças significativas ( $p=0,2721$ ).

Os achados do presente trabalho, que observou redução do número de criptas aberrantes entre os grupos suplementados com suco de Juçara e não suplementados são compatíveis com a ideia da presença dos biocompostos protetores ou bioativos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais encontrados nesse tipo de açaí (HOGAN et al., 2009; RUFINO et al., 2010; PAZ et al., 2015).

Segundo a literatura, 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).

Os resultados descritos na Tabela 2 mostram uma redução significativa do grupo DMH+/Juçara+ quanto ao número das lesões pré-neoplásicas com número de criptas inferior ou igual a três (FCA  $\leq$  3 = 45,49%), foco com mais de três criptas (FCA > 3 = 64,02%) e ainda nos FCA totais (52,74%), quando comparado com o grupo DMH+/Juçara-. Por sua vez, o grupo DMH+/Juçara Extract apresentou uma menor redução do percentual de FCA totais (27,9%), das lesões pré-neoplásicas com mais de três criptas por foco (FCA > 3 = 21,34%) e ainda no número de criptas inferior ou igual a três (FCA  $\leq$  3 = 32,15%). Estes resultados corroboram com o encontrado por Fragoso e colaboradores (2013) que observaram que a suplementação com o açaí amazônico atenuou em 41% a formação de lesões pré-neoplásicas induzidas por dimetilhidrazina.

**Tabela 2.** Média e Percentual de Redução dos focos de cripta aberrante (FCA) nos grupos experimentais induzidos ao câncer e suplementados com açaí Juçara e seu extrato.

Nº de Focos	DMH-/Juçara-		DMH+/Juçara-		DMH+/Juçara+		DMH+/Juçara Extract	
	Média	Redução (%)	Média	Redução (%)	Média	Redução (%)	Média	Redução (%)
<b>Totais</b>	0	0	209,5	0	99	52,74	151	27,9
<b>&gt; 3 criptas</b>	0	0	82	0	29,5	64,02	64,5	21,34
<b><math>\leq</math> 3 criptas</b>	0	0	127,5	0	69,5	45,49	86,5	32,15

Ainda, estudos realizados com outras frutas vermelhas como o mirtilo, a amora e o oxicoco também mostraram uma redução significativa no número de focos de criptas aberrantes em ratos induzidos à carcinogênese com azoximetano (BOATENG et al., 2007). Lala e colaboradores (2006), em seus estudos observaram uma redução significativa ( $p < 0,005$ ) no número de FCA em ratos suplementados com extratos ricos em antocianina originados de uva, boldo e arônia.

A literatura relata o efeito protetor da antocianina, por isso o estudo foi estruturado com um dos grupos suplementados com extrato liofilizado de antocianina. No entanto a comparação dos resultados das análises entre os grupos DMH+/Juçara+ e DMH+/Juçara Extract, em relação ao número de focos de criptas aberrantes mostrou um maior efeito do suco na fitoproteção do que do extrato

liofilizado de antocianina. O suco do Juçara é um alimento rico em fibras, vitaminas e compostos antioxidantes que atuam em sinergismo para promover esta fitoproteção.

Desta forma, na comparação entre a suplementação com suco integral e com o extrato de antocianina, houve diferença entre os valores percentuais das reduções de FCA apresentados na Tabela 2, observou-se que a redução de criptas do grupo suplementado com suco (DMH+/Juçara+) foi maior que a promovida pelo uso de extrato liofilizado (DMH+/Juçara Extract). Esta diferença no percentual de redução entre o grupo que consumiu o suco integral de Juçara e aquele que consumiu somente o extrato indica que outros compostos bioativos presentes no fruto possam exercer um papel citoprotetor no intestino dos animais estudados.

Estes achados estão de acordo com os estudos realizados com o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) que observaram que o uso do suco integral do fruto reduziram a proliferação de célula leucêmica HL-60 e colón HT-29 (POZO-INSFRAN et al., 2006; JING et al., 2008; PACHECO-PALENCIA et al., 2008).

Classicamente, o composto N-acetilcisteína é relatado na literatura como um composto antioxidante e anticarcinogênico, capaz de reduzir focos de criptas aberrantes e tumores. Desta forma é comum a comparação dos achados da literatura com essa substância. No presente trabalho, o açaí Juçara apresentou um efeito inibitório sobre o desenvolvimento dos FCA semelhante aos encontrados com a N-acetilcisteína (DE FLORA et al., 1986; ROSTEIN e SLAGA, 1988; REDDY et al., 1993; DE FLORA et al., 2001; SERIL et al., 2002; AMROUCHE-MEKKIOUI e DJERDJOURI, 2012).

### **3.2 Avaliação do número e características histopatológicas de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental para câncer colorretal, suplementados e não suplementados com açaí Juçara**

Na análise do número de lesões dos animais estudados foi observado que o Grupo DMH+/Juçara- apresentou 39 lesões, com média de 5,5 lesões por animal, com no mínimo quatro lesões por animal, e no máximo de nove. No Grupo DMH+/Juçara+ foram encontradas 42 lesões, com uma média de 8,4 lesões por animal, no mínimo duas e no máximo seis. No grupo DMH+/Juçara Extract foram encontradas 29 lesões, com uma média de 7,25 lesões por animal, com no mínimo

de seis lesões por animal e máximo de oito. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa no número de lesões nos três grupos de tratamento ( $p=0,2543$ ).

Em relação às características histopatológicas avaliadas nos grupos de tratamento, a Tabela 3 resume o número e percentual encontrados em adenocarcinoma tubular colorretal.

No Grupo DMH+/Juçara- foram encontradas 20 lesões benignas (51,28%), 16 (41,02%) lesões foram classificadas como malignas e três (7,69%) como displasias. A inflamação mononuclear foi a mais predominante nas amostras neste grupo. Todas as lesões malignas foram classificadas como adenocarcinoma tubular e duas delas apresentaram invasão perineural e nenhuma apresentou invasão linfática e sanguínea.

Em relação ao Grupo DMH+/Juçara+, foram encontradas 12 lesões benignas (28,57%) 23 (54,76%) lesões foram classificadas como malignas e sete (16,66%) como displasias. As lesões malignas corresponderam a 15 adenocarcinomas tubulares e oito adenocarcinomas de células em anel em cinete. Além disso, as análises mostraram uma predominância de inflamação mononuclear nos tumores observados. As lesões também apresentaram pleomorfismo e inflamação brandas a moderadas bem como características histopatológicas compatíveis com lesões em humanos.

A análise histopatológica dos tumores do grupo DMH+/Juçara+, em relação à invasão, do total de 42 amostras analisadas, 14 amostras apresentaram invasão submucosa (33,33%) e destas, houve invasão perineural em uma amostra e três apresentaram invasão submucosa e perineural, sendo classificadas como adenocarcinomas de células em anel em cinete.



**Tabela 2.** Descritivo em número e percentual das características histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal de ratos induzidos a carcinogênese pertencentes aos grupos DMH+/Juçara-, DMH+/Juçara+ e Grupo DMH+/Juçara Extract.

Inflamação	DMH+/Juçara-	DMH+/Juçara+	DMH+/Juçara Extract
	Adenocarcinoma Tubular Colorretal n (%)	Adenocarcinoma Tubular Colorretal n (%)	Adenocarcinoma Tubular Colorretal n (%)
Branda	0 (0%)	4 (26,67%)	0 (0%)
Moderada	7 (43,75%)	8 (53,33%)	9 (90%)
Severa	9 (56,25%)	3 (20%)	1 (10%)
<b>Pleomorfismo</b>			
Ausente	2 (12,50%)	5 (33,33%)	0 (0%)
Brando	1 (6,25%)	3 (20%)	0 (0%)
Moderado	10 (62,50%)	6 (40%)	6 (60%)
Severo	3 (18,75%)	1 (6,67%)	4 (40%)
<b>Mitose</b>			
Ausente	1 (6,25%)	2 (13,33%)	0 (0%)
< 3 campos	15 (93,75%)	12 (80%)	10 (100%)
> 3 campos	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)
<b>Invasão Submucosa</b>			
Ausente	3 (18,75%)	4 (26,67%)	4 (40%)
Presente	13 (81,25%)	11 (73,33%)	6 (60%)
<b>Invasão Perineural</b>			
Ausente	2 (12,50%)	13 (86,67%)	9 (90%)
Presente	14 (87,50%)	2 (13,33%)	1 (10%)
<b>Invasão Linfática</b>			
Ausente	16 (100%)	15 (100%)	10 (100%)
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Invasão Sanguínea</b>			
Ausente	16 (100%)	15 (100%)	10 (100%)
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Desmoplasia</b>			
Ausente	11 (68,75%)	11 (73,33%)	4 (40%)
Presente	5 (31,25%)	4 (26,67%)	6 (60%)
<b>Debris Glandular</b>			
Ausente	2 (12,50%)	1 (6,67%)	0 (0%)
Presente	14 (87,50%)	14 (93,33%)	10 (100%)
<b>Necrose</b>			
Ausente	15 (93,75%)	4 (26,67%)	9 (90%)
Presente	1 (6,25%)	11 (73,33%)	1 (10%)
<b>Percentual Glandular</b>			
>95%	1 (6,25%)	5 (33,33%)	2 (20%)
50-95%	8 (50%)	1 (6,67%)	4 (40%)
<50%	7 (43,75%)	9 (60%)	4 (40%)
<b>Grau de Diferenciação</b>			
Pouco diferenciado	7 (43,75%)	9 (60%)	4 (40%)
Moderadamente diferenciado	8 (50%)	1 (6,67%)	4 (40%)
Bem diferenciado	1 (6,25%)	5 (33,33%)	2 (20%)
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>10</b>

Em relação ao Grupo DMH+/Juçara Extract, foram encontradas 14 lesões benignas (48,27%), 10 (34,49%) lesões foram classificadas como malignas e cinco (17,24%) como displasias. As lesões malignas corresponderam a 10 adenocarcinomas tubulares e uma foi classificada como adenocarcinoma de células em anel em cinete. Neste grupo, oito amostras apresentaram invasão submucosa sendo seis classificadas como adenocarcinoma tubular e duas amostras classificadas como adenocarcinomas de células em anel em cinete.

Do total de lesões malignas no grupo DMH+/Juçara Extract, todas as lesões consideradas bem diferenciadas (2/11) e moderadamente diferenciadas (4/11) foram classificadas como adenocarcinoma tubular. Entre as lesões pouco diferenciadas, quatro (4/11) foram classificadas como adenocarcinoma tubular e uma (1/11) foi classificada como adenocarcinomas de células em anel em cinete.

Além disso, o protocolo utilizando 1,2-dimetilhidrazina (DMH) induziu, como esperado, lesões macroscópicas tanto no grupo DMH+/Juçara- quanto nos grupos DMH+/Juçara+ e DMH+/Juçara Extract, as quais foram possíveis de diagnosticar por meio da histopatologia. Estudando a associação de uma simples dose de 1,2-dimetilhidrazina como pró-carcinógeno seguido de colite ulcerativa crônica, Wang e colaboradores (2004) encontraram alta incidência de displasia e câncer colorretal.

Desta forma, o modelo experimental com 1,2-dimetilhidrazina utilizado neste estudo, permitiu encontrar lesões com características histopatológicas semelhantes às encontradas em neoplasias colorretais em humanos e que também podem favorecer estudos moleculares e de expressão proteica. O DMH é utilizado como protocolo padrão de indução da carcinogênese em diversos laboratórios e seu uso permite o estudo de interações intergênicas, epigenéticas e do processo de desenvolvimento tumoral que vai de alterações pré-neoplásicas até tumores para fins morfológicos, moleculares ou terapêuticos (BALMAIN e HARRIS, 2000; SUMAN et al., 2012; JOHNSON e FLEET, 2013).

A inflamação observada nos grupos de tratamento variou de moderada a severa sendo encontrada a inflamação branda somente no grupo DMH+/Juçara+. Diversos estudos vêm relatando o efeito da suplementação com compostos fenólicos na redução da inflamação em cultura de células e modelo 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 CCR (EKBOM et al., 1990; ULLMAN e ITZKOWITZ, 2011).

Considerando o pleomorfismo celular, observa-se que nos grupos DMH+/Juçara- e DMH+/Juçara+ de tratamento, as lesões malignas foram em sua maioria moderadas a pouco diferenciadas. Sabe-se que o pleomorfismo celular está associado ao grau de diferenciação tumoral (JONES et al., 2000) e, considerando a classificação determinada por Fleming e colaboradores (2012) para tumores colorretais humanos, adota-se que tumores formados por mais que 95% de glândulas são considerados bem diferenciados, os moderadamente diferenciados compreendem àqueles que apresentam entre 50-95% de glândulas e tumores pouco diferenciados possuem maior parte sólida com menos de 50% de formação glandular. Estes autores ainda relatam que aproximadamente 70% dos adenocarcinomas colorretais são diagnosticados como moderadamente diferenciados, seguido de pouco diferenciado (20%) e bem diferenciado (10%), respectivamente. Resultados semelhantes a este foram encontrados neste estudo para os grupos DMH+/Juçara- (50%, 43,75% e 6,25%, respectivamente) e DMH+/Juçara+ (60%, 33,33% e 6,67%, respectivamente).

Considerando que no início do processo de carcinogênese colorretal ocorre primeiramente a formação de focos de criptas aberrantes e somente após acontece a formação de pólipos benignos que posteriormente malignizam (McLELLAN, 1991; THORUP, 1994; PARK et al., 1997), os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o Juçara atua predominantemente na inibição de focos de criptas aberrantes, ou seja, nos processos de iniciação tumoral (INCA, 2018).

Esses achados corroboram com os estudos descritos na literatura com outras espécies de açaí que avaliaram tradicionalmente a exposição entre 14 (CHOI et al., 2017) e 24 semanas (FRAGOSO et al., 2013) e o presente estudo avaliou por 23 semanas, tempo suficiente para a evolução das criptas até estágios avançados e invasivos do tumor.

Assim, Fragoso e colaboradores (2013) observaram que o açaí amazônico reduziu a invasividade ( $p < 0,005$ ) e a multiplicidade tumoral ( $p = 0,001$ ) em ratos induzidos à carcinogênese com o DMH e suplementados com o açaí amazônico por 20 semanas. Choi e colaboradores (2017) observaram que o açaí amazônico reduz a incidência de adenomas em 23,1% ( $p = 0,006$ ) e a multiplicidade de tumores em

76,9% ( $p=0,002$ ) em ratos tratados com azoximetano, resultados estes contrários ao encontrado neste trabalho.

Contrário de nossos achados, estudos com outros compostos, como com a suplementação com elagitanino, outro composto fenólico, observado em modelo animal de câncer colorretal por Wang e colaboradores (2010) mostraram não haver diferença significativa entre o controle e os grupos com diferentes concentrações de elagitanino.

Estudos realizados em pacientes com câncer colorretal têm 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 encontrados neste trabalho sugerem que em paciente com alto risco (portadores de polipose adenomatosa ou que já apresente pequenos pólipos com FCA e doenças inflamatórias intestinais), o consumo de Juçara pode aumentar o número de lesões, potencializando as chances do desenvolvimento de câncer colorretal. Este resultado corrobora com o encontrado por Wang e colaboradores (2014) que observaram um aumento no número de pólipos retais em pacientes com PAF que consumiram framboesas negras.

O número de lesões encontradas neste estudo foi variável nos grupos estudados, mantendo um número máximo de nove e mínimo de duas lesões por animal. Laranjeira 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 de suplementação com o Juçara para estudos aplicáveis a pacientes que desenvolvem câncer colorretal esporádico, no que diz respeito à patogênese, morfologia e alterações biomoleculares, assim como estudos de sobrevida e prognóstico, bem como estratégias de tratamento.

Desta forma, os achados mostram a importância do investimento em ciência na área da biotecnologia. O estudo apresenta dados para orientar novos estudos de substâncias naturais no desenvolvimento tumoral, especialmente nas fases iniciais da tumorigênese e abre perspectivas para o desenvolvimento de bioprodutos e bioprocessos que atuem na prevenção do estresse oxidativo. A pesquisa ainda abre perspectiva para a utilização de Juçara e produtos a base de Juçara como coadjuvantes em produtos que visem a modulação de desenvolvimento do câncer colorretal bem como na melhoria na qualidade de vida dos indivíduos.

#### 4. REFERÊNCIAS

AFRIN, S.; GIAMPIERI, F.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; VARELA-LÓPEZ, A.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. **Molecules**, v. 21, n. 169, 2016.

ALRAWI, S.J., SCHIFF, M., CARROLL, R.E., DAYTON, M., GIBBS, J.F., KULAVLAT, M., ANDERSON, G.R., Aberrant Crypt Foci. **Anticancer Research**, v. 120, p. 107–119, 2006.

AMROUCHE-MEKKIOUI, I., DJERDJOURI, B. N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, p. 209–217, 2012.

ARNOLD, M., SIERRA, M. S., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. BRAY, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, p. 683–691, 2017.

BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mice and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 371-377, 2000.

BATAGLION, G. A., DA SILVA, F. M. A., SANTOS, J. M., DOS SANTOS, F. N., BARCIA, M. T., DE LOURENÇO, C. C., et al. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. **Food Research International**, v. 64, p. 472–481, 2014.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, v. 37, p. 147 - 151, 1987.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L.T.; KHATIWADA, J.; OGUTU, S.; WILLIAMS, D.S.; JONES, J.; GUYTON, M.; ASIAMA, D.; HENDERSON, F.; GRANT, L.; DEBRUCE, M.; JOHNSON, A.; WASHINGTON, S.; CHAWAN, C.B. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 725–732, 2007.

CAMPOS, A. H.; ALDRED, V. L.; RIBEIRO, K. C.; VASSALLO, J.; SOARES, F. A. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 321, p. 95-102, 2009.

CHENG, L.; LAI, M.. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 12, p. 2642-2649, 2003.

CHOI, Y. J.; CHOI, Y. J.; KIM, N.; NAM, R. H.; LEE, S.; LEE, H. S.; LEE, H.;

SURH, Y. J.; LEE, D. H. Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane /Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Gut and Liver**, v. 11, n. 2, p. 243-252, 2017.

CORPET, D.E., PIERRE, F. 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, 2005.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. **Carcinogenesis**, v. 22, p.999–1013, 2001.

DE FLORA, S.; ASTENGO, M.; SERRA, D.; BENNICELLI, C. Inhibition of urethane-induced, lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine. **Cancer Lett.**, v. 32, p. 235–241, 1986.

DIAS, M.M.D.S.; NORATTO, G.; MARTINO, H.S.D.; ARBIZU, S.; PELUZIO, M.D.C.G.; TALCOTT, S.; RAMOS, A.M.; MERTENS-TALCOTT, S.U. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutr. Cancer**, v. 66, p.1394–1405, 2014.

EKBOM, A.; HELMICK, C.; ZACK, M.; ADAMI, H. O. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. **New England Journal Medicine**. v. 323, p. 1228-1233, 1990.

HABR-GAMA, A. et al. Prevenção e rastreamento do câncer colorretal. In: CAMPOS, F. G. M.; REGADAS, F. S. P.; PINHO, M. S. L. **Tratado de Coloproctologia**. São Paulo: Atheneu, 2012.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

FEMIA, A.P., CADERNI, G., Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. **Planta Medica**, v. , p. 1602–1607, 2008.

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology**. v. 3, n. 3, p. 153-173, 2012

FRAGOSO, M.F.; ROMUALDO, G.R.; RIBEIRO, D.A.; BARBISAN, L.F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 58, p. 68–76, 2013.

FRANCIS, F.G. Analysis of Anthocyanins. In: Anthocyanins as Food colors (P. Markakis ed.), p 182-208. **Academic Press**, N.Y. 1982.

FREGONESI, B. M. *et al.* 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, 2010.

GUPTA, A.K., SCHOEN, R.E. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p. 59–65, 2009.

HENRIQUES, V. T. *et al.* Omega-3 fatty acids reduce the development of preneoplastic lesions. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 237-244, 2009.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. **Food Chemistry**. v. 118, p. 208–214, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer Colorretal**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>>. Acessado em: 26 de junho de 2018.

JING, P.; BOMSER, J. A.; SCHWARTZ, S. J.; HE, J.; MAGNUSON, B. A.; GIUSTI, M. M. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. **J AGRIC FOOD CHEM**. v. 22, n. 20, p. 9391-8, 2008.

JOHNSON, R. L. e FLEET, J. C. Animal models of colorectal cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 32, p. 39-61, 2013.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox Signaling.**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006.

KHARE, S.; CHAUDHARY, K.; BISSONNETTE, M.; CARROLL, R. Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. **Cancer Epidemiology**, v. 472, p. 373-386, 2006

LABIANCA, R.; NORDLINGER, B.; BERETTA, G.D.; MOSCONI, S.; MANDALÀ, M.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 24, n. 6, p. 64–72, 2013.

LALA, G; MALIK, M.; ZHAO, C.; HE, J.; KWON, Y.; GIUSTI, M. M.; MAGNUSON, B. A. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. **Nutr Cancer.**, v. 54, n. 1, p. 84-93, 2006.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 3, 1998.

LEE, M.S.; LEE, Y.K.; PARK, O.J. CHERRY SILVER BERRY (ELAEAGNUS MULTIFLORA) Extracts exert antiinflammatory effects by inhibiting COX-2 and Akt signals in HT-29 colon cancer cells. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 19, p. 1673–1677, 2010.

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

McLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 11, p. 2093-98, 1991.

MORAES, L. F. S.; SUN, X.; PELUZIO, M. C. G.; ZHU, M. Anthocyanins/Anthocyanidins and colorectal cancer: what is behind the scenes? **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 59, p. 59-71, 2019.

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

NEMA, R.; JAIN, P.; KHARE, S.; PRADHAN, A. Flavonoid and cancer prevention – Mini review. **Research in Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 46-50, 2012.

NAUSS, K. M.; LOCNISKAR, M.; PAVLINA, T.; NEWBERNE, P. M. 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, 1984, p. 915-924.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1199–1205, 2009.

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

PARK, H. S.; GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. **Cancer Research**, v. 57, 1997, p. 4507-10

PAUL, S.; DECASTRO, A.J.; LEE, H.J.; SMOLAREK, A.K.; SO, J.Y.; SIMI, B.; WANG, C.X.; ZHOU, R.; RIMANDO, A.M.; SUH, N. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the  $\beta$ -catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1272–1278, 2010.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015.

POZO-INSFRAN, D.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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.1222-1229.



REDDY, B. S.; RAO, C. V.; RIVENSON, A.; KELLOFF, G. Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. **Cancer Res.**, 53, 3493–3498, 1993.

ROSTEIN, J. B.; SLAGA, T. J. Anticarcinogenesis mechanism, as evaluated in the multistage mouse skin model. **Mutat. Res.**, v. 202, p. 421–427, 1988.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAHA, D.; ROMAN, C.; BEAUCHAMP, D. New Strategies for Colorectal Cancer Prevention and Treatment. **World J Sur**, v.26, p.762-766, 2002.  
SERIL, D.N., LIAO, J., HO, K.-L.K., YANG, C.S., YANG, G.-Y., 2002. Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. **Carcinogenesis** 23, 993–1001

SILVA, M.G.C.P.C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. **Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açai**. Ilhéus: Centro de Pasquisa do Cacau, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, 2004.

SOINI, Y.; KAHLOS, K.; PUHAKKA, A.; LAKARI, E.; SÄILY, M.; PÄÄKKÖ, P.; KINNULA, V. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. **British Journal of Cancer**. v. 3, p. 880-886, 2000.

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

SUMAN, S.; FORNACE JR, A. J.; DATTA, K. Animal Models of Colorectal Cancer in Chemoprevention and Therapeutics Development. In: ETTARH, R. Colorectal Cancer - **From Prevention to Patient Care**, Rijeka: InTech, 2012, p. 277-300.

TAKAYAMA, T., MIYANISHI, K., HAYASHI, T., KUKITSU, T., TAKANASHI, K., ISHIWATARI, H., KOGAWA, T., ABE, T., NIITSU, Y. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** v. 3, p. 42–45, 2005.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, p. 87–108, 2015.

THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSEN, E. Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. **Nutrition and Cancer**, v. 21, n. 2, p. 177-182, 1994.

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

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

WANG, L. S.; HECHT, S.; CARMELLA, SP.; SEGUIN, C.; ROCHA, C.; YU, N.; STONER, K.; CHIU, S.; STONER, G. Berry Ellagitannins May Not Be Sufficient for Prevention of Tumors in the Rodent Esophagus. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n.7, p. 3992–3995, 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide data – Colorectal cancer.** Disponível em: < <https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>>. Acessado em: 03 de setembro de 2018.

**CAPÍTULO II: Juçara supplementation (*Euterpes edulis* Martius) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats**

Artigo Submetido: Molecular Cancer Research

**Title: Juçara supplementation (*Euterpes edulis* Martius) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats**

*Authors and affiliations:*

Cinthia Vidal Monteiro da Silva Couto<sup>1</sup>, Leandro André Milholi<sup>2</sup>, Aline Ribeiro Borçoi<sup>1</sup>; Juliana Dalbó<sup>1</sup>, Schalana Oliveira dos Reis<sup>1</sup>, Mayara Mota de Oliveira<sup>1</sup>; Joaquim Gasparini dos Santos<sup>1</sup>; Gabriela Tonini Peterle<sup>1</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Lucas Lima Maia<sup>1</sup>, Jankerle Neves Boeloni<sup>4</sup>, Fábio Dalmas Nunes<sup>5</sup>, Adriana Madeira Álvares-da-Silva<sup>1,3</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Biotechnology/Renorbio, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil.

<sup>2</sup>Post-Graduate Program in Veterinary Science, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Biology, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil.

<sup>5</sup> University of São Paulo School of Dentistry

*Additional information:*

This study was funded by the Foundation for Research and Innovation Support of the State of Espírito Santo

*Corresponding author*

Cinthia Vidal Monteiro da Silva Couto, M.Sc.

Departamento de Biologia, CCENS - Universidade Federal do Espírito Santo.

Alto Universitário, S/N, Caixa Postal 16

29500-000 Alegre, ES, Brasil

e-mail: cinthiavidalcouto@gmail.com

Fax: +55-28-3552-8774

Cel.: +55-28-99251-0611

**Abstract:**

The Juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) produces small fruits that have considerable levels of antioxidant compounds, such as anthocyanins. Anthocyanins are dietary flavonoids, which are bioactive phytochemicals and widely distributed in plants. Reactive oxygen species (ROS) are created in the cell through normal cellular metabolism. They are a major cause of cellular injury in an increasing number of diseases, including cancer. Colorectal cancer is a “lifestyle” disease, an antioxidant-rich diet aids in its prevention by activating cytoprotective pathways and the antioxidant cellular response. This study investigated the effect of Juçara supplementation in the expression of SOD-1, GPx and OGG1 genes in rats induced to colorectal carcinogenesis by 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Rats were randomly allocated into four groups: Control (DMH-/Juçara-), carcinogenesis-induced group (DMH+/Juçara-), supplemented with Juçara juice (DMH+/Juçara+) and supplemented with Juçara extract (DMH+/Extract). Supplementation with Juçara occurred three times a week until the 23 weeks. Tubular adenocarcinoma obtained was subjected to SOD1, GPx and OGG1 immunohistochemistry technique. DMH+/Extract group had lower SOD1 expression compared to DMH+/Juçara- group in the intratumoral inflammatory infiltrate ( $p=0.012$ ) and in tumor cells ( $p=0.022$ ). Also, DMH+/Juçara+ group showed a significantly higher GPx expression ( $p<0.019$ ) than that shown in DMH+/Juçara- group in intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. On the other hand, no significant difference was observed among OGG expression, both in intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate and in tumor cells ( $p=0.102$ ). Our results indicated ROS generated after administrating DMH were effectively eliminated by Juçara supplementation treatment, thereby relieving oxidative stress.

**Implications:** This study suggests that Juçara supplementation may act in prevention of colorectal cancer, opening new possibilities for its use in dietary supplementation, as well as in the development of products and medications for the prevention and treatment of colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal cancer, oxidative stress, Superoxide Dismutase, Glutathione peroxidase, Açai Juçara.

## Introduction

The Juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) is a native fruit tree widely distributed in Brazilian Atlantic Forest that belongs to Arecaceae family<sup>1</sup>. These palms produce an edible palm heart, recognized as a noble product of economic relevance in Brazil. Moreover, their natural regeneration has been reduced in nature reserves, placing it as an endangered species<sup>2</sup>. The discovery of alternatives for the sustainable use of Juçara represents an alternative palm exploration, which besides adding value and contribute to the conservation of the species.

Juçara palm also produces spherical berries which have high energy value due to high lipid content, besides having considerable carbohydrates, proteins and minerals levels, especially potassium, iron and zinc. The nutritional properties of Juçara fruit are similar to those of assai fruit, being, furthermore rich in bioactive compounds, as anthocyanins<sup>3</sup>. Reis and cols.<sup>4</sup> described the physicochemical characterization of Juçara pulp presented in Table 1.

**Table 1.** Physicochemical characterization of Juçara pulp represent by mean values expressed as wet basis.

Physicochemical parameters	Average values
pH	5.06 ± 0.04
Acidity (% m/m citric acid)	0.19 ± 0.01
Water content (%)	89.64 ± 0.24
Ashes (%)	0.39 ± 0.01
Lipids (%)	3.33 ± 0.08
Protein (%)	0.82 ± 0.11
Total anthocyanin (mg of cyanidin 3-glycoside/100 g)	298.86 ± 27.68
Antioxidant activity (mmol Trolox/g)	16.06 ± 1.38
Total phenolic content (mg AGE/100 g)	1226.39 ± 21.08

Among the anthocyanins found, we highlight mainly the cyanidin-3-O-glucoside<sup>5</sup>.

Anthocyanins are a flavonoids subgroup and the principal pigments responsible for the red, blue, and purple colors of terrestrial plants and have been commercially used as nutraceuticals, antioxidants, and red natural colorants in different foodstuffs, cosmetics and medicines<sup>6</sup>. Epidemiologic studies suggest that anthocyanins consumption reduces risk of cardiovascular disease, diabetes, arthritis and cancer due, at least in part, to their anti-oxidant, anti-inflammatory, vasoprotective, antineoplastic, chemo- and hepatoprotective activities and they have been widely used for therapeutic purposes<sup>7,8</sup>. There are several reports focused on the effect of anthocyanins in colorectal cancer because of their capacity to interact with cancer cells and modify their cellular response<sup>9,10,11</sup>. Anthocyanins have been

demonstrated to inhibit selectively the growth of human colon cancer cell lines<sup>12,13,14</sup> and restrict intestinal tumorigenesis in rat and mice models for human colon cancer<sup>15,16,17</sup>.

Colorectal cancer (CCR) is the third most common cancer and the fourth most common cause of cancer death worldwide with over 1.8 million new cases in 2018<sup>18</sup>. The geographical distribution of colorectal cancer is strictly related to environmental factors and lifestyle, generating a huge socioeconomic impact, as it requires individualized, long, exhaustive and still expensive treatment for health systems<sup>18</sup>.

CCR is considered a “lifestyle” disease, since the highest incidence occurs in countries with high consumption of red and processed meat, inadequate intake of fruits and vegetables and high prevalence of obesity and overweight, physical inactivity, alcohol consumption and smoking<sup>19,20</sup>. In addition to lifestyle, genetic and environmental factors directly influence in the initiation, promotion and development stages of colorectal cancer. About 75% of cases are sporadic in origin, caused by environmental factors (diet, depression, alcohol use, tobacco and microorganisms) and 20% are from hereditary<sup>21,22</sup>.

Many types of cancer, including CCR are caused, in part, by the conversion of cellular macromolecules to specific reactive oxygen species (ROS) during normal cellular metabolism. This is because ROS act as second messengers in intracellular signaling cascades that induce and maintain the oncogenic phenotype of cancer cells, in addition to stimulating cell proliferation and survival, angiogenesis and metastasis<sup>23,24</sup>.

Epidemiological studies indicate that specific phytochemicals present in fruits and vegetables may reduce the risk of cancer at multiple sites<sup>25</sup>. Phenolic compounds act to regulate several signaling pathways, such as the cytoprotective gene transcription pathway, which includes superoxide dismutase (SOD-1) and glutathione peroxidase (GPx), as well as genes related to DNA repair such as 8-oxoguanin DNA glycosylase (OGG1)<sup>26</sup>. These substances act to neutralize reactive oxygen species, reducing tumor size and increasing patient longevity, and being useful in reducing the side effects of chemotherapy and radiotherapy by reducing their toxicity<sup>27</sup>.

Thus, this work has brought into discussion the effects of food, specifically Juçara fruit, on protein expression related to the development of colorectal cancer in order to evaluate the possible effects that life habits may have on the tumorigenesis

process associated with oxidative stress as well as to assist in a better evaluation of colorectal cancer, clinical evolution of the patient or even in the therapeutic approach to be taken.



## **Materials and Methods**

### **2.1. Ethics**

Animals used in this study were maintained in accordance with National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N° 8023), 2011 review, and with Brazilian Law for Procedures for Animals Scientific Use (#11794/2008). The experimental procedures were reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Ethics Committee under protocol #043/2014.

### **2.2. Subjects**

Thirty-eight male Wistar adult rats (kept in the Center for Experimental Models Development of Faculdade de Filosofia Ciências e Letras), were used. Animals were housed in number of 6 per cage under conditions of controlled temperature (22-23°C), humidity (45-55%) and lighting (12h light, 12h dark). Food and water were available *ad libitum* throughout the experiments.

### **2.3. Juçara fruit pulp and extract**

Frozen Juçara pulp was supplied by a farmer from the rural communities of Rio Novo do Sul, Espírito Santo, Brazil. This pulp was hermetically stored at a temperature of -20°C, without any dyes or preservatives and protected from light and atmospheric oxygen. The extraction and quantification of anthocyanins occurred by the differential pH method according to the methodology adapted from Francis<sup>28</sup> obtaining a result of 535.39 mg/g total anthocyanin and 413.79 mg/g cyanidin 3-glycoside. All analysis were carried on Laboratory of Chemical Analyses of Food, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre/ES. The pulp and extract Juçara fruit was dissolved in ratio of one-part pulp or extract to two parts of filtered water at 0,3% final concentration. The physicochemical characterization of Juçara pulp was carried on Laboratory of Chemical Analyses of Food of the Center of Agrarian Sciences and Engineering of Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre/ES, as described by Reis<sup>4</sup>.

### **2.4. Cancer induced protocol**

The cancer induction protocol through 1,2-dimethylhydrazine (DMH) was performed in twenty eight animals based on previous data<sup>29</sup>. DMH was administered

subcutaneously once a week for five weeks (240 mg/kg body weight). Control group received an equivalent volume of saline solution.

### **2.5. Experimental design**

Ten animals were used as negative control (DMH-). Animals cancer-induced (DMH+) were randomly assigned to a three groups: positive control group (DMH+/Juçara-) (n=12) treated with saline (NaCl 0,9%) (n=10), a Juçara fruit pulp supplemented group (DMH+/Juçara+) (n=10) and a Juçara pulp extract supplemented group (DMH+/Extract) (n=6)<sup>30,31,32</sup>. Juçara supplementation occurred one week after the end of the induction of the neoplasia, and Juçara juice was made available three times a week by gavage until 18 weeks after carcinogenesis induction phase. In the DMH+/Juçara+ and DMH+/Extract groups, Juçara fruit pulp and extract were supplemented in the form of a solution, at a ratio of one part pulp/extract to two parts filtered water at the concentration of 0.3% according to consumption by humans<sup>31,32,33</sup>. After supplementation phase, all animals were euthanized by anesthetic induction with ketamine and xylazine association followed by supersaturated potassium chloride solution and, during necropsy, the whole large intestine was removed, from the caecum to the anus. Tissue processing and pathological analysis for differentiation degree was performed as previously described Trivilin and cols.<sup>29</sup> and according tumor differentiation scale proposed by Fleming and cols.<sup>34</sup>. The lesions were then classified as benign or malignant neoplasm depending on their differentiation grade (well differentiated - 1, moderately differentiated - 2 and poorly differentiated - 3).

### **2.5. Immunohistochemistry**

Anti-SOD1 antibody (1:50, [G-11], sc17767, Santa Cruz, Dallas TX), Anti-GPx antibody (1:50, [B-6] Santa Cruz, Dallas TX) and anti-OGG (1:25, [G-5] sc-376935, Santa Cruz, Dallas TX) were used in the immunohistochemistry reaction with negative control (no primary antibody) and positive control (colorectal cancer controls). In this study, we analyzed tumor cells and samples of lymphocytic inflammatory cells intratumorals. Sample scoring was performed by semiquantitative analysis, considering the stained cells number and signal intensity. Considering SOD1, GPx and OGG1 immune-positive cells percentage, a score of 0 was given

when all cells were negative; 1 score when 1-25% of cells were positive; 2 score when 25-50% of cells were positive and 3 score when > 50% of cells were positive. Signal intensity was scored as negative (0), weak (1), moderate (2) and strong (3). Both scores were multiplied<sup>35,36</sup> and resulting score were used in our analyses.

### **2.6. Statistical analysis**

Data were tabulated and submitted to consistency analysis. Kolmogorov-Smirnov normality test was used to examine normality. SOD1, OGG and GPX scores was analyzed by One-Way ANOVA . Multiple comparisons were performed using ANOVA and Tukey's post hoc test when necessary. Within-group comparisons were performed using unpaired t-test. All statistical tests were two-tailed and a significance of 5% ( $p < 0.05$ ) was considered. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism®, version 7.0 (GraphPad® Software Inc.). For best visualization, graphs were constructed from the values of mean and standard errors of mean (SEM).

## **3. Results**

### **3.1 Histopathological analysis of tumors**

All animals induced to colorectal cancer showed lesions in colorectal mucosa. In the positive control group (DMH+/Juçara-), the minimum number of lesions was four and the maximum number of lesions found was nine, with an average of 5.50 injuries per animal and a total of 39 lesions. In the Juçara pulp supplemented group (DMH+/Juçara+), 42 lesions were found with a mean of 8,40 per animal injuries. In this group, the minimum and maximum number of lesions was two and six, respectively. In the Juçara pulp extract supplemented group (DMH+/Extract) the average of injuries per animal was 7.25 with a total of 29 lesions and a minimum and maximum number of lesions was six and eight, respectively. Table 1 shows the number of lesions and their diagnoses from which only Tubular Adenocarcinomas were selected, given their homogeneous characteristics, and due to the fact of being the most frequent injuries.

**Table 2.** Number and percentage of intestinal mucosal lesions in an experimental model of colorectal cancer between DMH+/Juçara-, DMH+/Juçara+ DMH+/Extract groups according to their diagnoses

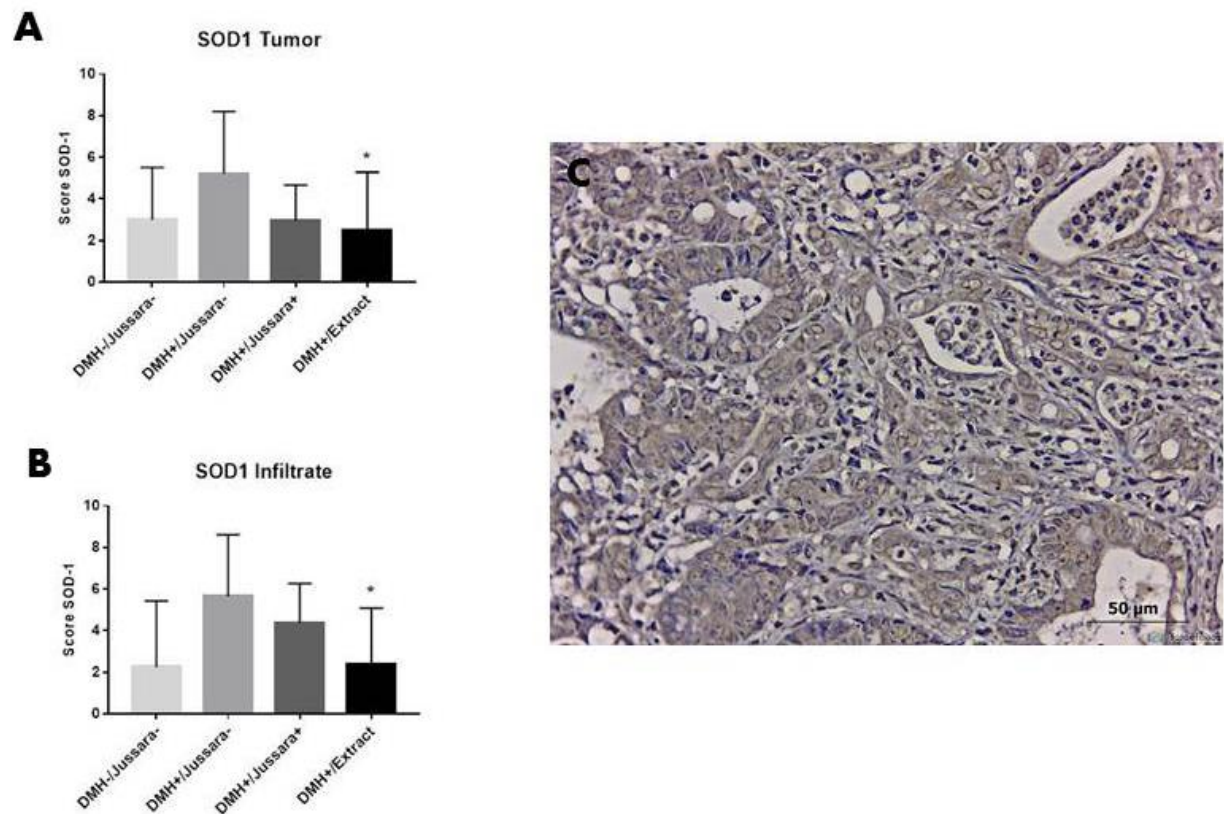
Lesion Diagnosis	DMH+/Juçara-		DMH+/Juçara+		DMH+/Extract	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Dysplasia</i>	2	7.4	8	23.0	2	12.5
<i>Signett-ring cell adenocarcinoma</i>	-	-	10	28.5	4	25.0
<i>Tubular adenocarcinoma</i>	25	92.6	17	48.5	10	62.5
Total	27	100	35	100	16	100

n: number of analyzed lesions, %: relative percentage to total number of characterized lesions.

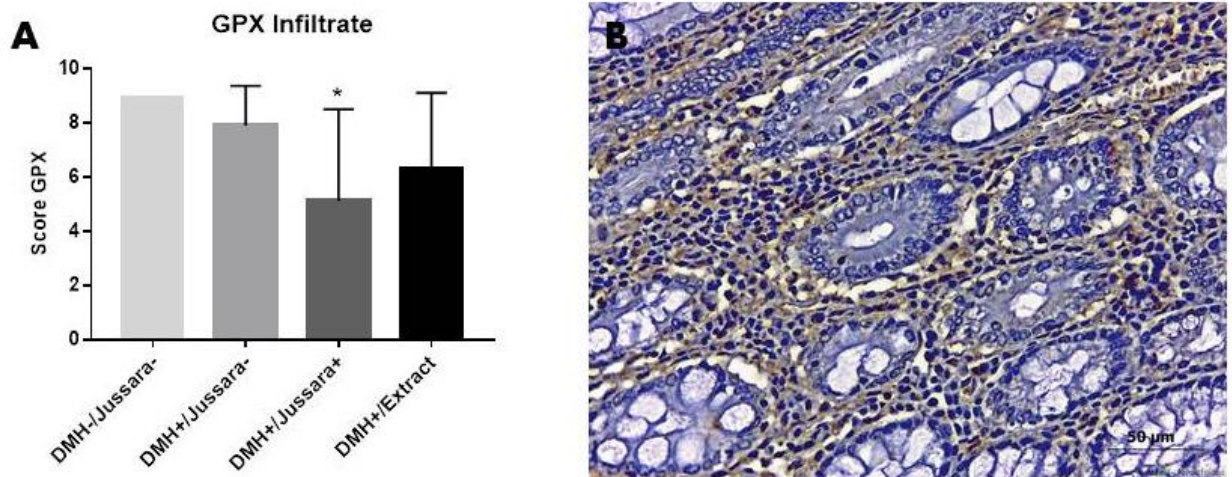
### **3.2 Expression of antioxidant proteins SOD1, GPx and OGG1 in colorectal tubular adenocarcinoma**

One-way ANOVA revealed significant difference among SOD1 expression score means [ $F(3,43)=4.11$ ;  $p=0.012$ ] in the intratumoral inflammatory infiltrate. In fact, Tukey's test showed that DMH+/Extract group presented a decreased in SOD1 expression compared to DMH+/Juçara- group. There were no significant differences in SOD1 expression among other groups. Same pattern was observed in tumor cells, animals that had been treated with DMH and received Juçara fruit extract showed a reduced SOD1 expression [ $F(3,48)=3.5$ ;  $p=0.022$ ; one-way ANOVA and Tukey's test] when compared to animals DMH-treated only (DMH+/Juçara-). No significant differences were observed between the remaining groups (Figure 1).

Analyzing the GPx expression, one-way ANOVA showed significant effects of Juçara fruit pulp supplementation on GPx score in intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells [ $F(3,44)=3.664$ ;  $p<0.019$ ]. Tukey's test revealed that GPx score of DMH+/Juçara+ group was significantly higher than that shown in DMH+/Juçara- group. No significant differences in other groups were observed (Figure 2). There was no expression of GPx in tumor cells.

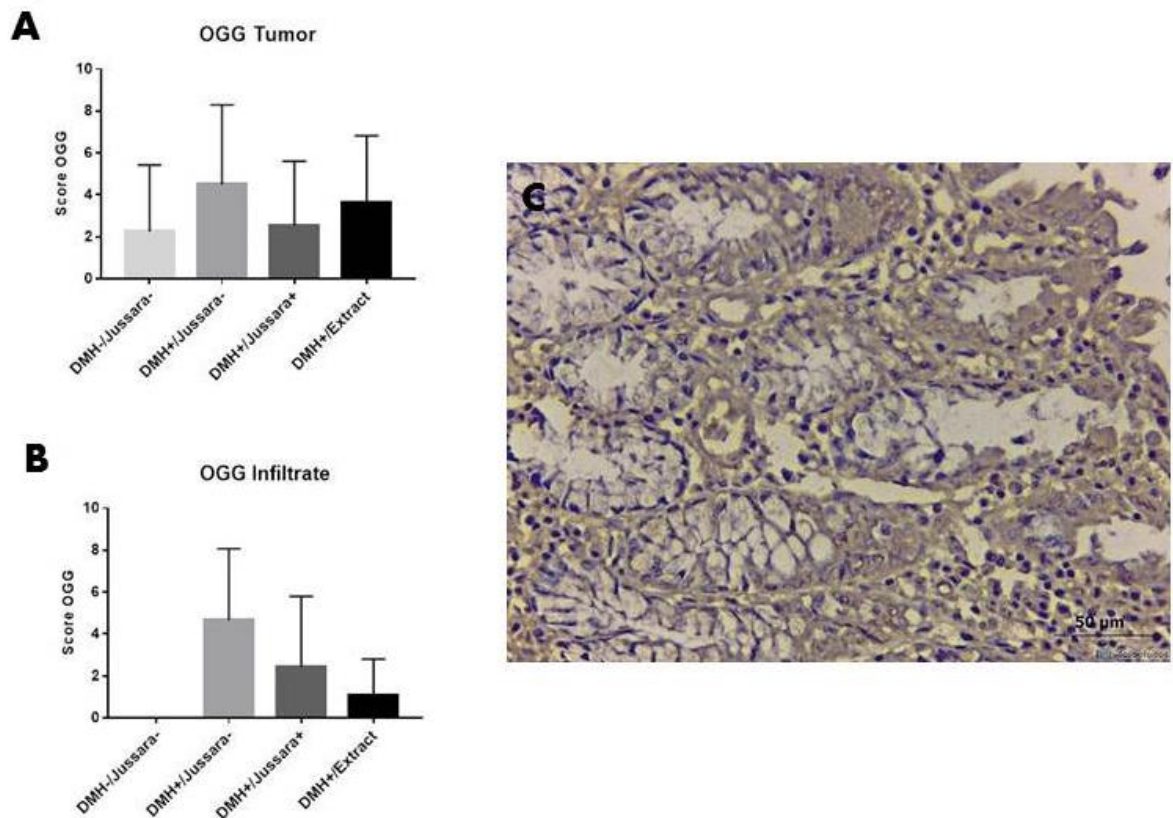


**Figure 1:** Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on SOD1 expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline, Juçara fruit or Juçara Extract three times a week during 18 weeks. **A)** Immunohistochemistry of tumor cells. **B)** Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. Immunohistochemistry were performed and SOD1 expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$  compared to the DMH+/Juçara- group. **C)** Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.



**Figure 2:** Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on GPX expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline or Juçara fruit three times a week during 18 weeks. **A)** Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells were performed and GPX expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$  compared to the DMH+/Juçara- group. **B)** Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.

On the other hand, no significant difference was observed among OGG expression, both in intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate and in tumor cells (Figures 3) when analyzed by one-way ANOVA [ $F(3, 21) = 2.347$ ;  $p = 0.102$  and  $F(3, 21) = 0.5092$ ;  $p = 0.680$ ; respectively].



**Figure 3:** Effects of DMH carcinogenesis induction (DMH+ groups) and Juçara fruit pulp (Juçara+ group) or Extract (Extract group) supplementation on OGG expression in rat. Control groups: DMH-/Juçara- and DMH+/Juçara-. After carcinogenesis period (5 weeks), rats were treated with saline or Juçara fruit three times a week during 18 weeks. **A)** Immunohistochemistry of tumor cells. **B)** Immunohistochemistry of intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. Immunohistochemistry were performed and OGG expression score are presented as mean  $\pm$  standard error. One-Way ANOVA. **C)** Photomicrograph of strong expression of SOD1 protein in DMH+/Juçara+ group.

## Discussion

The goal of the present study was to evaluate the effect of Juçara supplementation on tumor development, as well as to investigate the molecular mechanisms underlying their anti-tumor effect associated with oxidative stress pathway.

In the first analysis, our data shows that DMH+/Extract group presented a decreased in SOD1 expression compared to DMH+/Juçara- group in both tumor cells and intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate cells. This reduction in SOD1 expression is related to the presence of antioxidants in Juçara fruit. Similarly, GPx

score of DMH+/Juçara+ group was significantly lower than that shown in DMH+/Juçara- group.

Growing evidence indicates the participation of reactive oxygen species (ROS) and their reactive derivatives in the arising and development of colorectal cancer and tumor microenvironment. ROS is involved in the proliferation of tumor cells either by inducing DNA lesions likely to promote the carcinogenesis process or by directly activating intracellular signals involved in the control of proliferation<sup>37</sup>.

Increased ROS promotes activation of the cytoprotection pathway and reduces the ROS-mediated stimulation of cell growth. In this sense, SOD1 is activated to promote its antioxidant action through dismutation of superoxide radical ( $O_2^-$ ) to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and GPx converts it to oxygen ( $O_2$ )<sup>38</sup>. Consistent with these findings, Skrzycki and cols.<sup>39</sup> observed an increase in SOD1 expression in colorectal cancer tumor cells when compared with control group.

Somwara and colleagues<sup>40</sup> identified SOD1 as a promising lung cancer therapeutic target in a screen for inhibitors of lung adenocarcinoma cell growth and reduce apoptosis. This data supports the hypothesis that SOD1 may be essential for the adaptation of cancer cells to elevated oxidative stress.

Decreased SOD1 expression reduces superoxide dismutation in hydrogen peroxide, the GPx substrate. Without the presence of substrate, GPx has its expression reduced under conditions with low ROS production. A recent study by the Chandel's group<sup>41</sup> further reported the unexpected finding that inhibition of SOD1 leads to an increase rather than a decrease in hydrogen peroxide. This increase in hydrogen peroxide is due to the inhibition of GPx enzymes by superoxide. This correlation between low expression of SOD1 and GPx was observed in this study where GPx score of DMH+/Juçara+ group was significantly lower than that shown in DMH+/Juçara- group.

GPx-1 is the most ubiquitous and prevalent isoform of and contributes to about 70% of the total GPx enzyme activity in the cells of the gastrointestinal tract and therefore plays a significant role in the colon's antioxidant defense. In normal mucosa, phenolic compounds have been found to increase the GPx levels due, at least in part, to activation of the Nrf2-mediated cytoprotection pathway<sup>42</sup>.

The antioxidant enzyme system is a crucial factor in the modulation of intracellular stress. Through this mechanism, ROS can be eliminated before they damage the critical cellular macromolecules<sup>43</sup>.



Data from this work shows a non-significant increase in OGG expression in DMH+/Juçara+ group when compared to the supplemented groups. OGG1 is one of the most important proteins of the base excision pathway, playing a crucial role in maintaining genomic integrity and its activation occurs as a result of DNA exposure to reactive oxygen species. The antioxidative capacity of Juçara, however, inhibits ROS production by preventing DNA damage from occurring. Thus, there is a reduction in OGG expression in the groups supplemented with Juçara.

Juçara fruit is nutritionally rich, possessing mineral elements in quantities near or, for some elements, upper to the other fruits, like phosphorus, sulfur, potassium, calcium, magnesium and iron<sup>44</sup>. When compared to other foods, Juçara pulp has a high antioxidant capacity, mainly against superoxide and peroxy radicals<sup>45</sup>, due to their richness in vitamin C,  $\beta$ -carotene, polyphenols as well flavonoids<sup>46</sup> and phenolic compounds, mainly anthocyanins<sup>47</sup>. For this property, in recent years, Juçara has been used in the national market as a functional food.

Anthocyanins and anthocyanidins, have been a focus for discussions because of their prevalence in diets. They are ubiquitous compounds found in red wine, and other non-alcoholic beverages as well as fruits such as grapes, plums, açaí, black berries, cherries, raspberries, and vegetables such as purple cabbage and red potatoes. On account of their antioxidative potentials, anthocyanins have been implicated in reducing the risk of many diseases such as colorectal cancer by reducing oxidative stress via regulation of various antioxidant enzymes, including SOD1 and GPx<sup>48,49</sup>.

Preliminary studies of our group<sup>50</sup> shows an increase in SOD1 expression in the group supplemented with the Juçara fruit pulp. Many of the biological effects of antioxidants appear to be related to their ability not only to scavenge deleterious free radicals but also modulate cell-signalling pathways<sup>50</sup>. This result demonstrates the activation of the cellular cytoprotection pathway in the presence of Juçara in early stages of tumor development.

However, data from this work suggests that in developed tumors, the decrease in SOD1 and GPx expression occurs due to the presence of Juçara reduce the need for protective responses by activation on cytoprotection pathway. Consequently, tumor cells do not need to produce SOD1 and GPx to maintain cellular homeostasis.

## Acknowledgments

We would like to thank the Espírito Santo Research Support Foundation - FAPES, Brazil for the financial support; Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Alegre –FAFIA, Brazil for all support; the volunteers of this study from *Núcleo de Pesquisas em Saúde- UFES*.

## References

- [1] Henderson A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: Reis MS, Reis A (eds) *Euterpe Edulis Martius - (Palmitheiro) biologia, conservação e manejo*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues; 2000. p. 1–22.
- [2] Martinelli G, Moraes MA. *Livro vermelho da flora do Brasil*. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2013, p. 1100.
- [3] Cardoso AL, Di Pietro PF, Vieira FGK, Boaventura BCB, de Liz S, Borges GSC, et al. Acute consumption of Juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. *J Funct Foods*, **2015**; 17:152–162.
- [4] Reis SO, Luz TC, Couto CVMS, Dalbó J, Nunes LC, Martins MC, Silva PI, Silva AMA, Trivilin LO. Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation Reduces Aberrant Crypt Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of Carcinogenesis-Induced Rats. *Nutrition and cancer* **2019**.
- [5] Schulz M, Borges GSC, Gonzaga LV, Costa AACO, Fett R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, **2016**; 89: 14–26.
- [6] Vieira GS, Marques ASF, Machado MTC, Silva VM, Hubinger MD. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI–MS) in Juçara (*Euterpe edulis*) extracts. *J Food Sci Technol*, **2017**; 54: 2135–2144.
- [4] Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Karimi E. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, **2012**; 13: 14828–14844.
- [8] Luo Q, Zhang J, Yan L, Tang Y, Ding X, Yang Z, Sun Q. Composition and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber indicum*. *Journal of Medicinal Food*, **2011**; 14: 1609–1616.

- [9] He J, Giusti MM. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2010**; 1:163–187.
- [10] Norberto S, Silva S, Meireles M, Faria A, Pintado M, Calhau C. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods*, **2013**; 5: 1518–1528.
- [11] Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2007**; 51: 675–683.
- [12] Venancio VP, Cipriano PA, Kim H, Antunes LMG, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. *Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.)* anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food Funct.*, **2017**; 8: 307-314.
- [13] Hazas MCL, Mosele JI, Macià A, Ludwig IA, Motilva MJ. Exploring the Colonic Metabolism of Grape and Strawberry Anthocyanins and Their in Vitro Apoptotic Effects in HT-29 Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**; 65: 6477-6487.
- [14] Mazewski C, Liang K, Mejia EG. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. *Food Chemistry*, **2018**; 242: 378-388.
- [15] Fragoso MF, Romualdo GR, Vanderveer LA, Franco-Barraza J, Cukierman E, Clapper ML, et al. yophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, **2018**; 121: 237-245
- [16] Fernández J, García L, Monte J, Villar CJ, Lombó F. Functional Anthocyanin-Rich Sausages Diminish Colorectal Cancer in an Animal Model and Reduce Pro-Inflammatory Bacteria in the Intestinal Microbiota. *Genes*, **2018**; 9: 133.
- [17] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**; 68: 394–424.
- [18] WHO - World Health Organization. Globocan 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: <  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acessado em: 14 de julho de 2017.

- [19] Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*. **2005**; 97:906–16.
- [20] Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*. 2003; 78:559S–69S.
- [21] Assis, RVBF. Rastreamento e vigilância do câncer colorretal: guidelines mundiais. *GED gastroenterol endosc dig*. **2011**; 30: 62-74.
- [22] Cruz GMG, Ferreira RMRS, Neves PM. Câncer retal: estudo demográfico, diagnóstico e estadiamento de 380 pacientes acompanhados ao longo de quatro décadas. *Rev bras colo-proctol*. **2004**; 24: 208-24.
- [23] Hecht F, Pessoa CF, Gentil LB, Rosenthal R, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology*, **2016**; 37: 4281–4291.
- [24] Kilic N, Taslipinar M, Guney Y, Tekin E, Onuk E. An Investigation into the Serum Thioredoxin, Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*, **2014**; 21: 4139–4143.
- [25] Medic N, Tramer F, Passamonti S. Anthocyanins in Colorectal Cancer Prevention. A Systematic Review of the Literature in Search of Molecular Oncotargets. *Frontiers in Pharmacology*, **2019**; 10: 675.
- [26] Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al., Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming, *Cancer Cell*, **2012**; 22: 66–79.
- [27] Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer treatment reviews*, **1997**; 23: 209-240.
- [28] Francis FG. Analysis of Anthocyanins. In: Markakis P, editor. *Anthocyanins as Food colors*. New York: Academic Press; 1982. p 182-208.
- [29] Trivilin LO, Cassiano DC, Mendes SO, Borçoi AR, Archanjo AB, Cunha ER, et al., Exposure to cigarette smoke alters AgNOR number and HIF-1alpha expression in colorectal tubular adenocarcinoma in rats. *Int J Clin Exp Pathol*. **2017**; 10:3822-3829.
- [30] Morais AC, Oyama LM, de Oliveira JL, Carvalho Garcia M, de Rosso VV, Sousa MAL, et al. Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation during pregnancy and

lactation modulates the gene and protein expression of inflammation biomarkers induced by trans-fatty acids in the colon of offspring. *Mediat Inflamm.* **2014**.

[31] Morais CA, Oyama LM, de Moura CR, de Rosso VV, do Nascimento CO, Pisani LP. Polyphenols-rich fruit in maternal diet modulates inflammatory markers and the gut microbiota and improves colonic expression of ZO-1 in offspring. *Food Res Int.* **2015**; 77, 186–193.

[32] Argentato PP, Morais CA, Santamarina AB, César HC, Estadella D, Rosso VV, *et al.* Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation during pregnancy and lactation modulates UCP-1 and inflammation biomarkers induced by trans-fatty acids in the brown adipose tissue of offspring. *Clin Nutr Exp.* **2017**; 12, 50-65.

[33] Henriques VT, Dias CMGC, Franceschini SCC, Sabarense CM, Costa NMB, Leite JIA, *et al.* Omega-3 fatty acids reduce the development of preneoplastic lesions. *Rev Nutr.* **2009**; 22, 237-244.

[34] Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF and Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* **2012**; 3, 153-173

[35] Yoo HY, Chang MS, Rho HM. The activation of rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* **1999**; 274: 23887–23892.

[36] Sajesh BV, McManus KJ. Targeting SOD1 induces synthetic lethal killing in BLM and CHECK2-deficient colorectal cancer cells. *Oncotarget*, **2015**; 6: 27907-27922.

[37] Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.* **2005**; 59: 169–174.

[38] Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Croninc MTD, Mazura m, Telser j. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2007**; 39:44-84.

[39] Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta biochimica Polonica* 2009; 56: 667-670

[40] Somwara R, Erdjument-Bromage H, Larsson E, Shum D, Lockwood WW, Yange G, *et al.* Superoxide dismutase 1 (SOD1) is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci.* **2011**; 108: 16375–16380.

- [41] Glasauer A, Sena LA, Diebold LP, Mazar AP, Chandel NS. Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer. *J Clin Invest.* **2013**; 124:117-28.
- [42] Drew JE, Farquharson AJ, Arthur JR, Morrice PC, Duthie GG. Novel sites of cytosolic glutathione peroxidase expression in colon. *FEBS Letters*, **2005**; 579: 6135–6139.
- [43] Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*, **2002**; 3: 481–490.
- [44] Novello AA, Conceição LL, Dias MMS, Cardoso LM, Castro CA, Ricci-Silva ME, et al. Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. *Journal of Food and Nutrition Research*, **2015**; 54:101–112
- [45] Schulz M, Borges GSC, Gonzaga LV, Seraglio SKT, Olivio IS, Azevedo MS, et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of Juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International.* **2015**; 77:125-131.
- [46] Borges GSC, Vieira FGK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiasi RC, Mancini Filho J, et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Juçara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International.* **2011**; 44:2128-2133.
- [47] Inada KOP, Oliveira AA, Revorêdo TB, Martins ABN, Lacerda ECK, Freire AS. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and Juçara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, **2015**; 17: 422-433.
- [48] Vidal AM, Dias DO, Martins ESM, Oliveira RS, Nascimento RMS, Correia MGS. The integration of functional foods and its contribution for the decrease of initiation of diseases. *Cad. Grad. - Cienc Biol. Saúde* **2012**;1:43 –52
- [49] Kim SJ, Kim JM, Shim SH, Chang HI. Anthocyanins accelerate the healing of naproxen-induced gastric ulcer in rats by activating antioxidant enzymes via modulation of Nrf2. *Journal of functional foods* **2014**; 7:569–579.
- [49]
- [50] Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **1999**;32: 595–603.



## **CONCLUSÕES GERAIS**

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a suplementação com o Juçara foi efetiva na redução da formação de Focos de Criptas Aberrantes nos grupos expostos a esta substância tanto na forma de suco quanto de extrato. Porém, para tumores desenvolvidos observa-se que os grupos suplementados tanto com o suco do Juçara quanto o extrato apresentaram tumores mais desenvolvidos em termos de histopatologia. Observou-se ainda que em lesões malignas o Juçara também atuou na redução da expressão de genes das vias de estresse oxidativo e reparo. Desta forma, os dados deste trabalho abrem uma discussão acerca do uso de alimentos funcionais no desenvolvimento tumoral e como a interação de diversos componentes presentes nestes alimentos podem atuar em sinergismo para alterar todo o processo de tumorigênese colorretal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, K. M.; ALLENSWORTH, J. L.; BATINIC-HABERLE, I.; LYERLY, H. K.; DEWHIRST, M. W.; DEVI, G. R. ErbB1/2 tyrosine kinase inhibitor mediates oxidative stress-induced apoptosis in inflammatory breast cancer cells. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 132, p. 109–119, 2012.
- AL-JASABI, S.; SAAD, A.; HAQUE, E.T.M.E. The Role of Antioxidant Anthocyanin in the Attenuation of Lung Cancer Caused by Benzo [A] Pyrene in Balb/C Mice. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 14, n. 2, p. 168-172, 2013.
- ALEKSANDROVA, K.; PISCHON, T.; BUIJSSE, B.; MAY, A. M.; PEETERS, P. H.; BUENO-DEMESQUITA, H. B.; JENAB, M.; FEDIRKO, V.; DAHM, C. C.; SIERSEMA, P. D.; FREISLING, H.; FERRARI, P.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A.; TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; NASKA, A.; PALA, V.; MATTIELLO, A.; OHLSSON, B.; JIRSTRÖM, K.; KEY, T. J.; KHAW, K. T.; RIBOLI, E.; BOEING, H. Adult weight change and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 16, p. 3526–36, 2013.
- AMARAL, E.G.A.S. **Expressão de superóxido dismutase em focos de criptas aberrantes induzidas pelo azoximetano em ratos wistar e inibição pelo inositol hexafosfato. 2006.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
- American Cancer Society. Survival Rates for Colorectal Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>>. Acessado em: 22 de agosto de 2019.
- ANTELMANN H, HELMANN JD. Thiol-based redox switches and gene regulation. **Antioxid Redox Signal.**, v. 14, p. :1049–1063, 2011.
- ARMAGHANY, T.; WILSON, J. D.; CHU, Q.; MILLS, G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. **Gastrointest Cancer Res.** v. 5, p. 19-27, 2012.
- ARNASON, T.; LIANG, W. I.; ALFARO, E.; KELLY, P.; CHUNG, D. C.; ODZE, R. D.; LAUWERS, G. Y. Morphology and natural history of familial adenomatous polyposis-associated dysplastic fundic gland polyps. **Histopathology**, v. 65, n. 3, p. 353–362, 2014.
- ASSIS, R. V. B. F. Rastreamento e vigilância do câncer colorretal: guidelines mundiais. **GED gastroenterol endosc dig.** v. 30, n. 2, p. 62-74, 2011.
- ATKIN, W. S.; EDWARDS, R.; KRALJ-HANS, I.; WOOLDRAGE, K.; HART, A. R.; NORTHOVER, J. M.; PARKIN, D. M.; WARDLE, J.; DUFFY, S. W.; CUZICK, J.; UK FLEXIBLE SIGMOIDOSCOPY TRIAL INVESTIGATORS. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomized controlled trial. **Lancet**, v. 375, p. 1624-33, 2010.

- BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.** v.390, p.191-214, 2009.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.33, n.2, p.111-128, 2008.
- BATAGLION, G. A., DA SILVA, F. M. A., SANTOS, J. M., DOS SANTOS, F. N., BARCIA, M. T., DE LOURENÇO, C. C., et al. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. **Food Research International**, v. 64, p. 472–481, 2014.
- BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; PIVETTA, K. F. L. Temperatura, escarificação mecânica e substrato na germinação de sementes das palmeiras Juçara e açaí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 4, p. 569-573, 2012.
- BEHL, C., MOOSMANN, B. Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer's disease as Preventive and Therapeutic Approach. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 182-191, 2002.
- BENHAR M, FORRESTER MT, STAMLER JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 10, n. 10, p. 721–732, 2009.
- BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. The human OGG1 gene: structure, functions and its implication in the process of carcinogenesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 377, p. 1–8, 2000.
- BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Juçara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2128–2133, 2011.
- BORKOWSKI, T.; SZYMUSIAK, H.; GLISZCZYŃSKA-RWIGŁO, A.; RIETJENS, I. M.; TYRAKOWSKA, B. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, n.14, p.5526-5534, 2005.
- BROWN KM, PICKARD K, NICOL F, BECKETT GJ, DUTHIE GG & ARTHUR JR. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. **Clin Sci**, v. 98, p. 593–599, 2000.
- BURT, R. W. et al. Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 5, p. 655, 1990.

CARETHERS, J. M. DNA Testing and Molecular Screening for Colon Cancer. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 13, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARRICO, R. J.; DEUTSCH, H. F. The presence of zinc in human cytocuprein and some properties of the apoprotein. **J Biol Chem**, v. 25, n. 4, p. 723-7, 1970.

CARROLL, M. R. R.; SEAMAN, H. E.; HALLORAN, S. P. Tests and investigations for colorectal cancer screening. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 10-11, p. 921–939, 2014.

CASARIL, M.; CORSO, F.; BASSI, A.; CAPRA, F.; GABRIELLI, G. B.; STANZIAL, A. M.; NICOLI, N.; CORROCHER, R. Decreased activity of scavenger enzymes in Human hepatocellular carcinoma, but not in liver metastases. **International Journal of Clinical and Laboratorial Research**, v. 24, p. 94–97, 1994.

CASTÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HÉRNANDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

CHAN, D. S. et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 20456, 2011.

CHANCE B; OSHINO N. Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. **Biochem J**, v. 122, p. 225–233, 1971.

CHEN, H., ZHENG, Z., KIM, K., JIN, X., ROH, M. R., JIN, Z. "Hypermethylation and downregulation of glutathione peroxidase 3 are related to pathogenesis of melanoma". **Oncology Reports**, v. 36, n. 5, p. 2737-2744, 2016.

CHENG, J.; CHEN, Y.; WANG, X. ; WANG, J.; YAN, Z.; GONG, G.; LI, G.; LI, C. Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. **European Journal of Cancer Prevention**, v.24, n. 1, p. 6–15, 2015.

CHENG, L.; LAI, M.. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 12, p. 2642-2649, 2003.

CHU, F. F., DOROSHOW, J. H., AND ESWORTHY, R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 2571–2576, 1993.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 637-46. 2000.

COOKE, D. *et al.* Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis—Relationship with tissue anthocyanin levels. **International journal of cancer**, v. 119, n. 9, p. 2213-2220, 2006.

CORELLA, D.; RAMÍREZ-SABIO, J. B.; COLTELL, O.; ORTEGA-AZORÍN, C.; ESTRUCH, R.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; SALAS-SALVADÓ, J.; SORLÍ, J. V.; CASTAÑER, O.; ARÓS, F.; GARCIA-CORTE, F. J.; SERRA-MAJEM, L.; GÓMEZ-GRACIA, E.; FIOL, M.; PINTÓ, X.; SAEZ, G. T.; TOLEDO, E.; BASORA, J.; FITÓ, M.; COFÁN, M.; ROS, E.; ORDOVAS, J. M. Effects of the Ser326Cys Polymorphism in the DNA Repair OGG1 Gene on Cancer, Cardiovascular, and All-Cause Mortality in the PREDIMED Study: Modulation by Diet **Journal Of The Academy Of Nutrition And Dietetics**. v. 118, p. 589-605, 2018.

COX, D. G.; TAMIMI, R. M.; HUNTER, D. J. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **BMC Cancer**, v. 6, p. 17, 2006.

CRNOGORAC-JURCEVIC, T.; EFTHIMIOU, E.; NIELSEN, T.; LOADER, J.; TERRIS, B.; STAMP, G.; BARON, A.; SCARPA, A.; LEMOINE, N. R. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. **Oncogene**, v. 21, p. 4587–4594, 2002.

CROSS, A. J.; SINHA, R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, n. 1, p. 44-55, 2004.

CRUZ, G. M. G.; FERREIRA, R. M. R. S.; NEVES, P.M. Câncer retal: estudo demográfico, diagnóstico e estadiamento de 380 pacientes acompanhados ao longo de quatro décadas. **Rev bras colo-proctol**. v. 24, n. 3, p. 208-24, 2004.

DA SILVA, N. A.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z.; DE ROSSO, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5072–5084, 2014.

DA SILVA, P. P. M.; DO CARMO, L. F.; SILVA, G. M.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; CASEMIRO, R. C.; SPOTO, M. H. F. Physical, chemical, and lipid composition of Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) pulp. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, p. 7–13, 2013.

DE BRITO, E. S. *et al.* Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, Juçara, and guajiru. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

DEAR T.N.; CAMPBELL, K.; RABBITTS, T.H. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins, **Biochemistry** v. 30, p.10376–10382, 1991.

DIZDAROGLU M, KIRKALI G, JARUGA P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. **Free Radic Biol Med.** v. 15, n. 12, p. 1610-21, 2008.

DUAN, W. X.; HUA, R. X.; YI, W.; SHEN, L. J.; JIN, Z. X.; ZHAO, Y. H.; YI, D. H.; CHEN, W. S.; YU, S. Q. The Association between OGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 27 Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35970, 2012.

DURKO, L.; MALECKA-PANAS, E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. **Curr Colorectal Cancer Rep**, v. 10, p. 45–54, 2014.

ELAHI, A., ZHENG, Z., PARK, J., EYRING, K., MCCAFFREY, T., LAZARUS, P. The human Ogg1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal câncer risk. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1229-1234, 2002.

FALCÃO, L. D. et al. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. **Boletim CEPPA**, v. 21, n.2, p.351-366, 2003.

FAVORITI, P.; CARBONE, G.; GRECO, M.; PIROZZI, F.; PIROZZI, R. E. M.; CORCIONE, F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. **Updates Surg.**, v. 68, p. 7–11, 2016.

FEARON, ERIC R.; VOGELSTEIN, Bert. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FELZENSZWALB, I., DA COSTA MARQUES, M. R., MAZZEI, J. L., & AIUB, C. A. F. Toxicological evaluation of Euterpe edulis: A potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 536-544, 2013.

FENOGLIO-PREISER, C. M.; NOFFSINGER, A. Review article: Aberrant crypt foci: A Review. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 6, p. 632-642, 1999.

FENTON HJH. LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **J Chem Soc Trans**, v. 65, p. 899–910, 1894.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, p. 2893–2917, 2010.

FIGUEIREDO, J. A.; CAMPOS, F. F.; MARCOS, A. J. F.; MAFRA, M. M. M.; MEYER DE, BARBOSA, S. D.; CUNHA JÚNIOR, G. F. Avaliação retrospectiva da sobrevida de 171 pacientes com câncer colorretal após seguimento de três anos. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 24, n. 6, p. S72-S77, 2014.

FRANCO, M. C.; DENNYS, C. N.; ROSSI, F. H.; ESTÉVEZ, A. G. Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **InTech**, p. 141-158, 2013.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 893, 13-18, 1999

FUKAE, J., TAKANASHI, M., KUBO, S.I., NISHIOKA, K.I., NAKABEPPU, Y., MORI, H., MIZUNO, Y., HATTORI, N. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. **Acta Neuropathol.** v. 109, p. 256–262, 2005.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox Signal.**, v, 15, p. 1583–1606, 2011.

FUNG, H.; DEMPLE, B. Distinct roles of Ape1 protein in the repair of DNA damage induced by ionizing radiation or bleomycin. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 4968-4977, 2011.

GALIATSATOS P, FOULKES W. Familial adenomatous polyposis. **Am. J. Gastroenterol.** v. 101, n. 2, p. 385–398, 2006.

GEIERSBACH, K. B.; SAMOWITZ, W. S. Microsatellite Instability and Colorectal Cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, p. 1269-1277, 2011.

GELLAD, Z. F.; PROVENZALE, D. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health Impact. **Gastroenterology**, n.138, p.2177–2190, 2010.

GHYSELINCK, N. B.; JIMENEZ, C.; LEFRANCOIS, A. M.; DUFAURE, J. P. Molecular-cloning of a cDNA for androgenregulated proteins secreted by the mouse epididymis. **J Mol Endocrinol**, v. 4, p. 5–12. 1990.

GHYSELINCK, N.B.; DUFAURE, J.P. A mouse cDNA sequence for epididymal androgenregulated proteins related to glutathione peroxidase, **Nucleic Acids Res.** v. 18, 1990.

GIOVANNUCCI, E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 7, 2001, p. 725-731.

GLOBOCAN – IARC. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Disponível em: < [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf)>. Acessado em: 22 de Agosto de 2019.

GLOVER, B. J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, v. 22, n. 5, p. R147-R150, 2012.

GOMEZ D, DALAL Z, RAW E, ROBERTS C, LYNDON PJ. Anatomical distribution of colorectal cancer over a 10-year period in a district general hospital: is there a true “rightward shift”? **Postgrad Med J.**, v. 80, n. 949, p. 667-9, 2004.

GONG, H., LI, Q. E YANG, Z. Optimization of enzyme-assisted extraction of anthocyanins from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juice using response surface methodology. **African Journal of pharmacy and Pharmacology**. v. 8, n. 34, p. 841-848, 2014.

GUILLET, M.; BOITEUX S. Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 21, n. 11, p. 2833–41, 2002.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. Royal Soc.**, v. 147, p. 332, 1934.

HABR-GAMA, A. et al. Prevenção e rastreamento do câncer colorretal. In: CAMPOS, F. G. M.; REGADAS, F. S. P.; PINHO, M. S. L. **Tratado de Coloproctologia**. São Paulo: Atheneu, 2012.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Quarta Edição, Nova Iorque, Oxford University Press Inc., 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE; J.M.C. **free Radicals in Biology and Medicine**, 5th ed, New York, oxford university press. 2015

HAMILTON S.R., AALTONEN L.A. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System**. IARC Press:Lyon 2000.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HEGDE, M. L.; HAZRA, T. K.; MITRA, S. Functions of disordered regions in mammalian early base excision repair proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 21, p. 3573–87, 2010.

HERBETTE S, ROECKEL-DREVET P & DREVET JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. **FEBS J**, v. 274, p. 2163–2180, 2007.

HERNEGGER, G. S.; MOORE, H. G.; GUILLEM, J. G. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 45, n. 1, p. 127-34; 2002.

HECHT, F.; PESSOA, C. F.; GENTIL, L. B.; ROSENTHAL, R.; CARVALHO, D. P.; FORTUNATO, R. S. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4281–4291, 2016.

HYER, W. Polyposis syndromes: pediatric implications. **Gastrointestinal endoscopy clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 659-82, vi-vii, 2001.

INÁCIO, M. R. C.; DE LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; DE ALMEIDA TEIXEIRA, G. H. Total anthocyanin content determination in intact acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1160-1164, 2013.

INADA, K. O. P., OLIVEIRA, A. A., REVORÊDO, T. B., MARTINS, A. B. N., LACERDA, E. C. Q., FREIRE, A. S., ... MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and Juçara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, 422–433, 2015.

INCA. Instituto nacional do câncer. ESTIMATIVA 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acessado em: 22 de agosto de 2019.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122p. Disponível em: <<http://www.inca.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2016.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer Colorretal**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>>. Acessado em: 26 de junho de 2019.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v. 12, p. 620–636, 2013.

JAYASEKARA, H.; ENGLISH, D. R.; HAYDON, A.; HODGE, A. M.; LYNCH, B. M.; ROSTY, C.; WILLIAMSON, E. J.; CLENDENNING, M.; SOUTHEY, M. C.; JENKINS, M. A. et al. Associations of alcohol intake, smoking, physical activity and obesity with survival following colorectal cancer diagnosis by stage, anatomic site and tumor molecular subtype. **Int. J. Cancer**, v. 142, p. 238–250, 2018.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

J

JOHNSON, C. M.; WEI, C.; ENSOR, J. E.; SMOLENSKI, D. J.; AMOS, C. I.; LEVIN, B.; BERRY, D. A. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes Control.**, v. 24, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox Signaling.**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006.



JORDE, L. B. et al. **Genética Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197 – 221. 2000.

JSPEERT, J. E. G.; VERMEULEN, L.; MEIJER, G. A.; DEKKER, E. Serrated neoplasia—role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v. 12, p. 401–409, 2015.

JUNG, K.; SEIDEL, B.; RUDOLPH, B.; LEIN, M.; CRONAUER, M. V.; HENKE, W.; HAMPEL, G.; SCHNORR, D.; LOENING, S. A. Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, 1997, p. 127–133.

KHANNA, A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? **Cancer Res**, v. 75, n. 11, p. 2133–8, 2015.

KANG, S.Y. *et al.* Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc Min mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. **Cancer letters**, v. 194, n. 1, p. 13-19, 2003.

KARAHALIL B, BOHR VA, WILSON DM. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. **Hum Exp Toxicol**, v. 31, p. 981-1005, 2012.

KAUR, G.; CHOLIA, R. P.; MANTHA, A. K.; KUMAR, R. DNA Repair and Redox Activities and Inhibitors of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1/Redox Effector Factor-1 (APE1/Ref-1): A Comparative Analysis and their Scope and Limitations toward Anticancer Drug Development. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 57, n. 24, p. 10241-56, 2014.

KELLEY, M. R.; FISHEL, M. L. DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, v. 8, p.417-425, 2008.

KELLEY, M. R.; CHENG, L.; FOSTER, R.; TRITT, R.; JIANG, J.; BROSHEARS, J.; KOCH, M. Elevated and Altered Expression of the Multifunctional DNA Base Excision Repair and Redox Enzyme Ape1/ref-1 in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 7, p. 824–830, 2001.

KILIC, N.; TASLIPINAR, M.; GUNEY, Y.; TEKIN, E.; ONUK, E. An Investigation into the Serum Thioredoxin, Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Breast Cancer. **Ann Surg Oncol** v. 21, p. 4139–4143, 2014.

KIM, Y. H.; KAKAR, S.; CUN, L.; DENG, G.; KIM, Y. S. Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. **Int J Cancer**. v. 123, n. 11, p. 2587-93, 2008.

KIM, S. J.; KIM, J. M. SHIM, S. H.; CHANG, H. I. Anthocyanins accelerate the healing of naproxen-induced gastric ulcer in rats by activating antioxidant enzymes via modulation of Nrf2. **JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS** v. 7, p. 569 – 579, 2014.

KLUNGLAND, A., BJELLAND, S. Oxidative damage top urines in DNA: Role of mammalian OGG1. **DNA Repair** v. 6, p. 481-488, 2007.

KNUDSEN, A. L.; BISGAARD, M. L.; BÜLOW, S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a review of the literature. **Familial cancer**, v. 2, n. 1, p. 43-55, 2003.

KOHEN R, NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol.** v. 30, n. 6, p. 620-50, 2002.

KOURY, J. C; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**, v. 16, n.4, p. 433-41. 2003.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R.; GLADYSHEV, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes, **Science** v. 300, p. 1439–1443, 2003.

KUMAR, S.; RHIM, W.K.; LIM, D.K.; NAM, J.M. Glutathione dimerization-based plasmonic nanoswitch for biodetection of reactive oxygen and nitrogen species, **ACS Nano** v. 7, n. 3, p. 2221–2230, 2013.

LABIANCA, R.; NORDLINGER, B.; BERETTA, G.D.; MOSCONI, S.; MANDALÀ, M.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 24, n. 6, p. 64–72, 2013.

LEE, S.; WOO, H.; LEE, J. OH, J. H.; KIM, J.; HIN, A. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of colorectal cancer in South Korea: A case-control study. **Alcohol**, v. 76, p. 15-21. 2019.

LEE, S. et al. Thioredoxin And Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms To Functional Significance. **ANTIOXID. REDOX SIGNAL.**, V. 18, P. 1165–1207, 2013.

LEOZ, M. L.; CARBALLAL, S.; MOREIRA, L.; OCAÑA, T.; BALAGUER, F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. **The Application of Clinical Genetics**, v. 8, p. 95–107, 2015.

LESER, S. M.; SOARES, E. A. Aspectos nutricionais e atividade física na prevenção do câncer colorretal. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação Nutrição.** v. 21, p. 121-145, 2001.

LESLIE, A.; CAREY, F.; PRATT, N.; STEELE, R. J. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Br J Surg.** v. 89, p. 845–860, 2002.

LI, S.; YAN, T.; YANG, J. Q.; OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. **Cancer Res**, v. 60, p. 3927 - 3939, 2009.

LIAO, J.; SERIL, D. N.; LU, G. G.; ZHANG, M.; TOYOKUNI, S.; YANG, A. L.; Increased susceptibility of chronic ulcerative colitis-induced carcinoma development in DNA repair enzyme Ogg1 deficient mice. **Mol Carcinog** v. 47, n. 8, p. 638-46, 2008.

LILA, M. A. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 306–313, 2004.

LIMA, V. L. A. G. et al. Identificação de antocianidinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.927-935, 2006.

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

LIMSUI, D.; VIERKANT, R. A.; TILLMANS, L. S.; WANG, A. H.; WEISENBERGER, D. J.; LAIRD, P. W.; LYNCH, C. F.; ANDERSON, K. E.; FRENCH, A. J.; HAILE, R. W.; HARNACK, L. J.; POTTER, J. D.; SLAGER, S. L.; SMYRK, T. C.; THIBODEAU, S. N.; CERHAN, J. R.; LIMBURG, P. J. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. **J Natl Cancer Inst.**, v. 102, n. 14, p. 1012-22, 2010.

LIN J, ZAHURAK M, BEER TM, RYAN CJ, WILDING G, MATHEW P, MORRIS M, CALLAHAN JA, GORDON G, REICH SD, CARDUCCI MA, ANTONARAKIS ES. A non-comparative randomized phase ii study of 2 doses of atn-224, a copper/zinc superoxide dismutase inhibitor, in patients with biochemically recurrent hormone-naïve prostate cancer. **Urol Oncol** v. 31, p. 581-588, 2013.

LIU, Q.; JIN, J.; YING, J.; SUN, M.; CUI, Y.; ZHANG, L.; XU, B.; FAN, Y.; ZHANG, Q. Frequent Epigenetic Suppression of Tumor Suppressor Gene Glutathione Peroxidase 3 by Promoter Hypermethylation and Its Clinical Implication in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 5, p. 10636-10649, 2015.

LOPES, M. C. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 and increases the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. **Experimental Dermatology**, v.13, n.1, p.18–26, 2004.

LOSCHEN G, FLOHE´ L, AND CHANCE B. Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. **FEBS Lett**, v. 18, p. 261–264, 1971.

LOPES, T. J. et. al. Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrobiência**, v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

LOSSO, G. M.; MORAES, R. S.; GENTILI, A. C.; MESSIAS-REASON, I. T. Instabilidade de Microssatélite – MSI nos Marcadores (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) no câncer de reto. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 4, p. 240-244, 2012.

LU, Y. P.; LOU, Y. R.; YEN, P.; NEWMARK, H. L.; MIROCHNITCHENKO, O. I.; INOUE, M.; HUANG, M. T. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. **Cancer Res** v. 57, p. 1468-1474, 1997.

LUO, M.; HE, H.; KELLEY, M. R.; GEORGIADIS, M. M. Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. **Antioxid. Redox Signaling**, v.12, p. 1247-1269, 2010.

LYALL, M. S.; DUNAS, S. R.; CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clin Cancer Research**. v. 12, n. 4, p. 1184-91, 2006.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. **Archives of internal medicine**, v. 117, n. 2, p. 206-212, 1996.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: The first 30 years. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, p. 459–465, 2003.

MANGO, C.; MEDEIROS, M. L.; MALUF, F. C. Pólipos e polipose juvenil: estudo epidemiológico e histológico de 45 casos. **Rev. bras. colo-proctol**, v. 14, n. 2, p. 92-5, 1994.

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MADEDDU, C.; MURA, L.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M. R. The Impact of Different Antioxidant Agents alone or in Combination on Reactive Oxygen Species, Antioxidant Enzymes and Cytokines in a Series of Advanced Cancer Patients at Different Sites: Correlation with Disease Progression. **Journal Free Radical Research**. v. 37, n. 2, 2003.

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. **FEBS Journal** v. 275, p. 3959–3970, 2008.

MARINGE, C. et al. Stage at diagnosis and colorectal cancer survival in six highincome countries: a population-based study of patients diagnosed during 2000–2007. **Acta Oncol**, n.52, p.919–932, 2013.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p. 163-180, 1982.

MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. **N Engl J Med**. v. 361, n. 25, p. 2449–60, 2009.

MARTCHENKO, M., ALARCO, A., HARCUS, D., WHITEWAY, M. Superoxide

Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced SOD5 Gene. **Mol. Biol. Cell.** v. 15, p. 456-467, 2004.

MARTINELLI G., MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil.** 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 1100, 2013.

GOULD, K.; DAVIES, K.; WINEFIELD, C. **Anthocyanins: biosynthesis, function, and applications.** Springer, New York, 2009.

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

MENSENKAMP, A. R.; VOGELAAR, I. P.; VAN ZELST-STAMS, W. A. G.; GOOSSENS, M.; OUCHENE, H.; HENDRIKS-CORNELISSEN, S. J. B.; KWINT, M. P.; HOOGERBRUGGE, N.; NAGTEGAAL, I. D.; LIGTENBERG, M. J. L. Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. **Gastroenterology**. v. 146, p. 643-646, 2014.

MESSINA, C. R.; LANE, D. S.; ANDERSON, J. C. Body mass index and screening for colorectal cancer: gender and attitudinal factors. **Cancer Epidemiol**, v. 36, n. 4, p. 400-8, 2012.

MILLS, A. M.; LIOU, S. L.; FORD, J. M.; BEREK, J. S.; PAI, R. K.; LONGACRE, T. A. L. Lynch Syndrome Screening Should Be Considered for All Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer. **Am J Surg Pathol**. v. 38, n. 11, p. 1501-1509, 2014.

MITSUISHI, Y.; TAGUCHI, K.; KAWATANI, Y. et al., Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming, **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 66-79, 2012.

MORIKAWA, T.; KUCHIBA, A.; LOCHHEAD, P.; NISHIHARA, R.; YAMAUCHI, M.; IMAMURA, Y.; LIAO, X. Y.; QIAN, Z. R.; NG, K.; CHAN, A. T.; MEYERHARDT, J. A.; GIOVANNUCCI, E.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. Prospective Analysis of Body Mass Index, Physical Activity, and Colorectal Cancer Risk Associated with b-Catenin (CTNNB1) Status. **American Association for Cancer Research**. v. 73, n. 5, p. 1600-10, 2013.

MUNDADE, R.; IMPERIALE, T. F.; PRABHU, L.; LOEHRER, P. J.; LU, T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 400-406, 2014.

NAKAMURA, Y.; INAGAKI, M.; KENMOTSU, S.; YAMADERA, S.; OHSAWA, I.; GOTOH, H.; GOTO, Y.; SATO, N.; OGUCHI, T.; TSUJI, M.; KIUCHI, Y. Significance of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Levels in Hemodialysis Patients: A Mini Review. **Modern Research in Inflammation**, v. 6, p. 9-13, 2017.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 5, p. 469–484, 2009

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radic. Biol. Medic.**, v. 66, n. 1, p. 3–12, 2014.

OIKAWA, T.; OKUDA, M.; MA, Z.; GOORHA, R.; TSUJIMOTO, H.; INOKUMA, H.; FUKASAWA, K. Transcriptional control of BubR1 by p53 and suppression of centrosome amplification by BubR1. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, p. 4046–4061, 2005.

OKADA F, SHIONOYA H, KOBAYASHI M, KOBAYASHI T, TAZAWA H, ONUMA K, IUCHI Y, MATSUBARA N, IJICHI T, DUGAS B, HOSOKAWA M. Prevention of inflammation-mediated acquisition of metastatic properties of benign mouse fibrosarcoma cells by administration of an orally available superoxide dismutase. **Br J Cancer**, v. 94, p. 854-862, 2006.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388-38393, 2001.

OSORIO, A.; MILNE, R. L.; KUCHENBAECKER, K.; VACLOVA, T.; PITA, G.; ALONSO, R.; PETERLONGO, P.; BLANCO, I.; DE LA HOYA, M.; DURAN, M.; DIEZ, O.; RAMON, Y. C. T.; KONSTANTOPOULOU, I.; MARTINEZ-BOUZAS, C.; ANDRES, C. R.; SOUCY, P.; et al. DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **PLoS Genet.** v. 10, p. 1004-256, 2014.

PAPA, L.; MANFREDI, G.; GERMAIN, D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. **Genes & Cancer**, v. 5, p. 1-2, 2014.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. H. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 9, p. 755-806, 2007.

PARK HW, KIM IJ, KANG HC, JANG SG, AHN SA, LEE JS et al. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism is not associated with colorectal cancer risk. **J Epidemiol.** p. 156- 160, 2007.

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

- PAZ-ELIZUR, T., KRUPSKY, M., BLUMENSTEIN, S., ELINGER, D., SCHECHTMAN, E., LIVNEH, Z., Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 95, p.1312–1319, 2003.
- PINHO, M; ROSSI, B. M. Conceitos atuais sobre a Carcinogênese Colorretal. **Rev. Bras. Coloproct**, v. 19, n. 1, 1999.
- PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2059–2072, 2010.
- POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C. L.; VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, 2017.
- PRESCOTT J, WENTZENSEN IM, SAVAGE SA, DE VIVO I. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. **Mutat Res.**, v. 730, p. 75–84, 2012.
- QUINA, F.H.; MOREIRA, P.F.; VAUTIER-GIONGO, C.; RETTORI, D.; RODRIGUES, R;F.; FREITAS, A.A.; SILVA, P.F.; MAÇANITA, A.L. Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. **Pure Applied Chemistry**, p. 1687-1694, 2009.
- RAHMAN I et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European J Pharma.**, v. 533, n. 1-3, p. 222-39, 2006.
- RASOOL, S.; KADLA, S. A.; RASOOL, V.; GANAI, B. A. A comparative overview of general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. **Tumour Biol**, v. 34, n. 5, p. 2469–2476, 2013.
- RAY, P. D., HUANG, B. W., TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal.**, v. 24, p. 981–990, 2012.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine** v. 49, p. 1603–1616, 2010.
- RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in Pharmacology | Experimental Pharmacology and Drug Discovery**. v. 5, 2014.
- RIBEIRO, L. O., MENDES, M. F., PEREIRA, C. S. S. Avaliação da composição centesimal, mineral e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 4, n. 3, p. 05-16. 2011.
- ROBERTSON, A. B.; KLUNGLAND, A.; ROGNES, T.; LEIROS, I. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 6, p. 981–93, 2009.

RODRIGUES, A. S.; GOMES, B. C.; MARTINS, C.; GROMICHO, M.; OLIVEIRA, N. G.; GUERREIRO, P. S.; RUEFF, J. DNA repair and resistance to cancer therapy. In *New research directions in DNA repair*, Chen, P. C., Ed.; **InTech**, 2013.

RUFINO, M. D. S. M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; OLIVEIRA, M. S. P.; SAURA-CALIXTO, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2100–2106, 2011.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SAHA, D.; ROMAN, C.; BEAUCHAMP, D. New Strategies for Colorectal Cancer Prevention and Treatment. **World J Sur**, v.26, p.762-766, 2002.

SCHAUSS, A. G., et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006.

SCHMOLL HJ, VAN CUTSEM E, STEIN A, VALENTINI V, GLIMELIUS B, HAUSTERMANS K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. **Ann Oncol**.v. 23, n. 10, p. 2479-516, 2012.

SCHOEN, R. E.; PINSKY, P. F.; WEISSFELD, J. L.; YOKOCHI, L. A.; CHURCH, T.; LAIYEMO, A. O.; BRESALIER, R.; ANDRIOLE, G. L.; BUYS, S. S.; CRAWFORD, E. D.; FOUAD, M. N.; ISAACS, C.; JOHNSON, C. C.; REDING, D. J.; O'BRIEN, B.; CARRICK, D. M.; WRIGHT, P.; RILEY, T. L.; PURDUE, M. P.; IZMIRLIAN, G.; KRAMER, B. S.; MILLER, A. B.; GOHAGAN, J. K.; PROROK, P. C.; BERG, C. D.; PLCO PROJECT TEAM. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. **New England Journal of Medicine**. v. 366, 2012, p. 2345-57.

SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of Juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015.

SCOTT-STUMP, S.; MAHAN, L. K. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 9ª ed., São Paulo: Roca, 2002.

SEBOLT-LEOPOLD JS, HERRERA R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. **Nat Rev Cancer**. v. 4, n. 12, p. 937-47, 2004.



HENG, Y. ABREU, I. A.; CABELLI, D. E.; MARONEY, M. J.; MILLER, A. F.; TEIXEIRA, M.; VALENTINE, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chem. Rev.**, v. 114, p. 3854–3918, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FEDEWA, S. A.; AHNEN, D. J.; MEESTER, R. G. S.; BARZI, A.; JEMAL, A. Colorectal Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin**, v. 67, p. 177–193, 2017.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chemie.*; **Int. Ed. Engl.**, v. 25, n. 12, p. 1058-71, 1986.

SINGH, B. C., BAG, P. P., KUMAKURA, F., IWAOKA, M. & PRIYADARSINI, K. I. Role of substrate reactivity in the glutathione peroxidase (GPx) activity of selenocystine. **Bulletin of the chemical society of Japan**, v. 83, n. 6, p. 703-708. 2010

SILVA, M.G.C.P.C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. **Comparação nutricional da polpa dos frutos de Juçara e de açai**. Ilhéus: Centro de Pasquisa do Cacau, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, 2004.

SIU I.; PRETLOW T. G.; AMINI S. B.; PRETLOW T. P. Identification of Dysplasia in Human Colonic Aberrant Crypt Foci. **American Journal of Pathology**, v. 150, n.º. 5, p. 1805-1813, 1997.

SKRZYCKI, M.; MAJEWSKA, M.; PODSIAD, M.; CZECZOT, H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal câncer. **Acta. Bio. Pol.**, v. 56, n. 4, p. 663–670, 2009.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKI, S.; KODA, M.; ZALEWSKI, B.; KANCZUGA-KODA, L.; SULKOWSKA, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal câncer. **World Journal of Gastroenterology**, 2005;11(3):403-406.

SOMWAR, R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; LARSSON, E.; SHUM, D.; LOCKWOOD, W. W.; YANG, G.; SANDER, C.; OUFERELLI, O.; TEMPST, P. J.; DJABALLAH, H.; ET AL. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 108, p. 16375–16380, 2011.

SON, M.; ELLIOTT, J. L. Mitochondrial defects in transgenic mice expressing Cu,Zn Superoxide Dismutase mutations, the role of Copper Chaperone for SOD1. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 336, p.1–7, 2014.

SONG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244-60, 2015.

SOREIDE, K.; JANSSEN, E. A. M.; SOILAND, H.; KORNERH.; BAAK, J. P. A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 93, p. 395–406, 2006.

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

SUNAGA, N.; KHONO, T.; SHINMURA, K.; SAITOH, T.; MATSUDA, T.; SAITO, R. YOKOTA, J. OGGI protein suppresses G:C>T:A mutation in a shuttle vector containing 8-hydroxyguanine in human cells. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1355–1362, 2001.

SUZUKI, Y.; ALI, M.; FISCHER, M.; RIEMER, J. Human copper chaperone for superoxide dismutase 1 mediates its own oxidation-dependent import into mitochondria. **NATURE COMMUNICATIONS**. v. 4, p. 2430, 2013.

TAGUCHI, A.; RHO, J.; YAN, Q.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; XU, Y.; TRIPATHI, S. C.; WANG, H.; BRENNER, D. E.; KUCHERLAPATI, M.; KUCHERLAPATI, R.; BOUTIN, A. T.; WANG, Y. A.; DEPINHO, R. A.; FENG, Z.; PE, P. D. L.; HANASH, S. M. MAPRE1 as a plasma biomarker for early-stage colorectal cancer and adenomas. **Cancer Prev Res (Phila)**. v. 8, n. 11, p. 1112–1119, 2015.

TAN, C.; DU, X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. **World J Gastroenterol**. v. 18, p. 5171:80, 2012.

THISSE, C.; DEGRAVE, A.; KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; KROL, A.; THISSE, B.; LESCURE, A. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. **Gene Expr Patterns** v. 3, p. 525–532, 2003.

TORRE, L. A.; SIEGEL, R. L.; WARD, E. M.; JEMAL, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - an update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**; v. 25, p. 16-27; 2016.

TOPPO, S.; VANIN, S.; BOSELLO, V.; TOSATTO, S.C. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily, **Antioxid. Redox Signal**. v. 10, p. 1501–1514, 2008.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, p. 87–108, 2015.

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

TUDEK B, SPEINA E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. **Mutat Res**. v. 736, n. 1-2, p. 82-92, 2012.

URSINI, F. ; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R. K.D. AUMANN, R.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHE, L. Diversity of glutathione peroxidases, **Methods Enzymol**. v. 252, p. 38–53, 1995.

UTOMO, A.; JIANG, X.; FURUTA, S.; YUN, J.; LEVIN, D.S.; WANG, Y.C.; DESAI, K.V.; GREEN, J.E.; CHEN, P.L.; LEE, W.H. Identification of a novel putative non-

selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p.43522-9, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2006

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

VALENTINE, J.S., DOUCETTE, P.A., e ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis, **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 563-93, 2005.

VAN DRIEL, B. E.; LYON, H.; HOOGENRAAD, D. C.; ANTEN, S.; HANSEN, U.; VAN NOORDEN, C. J. Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, p. 435–444, 1997.

VARELA-REY, M.; WOODHOO, A.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; MATO, J. M.; LU, S. C. Alcohol, DNA methylation, and cancer. **Alcohol Res.** v. 35, n. 1, p. 25–35, 2013.

VASCONSELOS SML, GOULART MOF, MOURA JBF, MANFREDINI VL, BENFATO MS, KUBOTA LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova** v. 30, p. 1323-1338. 2007.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENAD, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-9, 2014.

VASQUES ALR, PERES MA. Tendência temporal da mortalidade por câncer de cólon e reto em Santa Catarina no período entre 1980 a 2006. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v. 19, n. 2, p. 91-100, 2010.

VICENTE, S. J. V., ISHIMOTO, E. Y., CRUZ, R. J., PEREIRA, C. D. S., TORRES, E. A. F. S. Increase of the Activity of Phase II Antioxidant Enzymes in Rats after a Single Dose of Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10887-10892, 2011.

VIDAL, A. E.; BOITEUX, S.; HICKSON, I. D.; RADICELLA, J. P. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. **EMBO J**, v. 20, n. 22, p. 6530–9, 2001.

VOLP, A. C. P., et al. Flavonóides Antocianinas: característica e propriedade na nutrição e saúde. **Ver. Bras. Nutr. Clin.** V. 23, n.2, p 141-149, 2008.

WALLACE, S.; MURPHY, D.; SWEASY, J. Base excision repair and cancer. **Cancer**

**letters**, v. 327, p. 73–89, 2012.

WALTER, V.; JANSEN, L.; HOFFMEISTER, M.; BRENNER, H. Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol**, v. 25, n. 8, p. 1517–25, 2014.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 281-290, 2008.

WANG, S. H.; WANG, Y. Z.; ZHANG, K. Y.; SHEN, J. H.; ZHOU, H. Q.; QIU, X. Y. Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 4305–4310, 2005.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer treatment reviews**, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide data – Colorectal cancer**. Disponível em: < <https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>>. Acessado em: 03 de setembro de 2018.

WHO - World Health Organization. Globocan 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: < [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acessado em: 14 de julho de 2017.

WILLIAMS, R. S.; KUNKEL, T. A. FEN nucleases: bind, bend, fray, cut. **Cell**. V. 145, n. 2, p. 171–2, 2011.

WIN, A. K.; YOUNG, J. P.; LINDOR, N. M.; et al. Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. **J Clin Oncol**. v. 30, p. 958–964, 2012.

WOOD, L. D.; SALARIA, S. N.; CRUISE, M. W.; GIARDIELLO, F. M.; MONTGOMERY, E. A. Upper GI Tract Lesions in Familial Adenomatous Polyposis (FAP): Enrichment of Pyloric Gland Adenomas and Other Gastric and Duodenal Neoplasms. **Am J Surg Pathol.**, v. 38, n. 3, p. 389–393, 2014.

XU T.; NIE, Y.; BAI, J.; LI, L.; YANG, B.; ZHENG, G.; ZHANG, J.; YU, J.; CHENG, X.; JIAO, J.; JING, H. Suppression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) augments ultrasound-induced apoptosis in cervical cancer cells. **Ultrasonics** v. 72, p. 1–14, 2016.

YAMADE, L.; SCAPULATEMPO-NETO, C; REIS, R. M.; GUIMARÃES, D. P. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. **World J Gastroenterol**. v. 20, n. 10, p. 2634-2640, 2014.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chem. Rev.**, v, 111, n. 1, p. 5944–5972, 2011.

YOUNG, J.; JENKINS, M.; PARRY, S.; YOUNG, B.; NANCARROW, D.; ENGLISH, D.; GILES, G.; JASS, J. Serrated pathway colorectal Cancer in the population: Genetic consideration. **Gut**, v. 56, p. 1453–1459, 2007.

ZHANG H, FORMAN HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. **Semin Cell Dev Biol**. v. 23, n. 7, p. 722–728, 2012.

ZHAO, M.; WANG, P.; ZHU, Y.; LIU, X.; HU, X.; CHEN, F. Blueberry anthocyanins extract inhibits acrylamide-induced diverse toxicity in mice by preventing oxidative stress and cytochrome P450 2E1 activation. **Journal of functional foods** v. 14, p. 95–101, 2015.

ZIECH D, FRANCO R, PAPP A, PANAYIOTIDIS MI. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutat Res**. v. 711, p. 167–73, 2011.