



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JULIANA DALBÓ

**EFEITO DA POLPA E EXTRATO DO FRUTO JUÇARA (*EUTERPE
EDULIS MARTIUS*) EM CÂNCER COLORRETAL: ESTUDO *IN VITRO*
E *IN VIVO***

VITÓRIA-ES

2020

JULIANA DALBÓ

EFEITO DA POLPA E EXTRATO DO FRUTO JUÇARA (*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) EM CÂNCER COLORRETAL: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

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 Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

VITÓRIA-ES

2020

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

D137e Dalbó, Juliana, 1991-
Efeito da polpa e extrato do fruto juçara (*Euterpe Edulis*
Martius) em câncer colorretal: Estudo in vitro e in vivo / Juliana
Dalbó. - 2020.
121 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. Nutrição. 2. Fruto. 3. Câncer. 4. Apoptose. 5. Marcadores
bioquímicos. 6. Antioxidantes. I. Silva, Adriana Madeira Álvares
da. II. Trivilin, Leonardo Oliveira. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA DALBÓ

EFEITO DA POLPA E EXTRATO DO FRUTO JUÇARA (*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) EM CÂNCER COLORRETAL: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

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 Doutor em Biotecnologia. Biotecnologia.

Apresentada em 23 de abril de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva

(Orientadora)

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

(Coorientador)

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

(Examinador Interno - RENORBIO-UFES)

Prof.^a Dr.^a Greiciane Gaburro Paneto

(Examinadora Externa - UFES)

Prof. Dr. Fábio Dumas Nunes

(Examinador Externo – USP)

Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes

(Examinador Externo – UFPI)

Dedico este trabalho à minha família, que sempre contribuiu com minha bagagem de conhecimentos. Eles são responsáveis pela maior herança da minha vida: meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Universo, no qual, tudo existe: os pensamentos, as descobertas, as oportunidades...;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFES, vinculado à Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

À CAPES, pela bolsa de estudos, sem ela tudo isso seria muito mais difícil;

À FAPES, pela concessão de recursos financeiros para o custeio desta pesquisa;

A minha orientadora, Professora Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva, pelos ensinamentos, amizade e confiança no meu trabalho;

Ao Professor Dr. Leonardo Oliveira Trivillin, pela parceria e contribuições no desenvolvimento do projeto;

Ao Professor Dr. Iuri Drumund Louro, pela confiança, parceria e contribuições no desenvolvimento do projeto;

Ao Professor Dr. Fábio Daumas Nunes, pelos ensinamentos e parceria;

Aos meus companheiros de pesquisa no Núcleo de Pesquisa em Saúde da UFES, pela amizade e colaboração;

Aos alunos e técnicos do Laboratório de Biologia de Células Tronco e Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da USP, pelo apoio e carinho;

Ao Professor Dr. Niels Olsen Saraiva Camara, pela doação das linhagens de células;

Ao Professor Dr. Francemilson Goulart da Silva, pelas instruções sobre o protocolo de cultivo celular;

A Professora Dra. Jankerle Neves Boeloni, pela parceria e contribuição na leitura das lâminas histopatológicas;

A Professora Dra. Flávia Vitorino Freitas e Renan Köpp Hollunder, pelo auxílio na estatística;

Aos técnicos de laboratórios Bruno Régis Lyrio Ferraz (Biotecnologia), Viviane Tavares de Paula (Morfologia) e Magda Delorence Lugon (Bioquímica) do CCENS da UFES, pela assistência no desenvolvimento das técnicas;

Aos meus parceiros da “A geração ciência”, Vinicius de Oliveira Mussi, Igor Augusto Gusman Cunha e Sanderson Dias Calixto pelo apoio e motivação em fazer ciência.

Aos meus familiares pelo apoio e amor singular, bem como aos meus amigos que destinam a mim seu afeto e bem querer.

RESUMO

A ação no combate ao estresse oxidativo e no aumento de apoptose em células de câncer colorretal têm sido demonstrados pela ingestão de compostos bioativos constituintes dos alimentos e no fruto juçara. Haja vista que o câncer colorretal está entre as três principais neoplasias com maior taxa de incidência e mortalidade em todo o mundo. O presente trabalho objetivou analisar o efeito *in vitro* e *in vivo* do suco de polpa e extrato do fruto juçara em câncer colorretal. Células Ht-29 e Caco-2 foram expostas a diferentes concentrações de polpa e extrato do fruto juçara por 24 horas e posteriormente analisadas por qRT-PCR. Para análise em *in vivo* utilizou-se 43 ratos machos Wistar, dividido em grupo controle (n=11) e induzido ao câncer colorretal (n=32). O suco e o extrato da polpa de juçara foram utilizados para suplementação dos ratos induzidos a carcinogênese. O ganho de peso corporal, o consumo alimentar, perfil bioquímico e hematológico foram avaliados. Bem como, quantificou-se focos de criptas aberrantes e lesões neoplásicas, mucinas em mucosa colorretal, imunohistoquímica e caracterização histopatológica de adenocarcinoma tubular. Foi observado no estudo *in vitro* diminuição significativa da expressão gênica de Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 nas células Ht-29 e Caco-2 expostas ao extrato e a polpa do fruto juçara. Nos animais induzidos a carcinogênese observou-se perda de peso corpóreo e menor consumo alimentar. Evidenciou-se também diminuição dos níveis de aspartato aminotransferase e dos níveis de albumina sérica e aumento nos níveis de alanina aminotransferase no grupo suplementado com polpa. As lipoproteínas de baixa densidade no grupo suplementado com extrato também tiveram aumento. Além disso, ocorreu diminuição de 50,06% dos focos de criptas aberrantes atribuídos a suplementação com o suco da polpa do fruto Juçara. Constatou-se o aumento do número de placa de peyer no grupo suplementado com extrato; do percentual de mucinas ácidas; da expressão de Keap1 no grupo suplementado com suco de polpa. Mediante análise dos resultados foi possível inferir que o fruto juçara aumenta a sobrevivência das células cancerígenas *in vitro*. Além disso, afeta significativamente o consumo alimentar e o ganho de peso corporal, com efeitos negativos sobre a albumina sérica e marcadores bioquímicos hepáticos como alanina aminotransferase e lipoproteína de baixa densidade. Logo o suco da polpa do fruto juçara apresenta ação protetora na fase inicial do desenvolvimento de câncer colorretal, atuando na prevenção do aparecimento de criptas aberrantes e na regulação dos níveis de aspartato aminotransferase e Keap1, bem como na proteção da mucosa cólica.

Palavras chaves: Substâncias bioativas; Via Keap1/Nrf2; Apoptose; Marcadores bioquímicos; Efeito nutricional.

ABSTRACT

Action in combat oxidative stress and increase apoptosis in colorectal cancer cells have been shown by the ingestion of bioactive compounds that constitute food and juçara fruit. Having seen that colorectal cancer is among the three main neoplasms with the highest incidence and mortality rate worldwide. The present work aimed to analyze the *in vitro* and *in vivo* effect of pulp juice and extract of phenolic substances from juçara fruit in colorectal cancer. Ht-29 and Caco-2 cells were exposed to different concentrations of pulp and extract of juçara fruit for 24 hours and analyzed by qRT-PCR. For *in vivo* analysis, 43 male Wistar rats were used, divided in control group (n=11) and induced to colorectal cancer (n=32). Juçara pulp juice and extract were used for supplementation of rats induced by colorectal carcinogenesis. Body weight gain, food consumption, biochemical and hematological profile were evaluated. Still, foci of aberrant crypts and neoplastic lesions, mucins in colorectal mucosa, immunohistochemistry and histopathological characterization of tubular adenocarcinoma were analyzed. A significant decrease in gene expression of Nrf2, Keap1, Bax and Caspase 3 was observed in the *in vitro* study in Ht-29 and Caco-2 cells exposed to extract and pulp of juçara fruit. In animals induced to carcinogenesis, loss of body weight and lower food consumption were observed. There was also a decrease in aspartate aminotransferase and serum albumin levels and increase in alanine aminotransferase levels in the group supplemented with pulp. Low density lipoproteins in the extract supplemented group also increased. In addition, there was a 50.06% decrease in outbreaks of aberrant crypts attributed to supplementation with pulp juice of juçara fruit. There was an increase in number of peyer plates in the group supplemented with extract; percentage of acidic mucins and expression of Keap1 in the group supplemented with pulp juice. By analyzing the results it was possible to infer that juçara fruit increases the survival of cancer cells *in vitro*. In addition, it significantly affects food consumption and body weight gain, with negative effects on serum albumin and liver biochemical markers such as alanine aminotransferase and low density lipoprotein. Therefore, juçara fruit pulp juice has a protective action in the early stage of colorectal cancer development, acting to prevent the appearance of aberrant crypts and to regulate the levels of aspartate aminotransferase and Keap1, as well as to protect the colic mucosa.

Keywords: Bioactive substances; Via Keap1/Nrf2; Apoptosis; Biochemical markers; Nutritional effect.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Palmeira Euterpe Edulis Martius com frutos juçara.....	19
Figura 2 - Via de sinalização Nrf2/Keap1.....	26
Figura 3 - Via de regulação da apoptose	29
Figura 4 - Via de ativação da apoptose.....	30

CAPITULO 1

Figura 1 - Efeito in vitro da viabilidade em linhagem celular de adenocarcinoma colorretal (HT-29) incubadas com polpa e extrato de substâncias fenólicas do fruto Juçara.....	41
Figura 2 - Efeito in vitro da viabilidade em linhagem celular de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) incubadas com suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas do fruto Juçara.....	42
Figura 3 - Perfil de expressão dos genes Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 em linhagem celular de HT-29 expostas a diferentes concentrações de polpa do fruto Juçara.....	43
Figura 4 - Perfil de expressão dos genes Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 em linhagem celular de HT-29 expostas a concentração de Extrato de substâncias fenólicas.....	45
Figura 5 - Perfil de expressão dos genes Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 em linhagem celular de Caco-2 expostas a diferentes concentrações de polpa do fruto juçara.....	47
Figura 6 - Perfil de expressão dos genes Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 em linhagem celular de Caco-2 expostas a diferentes concentrações de extrato de substâncias fenólicas.....	48

CAPITULO 2

Figure 1 - Methodology development representation used in the experimete.....	63
--	----

Figure 2 - Body weight gain of rats submitted or not to colorectal carcinogenesis.....	65
Figure 3 - Food consumption of rats.....	66
Figure 4 - Aspartate aminotransferase and alanine transferase levels.....	67
Figure 5 - Total cholesterol, HDL, LDL and VLDL levels.....	68
Figure 6 - Triglyceride, serum albumin and total plasma protein levels.....	69
Figure 7 . Leukogram, erythrogram, hemoglobin and hematocrit levels.....	70
Figure 8 . Relative values of leukogram.....	71

CAPITULO 3

Figura 1 - Média de focos de criptas aberrantes encontrados em mucosa colorretal	90
Figura 2 - Análise de placas de peyer em mucosa colorretal.....	91
Figura 3 - Análises de lesões em mucosa colorretal na 23 ^a semana de experimento	92
Figura 4 - Análise de mucinas por porcentagem média de área corada.....	94
Figura 5 - Análise da expressão da proteína e índice apoptótico.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT** - Alanina aminotransferase
- Apaf-1** - Apoptotic protease activating factor 1
- APC** - Polipose adenomatosa coli
- ARE** - Antioxidant response elements
- AST** - Aspartato aminotransferase
- Bax**- BCL-2-associated X protein
- Bcl-2** - B-cell lymphoma 2
- Bcl-xL** - B-cell lymphoma-extra large
- BRAF** - Proto-oncogene B-Raf
- BTB** - Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a' brac
- bZIP** - Fatores de transcrição de zíper de leucina básica
- CAD** - Caspase-activated DNase
- CCR** - Câncer colorretal
- CNC** - Cap-n-colar
- CTR** - Região Carboxi-terminal
- CuI3** - Cul3-based ubiquitin E3 ligase complex
- DGR** - Double-glycine repeat
- DMH** - 1,2-dimetillidrazina
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- EpRE** - Elemento de resposta eletrolítica
- ERK** - Extracellular signal-regulated kinases
- ERN** - Espécies reativas nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FADD - Fas-associated death domain

FCA - Focos de criptas aberrantes

GPx - Catalase, glutathione peroxidase

Gr - Glutathione reductase

HDL - Lipoproteína de alta densidade

ICAD - Inhibitor of CAD

INrf2 - Inibidor citosólico do complexo Nrf2

IVR - Região de Intervenção

Keap1 - Kelch-like ECH-associated Protein

K-ras - V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MAPKs - Mitogen-activated protein kinase

MLH1 - MutL homolog 1

Nrf2 - Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2] - related factor 2

NTR - Região AminoTerminal

Rbx1 - Ring box protein 1

rTNF - Receptores de fatores de necrose tumoral

sMaf - Small musculoaponeurotic fibrosarcoma

SOD - Superóxido dismutase

TGFβRII - Fator de crescimento transformante β

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivo específico.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.2 Fruto da palmeira Jussara (<i>Euterpe edulis</i> Martius).....	19
3.3 Substâncias fenólicas	20
3.4 Radicais livres e sistema de defesa antioxidante	21
3.5 Via Nef2/Keap1	24
3.6 Apoptose	27
3.7 Câncer colorretal (CCR).....	31
4 CAPITULO 1.....	35
5 CAPITULO 2	58
6 CAPITULO 3.....	81
7 CONCLUSÃO	109
8 REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

A palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius) é nativa da Mata Atlântica brasileira e produz frutos com importante valor nutricional, constituído de proteínas, açúcares, fibras, fração lipídica, vitaminas E e C, além de minerais e micronutriente β -caroteno (INADA et al., 2015; GUERGOLETTTO et al., 2016). O fruto Juçara também se destaca pelas substâncias com ação antioxidante, como ácidos benzoico, cafêico, clorogênico, ferúlico, protocatecuíco, *p*-cumárico, siríngico, vanílico, saponinas e antocianinas (MARTINS, 2016; MOREIRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; BARROSO et al., 2019).

As substâncias antioxidantes são caracterizadas pela ação molecular envolvidas no combate ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2011). Os polifenóis por exemplo são capazes de modular a ativação da via Nrf2/ Keap1 na presença do mesmo (SCAPAGNINI et al., 2011). A via Nrf2/ Keap1 atua na manutenção da homeostase celular, no sistema de detoxificação e na apoptose, na qual ativa genes anti e pro-apoptótico, tais como Bcl-xL e Bax e subsequente ativação de Caspase 3 pelo gene pro-apoptótico (NITURE; JAISWAL, 2011).

A desregulação da apoptose apresenta um papel importante no desenvolvimento de câncer colorretal, uma vez que, a expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose (Ge et al., 2017). Essa desregulação juntamente com outras alterações genéticas, resulta em modificações da mucosa colônica normal para lesões pré-malignas como focos de criptas aberrantes nas quais, podem evoluir para displasia e subsequente para adenomas ou carcinomas (BENEDIX et al., 2011; GE et al., 2017), somado à ocorrência de características clínicas para a doença que influenciam diretamente na qualidade de vida do paciente (CARAM et al., 2012).

A quimioprevenção o desenvolvimento do câncer colorretal, bem como das características clínicas causadas pela doença pode ser alcançada pelo consumo de substâncias dietéticas como as contidas em frutas e vegetais (MOURA et al., 2012). Assim, a compreensão da ação dos compostos bioativos presentes no fruto Jussara na iniciação e promoção do câncer colorretal, bem como na regulação e ativação da

via Nrf2/Keap1 auxiliaria nos estudos que torna essa via um alvo molecular promissor para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento do câncer. 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. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito *in vitro* e *in vivo* do suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas do fruto Juçara em câncer colorretal.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito *in vitro* e *in vivo* do suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas do fruto Juçara em câncer colorretal.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar o efeito *in vitro* da suplementação com fruto Juçara, na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas, na intensidade de expressão gênica de Nrf2, Keap1, Bax e Caspase 3 em linhagens celular de adenocarcinoma colorretal Caco-2 e HT-29, pela técnica de RT-qPCR;
- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com fruto Juçara na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas no peso de ratos submetidos à carcinogênese com o agente 1,2-dimetilidrazina (DMH);
- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com fruto Juçara na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas em parâmetros bioquímicos, tais como: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicéride, albumina sérica, proteína plasmática total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) de ratos submetidos à carcinogênese com o agente 1,2-dimetilidrazina (DMH);
- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com fruto Juçara na forma suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas em parâmetros hematológicos, tais como: hemoglobina, hematócrito, eritrócito, leucócito total, linfócito, neutrófilo, monócito, basófilo e eosinófilo de ratos submetidos à carcinogênese com o agente 1,2-dimetilidrazina (DMH);
- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com fruto Juçara na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas em mucinas ácidas e básicas em

mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com o agente 1,2-dimetilidrazina (DMH);

- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com o fruto Juçara, na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas, no desenvolvimento neoplásico, pela quantificação de focos de criptas aberrantes em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com o agente 1,2-dimetilidrazina (DMH);
- Avaliar o efeito *in vivo* da suplementação com fruto Juçara, na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas, no desenvolvimento neoplásico quantificando o número de tumores desenvolvidos após 23 semanas de experimentação;
- Avaliar o efeito do fruto Juçara, na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas, nas características anatomopatológicas dos tumores desenvolvidos;
- Avaliar o efeito do fruto Juçara, na forma de suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas, na intensidade de expressão proteica dos genes Nrf2, Keap1, Bcl-xL, Bax e Caspase-3 em lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) e nos tumores, pela técnica de imuno-histoquímica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.2 Fruto da palmeira Jussara (*Euterpe edulis* Martius)

O *Euterpe Edulis* Martius, faz parte de um gênero botânico de palmeira, da família *Arecaceae*, cujo fruto produzido chama-se Juçara. A palmeira é nativa da Mata Atlântica brasileira e produzidas nos estados de Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BORGES et al., 2011).

A extração do palmito culminou na extinção da espécie nas áreas originais, visto que é necessário o corte da árvore para retirada do mesmo (PEREIRA et al., 2018). Assim, incentivou-se a produção dos frutos, tornando-se fonte de renda para as comunidades na Mata Atlântica e uma alternativa para a manutenção da espécie (COSTA et al, 2006; SILVA et al., 2013). Além disso, o processo de despulpamento utilizado para extrair a polpa, permite recuperar uma grande quantidade de sementes, na qual pode ser utilizada para aumentar as populações do *Euterpe Edulis* Martius (COSTA et al., 2008). Ademais, a palmeira desempenha um papel fundamental no ecossistema, fornecendo nutrição a fauna da Mata Atlântica por meio de seus frutos (REIS; KAGEYAMA, 2000).

O fruto Juçara é arredondado, carnoso e fibroso, com apenas uma semente de aproximadamente 1,45 cm de diâmetro, correspondendo a 73,46% do peso do fruto (OLIVEIRA, 2002). O fruto é revestido por uma fina casca de coloração roxa escura quase negra, proveniente de um pigmento natural presente no fruto, a antocianina (Figura 1) (MOREIRA et al., 2017).



Figura 1. Palmeira *Euterpe Edulis* Martius com frutos juçara (PESSOA, 2018).

O fruto também é constituído por minerais, tais como fósforo, enxofre, potássio, cálcio e magnésio em maior quantidade, seguido do sódio, cobalto, alumínio e ferro. Em menores quantidades possui manganês, zinco, cobre, boro e molibdênio (SILVA et al., 2013), e ainda o micronutriente β -caroteno (NOVELLO, 2011). Ademais, o fruto apresenta um importante valor nutricional, por ser constituído de proteínas, açúcares, fibras e fração lipídica, com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e menor teor de lipídios saturados (GUERGOLETTTO et al., 2016).

Além de nutrientes, o fruto é constituído por vários compostos bioativos como os ácidos benzoico, cafeico, clorogênico, ferúlico, protocatecuico, *p*-cumárico, ainda, possui siríngico, vanílico, flavonoides e saponinas. Assim, apresenta elevados teores de substâncias fenólicas que contribuem para a atividade antioxidante desses frutos (BORGES et al., 2011).

3.3 Substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas são originadas do metabolismo secundário das plantas, essenciais para crescimento e reprodução da mesma (ROCKENBACH et al., 2008). Esses compostos também são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa da planta, no qual, podem ser formados mesmo em condições de estresse, como infecções, fermentos e radiações UV (NACZK; SHAHIDI, 2006; LAGANÀ et al., 2019).

Os fenólicos possuem em sua estrutura um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos com seus grupos funcionais. As substâncias fenólicas de maior ocorrência natural, apresentam-se conjugadas ao mono e polissacarídeos por um ou mais grupo fenólico e também podem ter a forma de derivados funcionais, como os ésteres e metil ésteres (ANGELO; JORGE, 2007; LEE; DELANEY; LIPMAN, 2012).

As substâncias fenólicas são descritas como o maior grupo de antioxidantes naturais (ABDRABBA; HUSSEIN, 2015) e podem ser encontrados principalmente em frutas cítricas, cereja, uva, ameixa, pêra (ANGELO; JORGE, 2007) e Jussara (BORGES et al., 2011). Existem cerca de 8.000 tipos de substâncias fenólicas, dos quais, se destacam os taninos, ácidos fenólicos, fenóis simples, tocoferóis, cumarinas, ligninas e flavonoides (ANGELO; JORGE, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, caracterizados pela capacidade antioxidante (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; LOPES et al., 2010). A estrutura básica dos flavonoides consiste de um núcleo flavilium formado por quinze átomos de carbono arranjados em uma configuração de três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos e um pirano (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os flavonoides possuem várias classes, sendo as principais: flavanas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides (LAZARY, 2010), chalconas, auronas e antocianinas (BRAVO, 1998). Dentre essas classes de flavonoides destacam-se as antocianinas, um pigmento natural amplamente distribuído na natureza. As antocianinas são definidas quimicamente como glicosídeos de antocianidinas e caracterizadas por polihidroxi e/ou polimetoxi derivados do 2- fenilbenzopirilium, ou cátion flavilium (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Nos vegetais as antocianinas conferem diversas cores como azul, violeta, magenta, laranja e vermelho (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010) e ainda, desempenham atividades antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica (TAIZ; ZEIGER, 2009). Existem aproximadamente 400 tipos de antocianinas na natureza, no qual, se distinguem pelo número de grupos hidroxila e/ou grupos metoxi ou ainda pelo número de ácidos alifáticos ou aromáticos no tipo, no número e nos sítios de ligação de açúcares da molécula (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As antocianinas são muito utilizadas na coloração de alimentos pela indústria alimentícia, no entanto essas substâncias também apresentam propriedades terapêuticas com ação antioxidante (KAPADIA et al., 1997). Esta ação antioxidante das antocianinas está relacionada a presença de hidroxilas fenólicas e as propriedades de oxirredução, na qual permite atuar na redução e doação de hidrogênio, possibilitando-as reagir com os radicais livres e impedir ou diminuir o estresse oxidativo (FONSECA et al., 2002).

3.4 Radicais livres e sistema de defesa antioxidante

Os radicais livres são espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), produzidos naturalmente no organismo, formados por moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm oxigênio e presença de um elétron não pareado na sua órbita externa (KUMAR; PANDEY, 2015). Essas moléculas são capazes de reagir com outras moléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e o ácido desoxirribonucleico, contra as quais colidem e retira elétrons destas substâncias e modifica suas estruturas moleculares (HALLIWELL, 1994; YU, 1994).

Os radicais livres são produzidos nas mitocôndrias onde o oxigênio sofre redução no processo de geração de ATP e recebe quatro elétrons, formando água. No final da cadeia transportadora de elétrons a citocromo oxidase catalisa quatro moléculas de citocromo c, retirando um elétron de cada molécula, em seguida esses elétrons são adicionados ao oxigênio para dar origem à água. Parte do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias segue para o citoplasma e para a membrana celular, nesses locais o oxigênio é reduzido pela ação de enzimas específicas presentes na membrana celular e pela utilização de íons ferro e cobre. A redução do oxigênio origina superóxidos, hidroxilas e peróxidos de hidrogênio (BARBOSA et al., 2010).

Em condições normais existem mecanismos antioxidantes para realizar o controle da produção dos radicais livres, no qual podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos pela dieta (HALLIWELL, 2007). Os radicais livres, quando em baixa quantidade, desempenham papéis fisiológicos importantes como ativação do sistema imunológico, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas (BLATT, 2013).

Entretanto, quando há um desbalanço entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, ou seja, à oxidação de biomoléculas (OLIVEIRA et al., 2011). A perda da função e da homeostase dessas moléculas causa a produção de compostos tóxicos ou dano tecidual, como oxidação da camada lipídica da membrana celular e danos as proteínas e ao DNA. Essas alterações induzidas pelo estresse oxidativo têm um papel central na carcinogênese e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, inflamatórias e cardiovasculares (COOKE et al., 2003; BARBOSA et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante é responsável pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Estes mecanismos de defesa, podem ser

por ação enzimática (SIES, 1993), tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Ou ainda, por ações antioxidantes não enzimáticas, na qual, envolve o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), tióis, bilirrubina, glutathione, carotenoides e flavonoides (MARITIM et al., 2003). A atividade antioxidante dessas substâncias está relacionada principalmente às suas propriedades de óxido-redução que desempenha um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres por indisponibilidade do oxigênio ou decomposição de peróxidos (DEGASPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Dentre as substâncias, os flavonoides são os antioxidantes mais ativos e frequentemente encontrados nas frutas e vegetais, no qual, se destacam pela capacidade de sequestrar radicais livres (HALLIWELL et al., 1995). Da mesma forma, as vitaminas A, E, C e carotenoides também atuam na interceptação de radicais livres, impedindo danos sobre os lipídeos, aminoácidos, ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA (GEY, 1998). Além disso, as vitaminas A, E e C, junto com o mineral zinco (CÓRDOVA; ALVAREZ-MON, 1995) agem na proteção da membrana celular diante dos radicais que atacam as lipoproteínas de baixa densidade (STEINBERG, 1991).

Os ácidos graxos insaturados (CHENG; WANG; SHAO, 2016), também são reconhecidos por atuarem na modulação da função celular. Estas substâncias são mediadoras intracelulares da transdução de sinais e como moduladores das interações entre células, assim como, no aumento ou diminuição da produção de radicais livres (SIDDIQUI et al., 2017).

Os antioxidantes também previnem danos hepáticos causados pela peroxidação lipídica e mantêm a regulação das enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (LIN et al., 2009). Sabe-se que essas substâncias apresentam ação na redução de glicemia em jejum e pós-prandial e no aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (OLIVEIRA et al., 2019), apresentando também, funcionalidade na diminuição dos níveis sanguíneos de triglicerídeos (ARAÚJO et al., 2014), colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (UDANI et al., 2011) e VLDL (KUO et al., 2009). Além disso, reduzem o número de células inflamatórias circulantes e atuam no aumento nos níveis de hematócrito e hemácias (LUDIDI et al., 2019).

Ainda, os antioxidantes presentes nos alimentos podem agir no reparo das lesões causadas pelos radicais como na remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas, bem como, podem inibir as reações em cadeia com o ferro e o cobre, impedindo a formação dos radicais livres (YIIN; LIN, 1998). Além disso, é relatado a ação dessas substâncias na parada do ciclo celular (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2013), em efeitos inibitórios na migração e invasividade das células de adenocarcinoma (LEE et al., 2011). Bem como, na redução da proliferação celular e na ativação da apoptose em células cancerígenas (SÁEZ et al., 2018).

Alguns estudos inclusive têm demonstrado a ação de compostos bioativos na modulação da via Nrf2/ Keap1 (SCAPAGNINI et al., 2011). Esta via atua na indução da expressão de genes codificadores de enzimas e proteínas antioxidantes, bem como, proteínas anti- e pró apoptóticas, como Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) e Bax (*BCL-2-associated X protein*) respectivamente (SUN et al., 2011; MILKOVIC; ZARKOVIC; SASO, 2017).

3.5 Via Nrf2/Keap1

O fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2] - related factor 2*) é membro da família cap-n-colar (CNC) e pertence a subfamília de fatores de transcrição de zíper de leucina básica (bZIP) (MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2007). O Nrf2 é codificado pelo gene fator nuclear (derivado dos eritrócitos), 2 tipo 2 (NFE2L2), localizado na posição 2q31.2 do cromossomo 2, no qual, codifica uma proteína de 605 aminoácidos (CHOI; KWAK, 2016). Este fator de transcrição tem a função de regular genes com sequências que contenham *antioxidant response elements* (ARE) nos seus promotores (MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2007).

Em condições basais o Nrf2 encontra-se no citoplasma ligado a proteína Keap1 (*do inglês - Kelch-like ECH-associated Protein 1*), também conhecida como inibidor citosólico do complexo Nrf2 (INrf2). A Keap1 pertence à família KLHL (DHANOA et al., 2013) e está ligada a actina que se encontra predominantemente no citosol (XIANG et al., 2014).

A proteína Keap1 contém 624 aminoácidos distribuídos em 5 domínios, a saber: NTR (*Região AminoTerminal*); CTR (*Região Carboxi-terminal*); IVR (*Região de Intervenção*); DGR (*double-glycine repeat*); e BTB (*Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a' brac*) (PANDEY et al., 2017). Estes três últimos domínios têm importante papel na ligação Keap1/Nrf2, o domínio BTB atua na homodimerização de duas proteínas Keap1 que permite a interação com o complexo Cul3 (*Cul3-based ubiquitin E3 ligase complex*) (FURUKAWA; XIONG, 2005).

O domínio IVR é rico em resíduos de cisteína, na presença do estresse oxidativo alguns resíduos de cisteína, como o Cys 151 e o Cys 288 presentes na molécula tornam-se oxidados e formam pontes de dissulfeto ou adutos covalentes que provoca uma mudança conformacional em Keap1 para prevenir a ubiquitinação e degradação de Nrf2 (MOON; GIACCIA, 2015). E o domínio DGR é responsável pela ligação de Keap1 com o domínio Neh2 de Nrf2 que regula negativamente a ativação de Nrf2 (ITOH et al., 1999; XIANG et al., 2014).

Em condições ausentes de stress oxidativo, o Nrf2 cuja semivida é aproximadamente 20 minutos (KATOH et al., 2005) é transportado pelo Keap1 até o complexo Cul3-Rbx1 (*E3-ubiquitin ligase complex/Ring box protein 1*). O complexo Cul3-Rbx1 marca por ubiquitinação o Nrf2 para degradação via proteossoma 26S. Assim, a quantidade de Nrf2 se mantém sempre baixa em condições fisiológicas (KOBAYASHI; KANG; OKAWA, 2004).

No entanto, quando a célula é exposta a estímulos estressores, tais como aumento de ERO e ERN, ocorre a inibição da atividade da ubiquitina-E3-ligase no complexo Keap1-Cul3ne com subsequente liberação do Nrf2. A dissociação Nrf2-Keap1 leva à diminuição da taxa de proteólise e aumenta Nrf2 no núcleo. No núcleo o Nrf2 associa-se com a proteína sMaf (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*), formando um heterodímero Nrf2/sMaf que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ao elemento de resposta eletrolítica (EpRE) localizados na região promotora dos genes alvos (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014).

Desta forma, o complexo Nrf2/sMaf ao se ligar em ARE ou EpRE inicia o processo de transcrição (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014), no qual pode transcrever mais de 100 genes (HAYES; MAHON, 2009). Após restabelecer a homeostase celular, a Keap1 se transloca para o núcleo e forma um complexo com Cul3 e Rbx1. Esse

complexo possibilita realizar a ligação de Keap1 com Nrf2 e levar o Nrf2 do citoplasma para degradação e assim controlar seus níveis dentro das células (Figura1) (LEE et al., 2007; NITURE; JAISWAL, 2013).

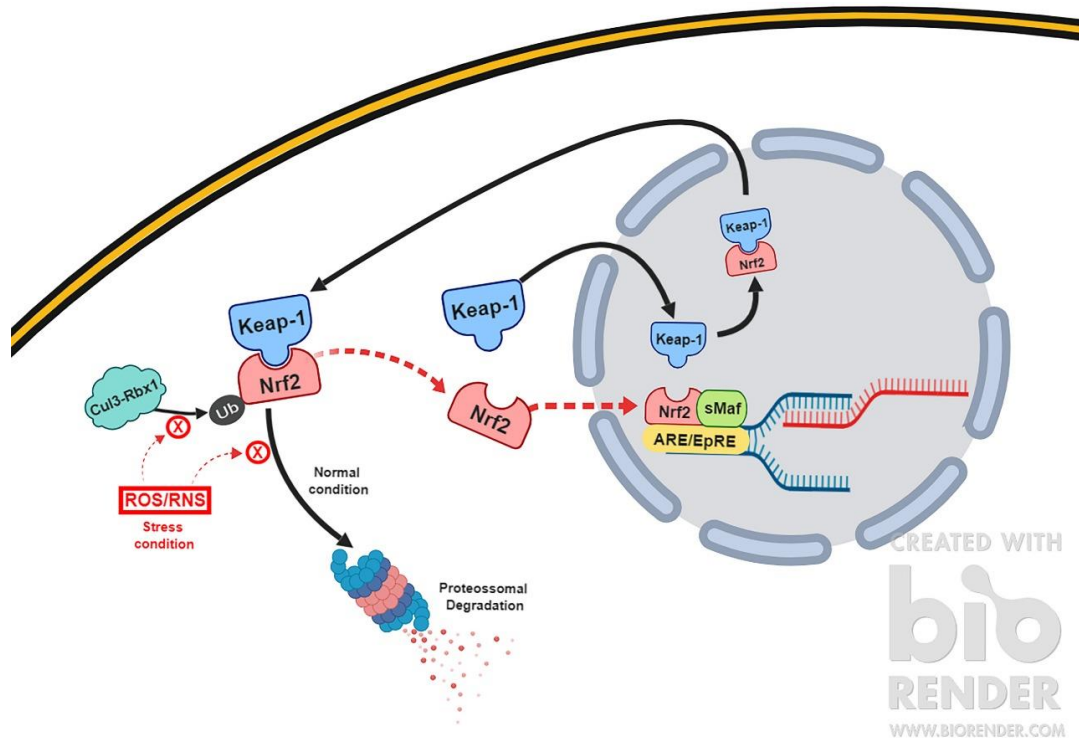


Figura 2. Via de sinalização Nrf2/Keap1. Em condições normais, o Nrf2 é constantemente ubiquitinado pela proteína Keap1 e degradado no proteossoma. Após a exposição ao estresse oxidativo, Keap1 é inativado e Nrf2 torna-se fosforilado. O Nrf2 acumula-se no núcleo e forma um complexo com sMaf, subsequentemente se ligam aos elementos ARE ou EpRE, ativando a expressão de muitos genes. Após restabelecer a homeostase celular, a Keap1 entra no núcleo e forma um complexo com Cul3 e Rbx1, esse complexo leva o Nrf2 para degradação.

Os genes ativados por Nrf2 atuam na manutenção da homeostase celular, no sistema de detoxificação e também na via de apoptose, como os genes Bcl-xL e Bax. Estudos tem verificado que a regulação de Bcl-xL mediada por Nrf2 é capaz de reduzir negativamente a proteína pro-apoptótica Bax e consequentemente reduzir a atividade de Caspase 3 para proteger as células da apoptose. Assim, a indução de Bcl-xL mediada por Nrf2 desempenha um papel importante na diminuição da apoptose celular e no aumento da sobrevivência celular (NITURE; JAISWAL, 2013).

No entanto, pesquisas sobre a regulação de proteínas anti-apoptóticas por Keap1/Nrf2 e seu papel na apoptose, demonstraram a degradação da proteína anti-poptótica Bcl-xL, mediada por Keap1, por meio da ubiquitina do complexo Keap1-Cul3-Rbx1, assim,

aumenta e/ou ativa fatores pró-apoptóticos como o Bax, contribuindo para o aumento da apoptose celular (NITURE; JAISWAL, 2011).

3.6 Apoptose

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, geneticamente controlada por resposta que permite às células cometerem autodestruição após se expor a determinados estímulos fisiológicos, patogênicos ou citotóxicos (REED, 1999). Este processo é essencial para o desenvolvimento de processos fisiológicos e manutenção da homeostase tecidual, por eliminar células danificadas, envelhecidas e indesejáveis (WYLLIE, 1985).

As células em apoptose são caracterizadas por uma retração da célula e conseqüentemente perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (MELO et al., 2000). Em seguida, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear e a membrana celular forma prolongamentos (blebs) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Estes prolongamentos gerados aumentam em número e tamanho e se rompem. Ao se romper são formados os corpos apoptóticos, os quais, são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; THOMADAKI; SCORILAS, 2006).

Estes processos desencadeadores da apoptose são regulados pelas vias intrínseca e extrínseca (PAROLIN; REASON, 2001; FULDA; DEBATIN, 2006). A via extrínseca (extracelular) é desencadeada pela ativação dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Estes fatores promovem a interação dos seus domínios de morte com as moléculas de FADD (*Fas-associated death domain*) que recruta a caspase-8, ativando a caspase-3, assim, executa a morte por apoptose (BUDIARDJO et al., 1999; ASHKENAZI, 2002; CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020).

A via intrínseca (intracelular ou mitocondrial) é ativada por danos ao DNA, ruptura de microtúbulos, hipóxia, estresse oxidativo e deficiência ou ausência de fatores de crescimento celulares (HENGARTNER, 2000; PAROLIN; REASON, 2001). A ativação desta via é controlada, principalmente, pelas proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Quando expressas estas proteínas são capazes de inibir a geração de

espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como, estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria, e ainda atuar na indução e repressão da apoptose (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; HUNOT; FLAVELL, 2001; BONNAL et al., 2020).

Existem cerca de 25 genes na família Bcl-2 reconhecidas e estas moléculas são classificadas em anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL E EBV BHRF1) e pró- apoptóticas (BAX, BAK, BCL-Xs, BAD, BID, BIK, HRK, BIM E BOK) (ADAMS; CORY, 1998; HENGARTNER, 2000; VERZELLA et al., 2020). A homeostase celular é mantida pelo equilíbrio relativo entre as diferentes proteínas, principalmente Bcl-xL e Bax, pela formação de homodímeros e heterodímeros, na qual, define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (ZÖRNIG et al., 2001; BIERBRAUER et al., 2020).

A proteína Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) é um produto de transcrição do gene Bcl-x relacionado ao Bcl-2, possui a função de regular a via de indução e repressão de morte celular (HU et al., 1998). Após estímulos de morte, o Bcl-xL inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, impedindo o escape do citocromo c para o citosol. Esta inibição se deve a formação de heterodímeros com a proteína Bax (*BCL-2-associated X protein*) ou ainda, por competição de sítios a serem ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999; SHI; KEHRL, 2019) (Figura 2). A proteína Bax é codificada pelo gene localizado na região cromossômica 19q13.3-q13.4, e representa o modelo das proteínas pró-apoptóticas (ANTONSSON; MARTINO, 2000).

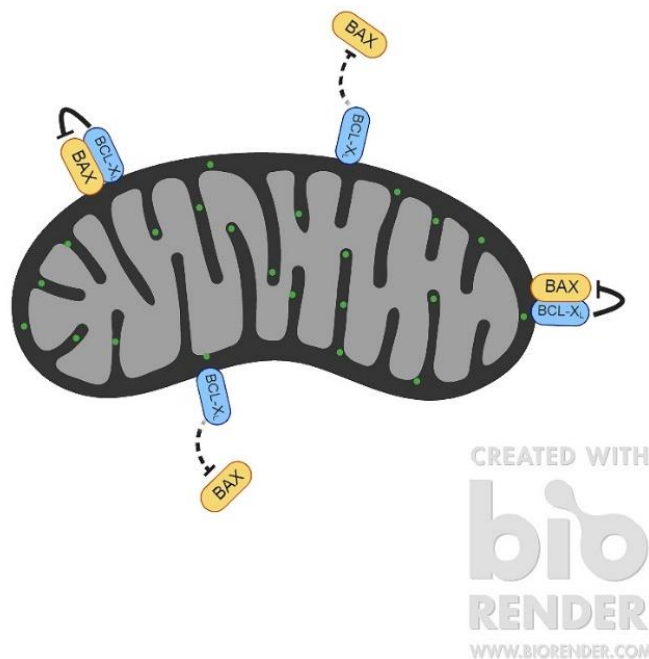


Figura 3. Via de regulação da apoptose. Após um estímulo de morte, Bcl-xL é ativada e forma heterodímeros com Bax e ocupa os sítios da membrana mitocondrial a ser ocupados por Bax, impedindo a liberação do citocromo c e a morte celular por apoptose.

Na presença de um estímulo apoptótico, como danos ao DNA, ocorre a ativação da Bax que migra do citoplasma para as proximidades das mitocôndrias, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa (RODRIGUEZ; LAZEBNIK, 1999). Pequenas unidades de proteínas Bax ativadas tendem ao agrupamento, formando oligômeros que penetram a membrana mitocondrial externa (ANTONSSON; MARTINOU, 2000).

Essa integração entre Bax e a membrana forma poros que possibilita a rápida liberação do citocromo c para o citosol, no qual, associa-se com Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) e à pró-caspase 9, formando o complexo apoptosoma, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que por sua vez, ativa a caspase-3, dando início a cascata e ocasionando a apoptose (Figura 3) (RODRIGUEZ; LAZEBNIK, 1999; ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001).

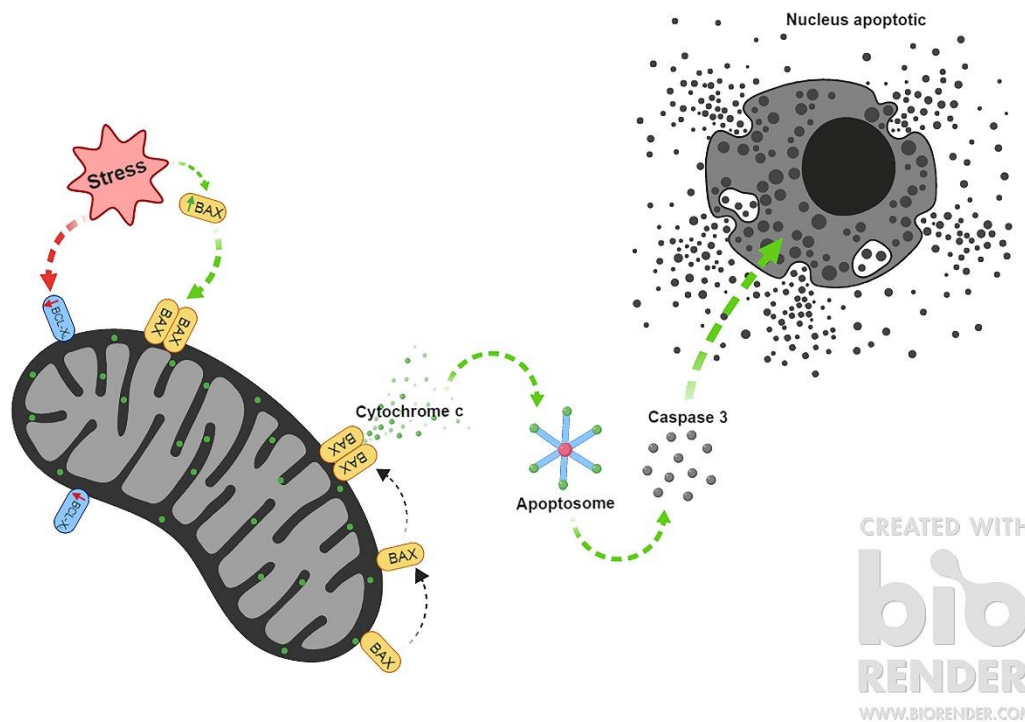


Figura 4. Via de ativação da apoptose. Após estímulo apoptótico (estresse oxidativo), Bax é ativado e migra do citoplasma para a membrana mitocondrial externa, onde constituem oligômeros, formando poros e subsequente liberação de citocromo c. O citocromo c associa-se com APAF-1 e pró-caspase 9 formando o complexo apoptosoma. A Caspase 9 é clivada e ativa a Caspases 3 (efetora), levando a morte da célula.

As Caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem a família das cisteínas proteases, caracterizadas por possuir cisteína no sítio ativo (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Essas proteases, tem a função de reconhecer e clivar substratos com resíduos de aspartato, levando à condensação e fragmentação do núcleo e externalização de fosfolípidios de membrana, por sua vez, sinalizam para estas células serem fagocitadas por macrófagos (ALBERTS et al., 2002; PELENGARIS; KHAN; EVAN, 2002).

Cerca de quatorze caspases e respectivos substratos foram identificadas em humanos, seis delas (caspases -3, -6, -7, 8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003) e as demais (caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) estão relacionadas a maturação de citocinas (DENAULT; SALVESEN, 2002). As caspases envolvidas na apoptose são classificadas em caspases iniciadoras (-8, -9 e -10) e caspases executoras (-6, -3 e -7) (WOLF; GREEN, 1999; RUPNARAIN et al., 2004), quanto a estas, a caspase -3 é a mais importantes, pode ser ativada por qualquer umas das caspases iniciadoras e tem o papel de clivar ICAD (Inhibitor of

CAD) para liberar CAD (Caspase-activated DNase) que degrada DNA cromossômico provocando a condensação da cromatina (DESAGHER et al., 2000).

No câncer a apoptose é um processo crítico, sabe-se que a expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. No entanto compostos bioativos presentes nos alimentos tem demonstrado ação no aumento de apoptose em células de câncer colorretal, dessa forma refletindo um importante mecanismo de prevenção (WATSON; PRITCHARD, 2000).

3.7 Câncer colorretal (CCR)

O câncer colorretal é um problema de saúde mundial, considerado a segunda causa de mortalidade e o terceiro tipo de câncer mais incidente. No ano de 2018 apresentou 861.663 casos de mortes e 1.800.977 novos casos (BRAY et al., 2018). As taxas de incidência são mais elevadas em países industrializados e ocidentais, como a América do Norte, Europa, Austrália, Nova Zelândia, Leste da Ásia e na parte sul da América do Sul. No entanto, as taxas tendem a serem baixas na maioria das regiões da África e no sul da Ásia (LEE; DELANEY; LIPMAN, 2012; BRAY et al., 2018).

No Brasil, as taxas de CCR representa o terceiro tipo mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres. Em 2017 ocorreram 9.207 óbitos por câncer colorretal em homens e 9.660 em mulheres. Estimam-se, para cada ano do triênio de 2020-2022, 20.520 novos casos em homens e 20.470 em mulheres (INCA, 2019).

As Regiões Sul e Sudeste exibem maior incidência da doença, sendo que na região sudeste o CCR é o segundo mais prevalente em ambos os sexos e nas regiões Sul é o terceiro mais frequente em homens e o segundo em mulheres. Nas Regiões Centro-Oeste o CCR também apresenta alta incidência é considerado o segundo mais frequente em homens e o terceiro em mulheres. Provavelmente, derivado dos hábitos de vida, como o baixo consumo de fibras e o alto teor de lipídios na dieta, ingestão elevada de álcool e prevalências mais altas de tabagismo (INCA, 2019).

O CCR refere-se às neoplasias acometidas no cólon, junção retossigmóide, reto, ânus e o canal anal (BELOV; ZHOU; CHRISTOPHERSON, 2010). É considerado uma

doença multifatorial, com diversos fatores de risco associados ao seu desenvolvimento (BRENNER; KLOOR; POX, 2014).

Aproximadamente 75% dos casos são de origem esporádica, causadas por fatores ambientais, tais como alimentação, depressão, uso de álcool, tabaco e micro-organismos, ou ainda, pelos efeitos do envelhecimento. Cerca de 20% são de origem familiar e os outros 5% são secundários à doença inflamatória intestinal e síndromes de CCR hereditárias, como a síndrome de Lynch, polipose adenomatosa familiar e síndrome de Peutz-Jeghers (CRUZ et. al., 2004; MARKOWITZ; BERTOHNOLLI, 2009; ASSIS, 2011).

Dentre os fatores esporádicos a alimentação é a mais estudada, por apresentar importante papel na prevenção e também no aumento do risco de CCR. O alto consumo de carnes vermelhas, gorduras e álcool, estão associados a maior probabilidade de desenvolvimento de CCR (LESER; SOARES, 2001). Por outro lado, as frutas e verduras são associadas à proteção contra o CCR decorrente dos efeitos das substâncias bioativas presentes nesses alimentos, como as vitaminas A, E, C, carotenoides, selênio, folato e compostos fenólicos, que constituem o principal antioxidante derivados da dieta, no qual estão associados à neutralização de radicais livres (DEGASPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O câncer colorretal surge de alterações genéticas causadas principalmente pelo estresse oxidativo, que atuam na oxidação de estruturas das membranas celulares e do DNA (OLIVEIRA et al., 2011), desencadeando alterações genéticas durante o crescimento, desenvolvimento e morte celular, levando a proliferação de células anormais (WHEELER et. al., 2001, PARK; NAM, 2020).

As vias genéticas mais estudadas sobre a progressão do câncer colorretal são a via da instabilidade cromossômica, via da instabilidade de microssatélites e a via da instabilidade epigenética (em inglês, também conhecido como *CpG Island Methylator Phenotype – CIMP*) (BRASILEIRO FILHO, 2013). A via de instabilidade cromossômica é a mais frequente e inicia-se por mutação no gene supressor tumoral, como o gene da polipose adenomatosa coli (APC) e mutações de ativação em proto-oncogenes, como K-ras (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) que causa aumento da expansão clonal das células (ARMAGHANY et al., 2012).

O gene APC tem a função de regular a via APC/Wnt/ β -catenina. Mutações neste gene ocasiona aumento de β -catenina culminando com o aumento da proliferação, diferenciação, migração e adesão de células colorretais (ARMAGHANY et al., 2012). As alterações no gene K-ras promove um estado ativado permanente da célula e escape da apoptose (MALUMBRES; BARBACID, 2003). Subsequentemente, ocorre perda do gene supressor tumoral TP53, no qual, confere expansão às células com vantagens adicionais de crescimento que em última análise leva a cânceres invasivos (MUNDADE et al., 2014).

A via de instabilidade de microssatélite ocorre em regiões com pequenos segmentos repetitivos de DNA com sequência maior ou menor do que o original. Esta via é impulsionada pelo dano do gene de APC e caracteriza-se por metilação aberrante nas ilhas CpG do gene MLH1 (mutL homolog 1) (ARMAGHANY et al., 2012). A falha desses genes conduz à mutações subsequentes em genes alvos específicos envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como receptor II do fator de crescimento transformante β (TGF β RII) e proteínas envolvidas na regulação da apoptose, como Bax, que permite a invasão de tumores com microssatélites instáveis (MUNDADE et al., 2014).

A terceira via do pólipó serrilhado ocorre por hipermetilação aberrante nas ilhas CpG das regiões promotoras de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, angiogênese, reparação do DNA, e ainda invasão e adesão celular (OGINO et al., 2006). Nesta via ocorre mutação de BRAF que faz com que a sinalização MAPKs / ERK aumente e subsequentemente aumente a metilação de outros genes e danos nos genes supressores de tumor, tais como TP53, p16 que inicia o câncer colorretal (SHIMA et al., 2011).

Estas alterações genéticas desencadeiam modificações na mucosa colorretal, na qual inicia-se predominantemente a partir do tecido epitelial, proveniente de pólipos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018) ou de focos de criptas aberrantes (FCA). As criptas aberrantes 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. Ambas, lesões pré-neoplásicas podem evoluir para uma displasia, dando origem a adenomas e carcinomas colorretais (CHENG; LAI, 2003).

Dentre estas neoplasias, os adenocarcinomas são responsáveis por 90% dos casos de câncer colorretal humano (MUNRO et al., 2017) e podem ser classificados em tubular, viloso e misto (BENEDIX et al., 2011; PASCHKE et al., 2018). Os adenocarcinomas são relatados por modificar a composição e diminuição da produção das mucinas (BOLEIJ; TJALSMA, 2012).

As mucinas são heterogêneas de glicoproteínas produzidas por tecidos epiteliais, dependendo da composição de seus monossacarídeos, as mucinas são classificadas em neutras ou ácidas. As mucinas neutras auxiliam na digestão e proteção do epitélio contra microrganismos, sua estrutura é formada por monossacarídeos de manose, galactose e galactosamina. As mucinas ácidas atuam na proteção contra patógenos e agentes químicos, apresentam em sua composição ácidos siálico (sulfomucinas e sialomucinas) (MELO-JUNIOR et al., 2006; BOLEIJ; TJALSMA, 2012).

Assim como as mucinas, as placas de peyer também atuam na defesa contra a mucosa cólica por meio da indução imunológica ou de defesa contra antígenos. As placas de peyer são agregados de nódulos linfáticos que constituem um componente principal do tecido linfático associado ao intestino (GALT). Esses nódulos, utilizam uma complexa interação entre células do sistema imunológico localizadas nos folículos linfóides e no epitélio folicular associado (CERUTTI; CHEN; CHORNY, 2011).

Somado a estas alterações da mucosa colônica são apresentadas manifestações clínicas, em sítios distantes do tumor ou de suas metástases. Estas características podem ser decorrentes da produção de substâncias pelas células tumorais responsáveis por efeitos sistêmicos ou resultantes da diminuição de substâncias habitualmente presentes no organismo, que leva ao aparecimento de sintomas ou ainda derivadas de resposta imunitária do hospedeiro ao tumor (PATEL; DAVILA; PETERS, 1993).

Em alguns casos, essas alterações clínicas podem representar o primeiro sinal clínico do paciente, e podem, inclusive, direcionar ou modificar uma suspeita clínica inicial (GÁMEZ; LUCAS; RODRÍGUEZ, 2001). Frequentemente é observado perda de peso, disfunção imune e variações metabólicas bem como, modificações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos (CARAM et al., 2012).

4 CAPITULO 1

Artigo intitulado “Efeito inibidores de extrato e polpa do fruto juçara (*Euterpe edulis* Martius) na via Nrf2/Keap1 associadas a apoptose em células de adenocarcinoma colorretal Ht-29 e Caco-2”.

Artigo a submeter.

1 **Efeito inibidor de extrato e polpa do fruto juçara (*Euterpe edulis* Martius) na via**
2 ***Nrf2/Keap1* associado a apoptose em células de adenocarcinoma colorretal Ht-**
3 **29 e Caco-2.**

4 Juliana Dalbó^{1*}, Magda Delorece Lugon¹, Flávia Vitorino Freitas², Ivana Alece Arantes
5 Moreno¹, Joaquim Gasparini dos Santos¹, Mayara Mota de Oliveira¹, Adriana Fraga
6 Costa Samos Paris³, Greiciane Gaburro Paneto², Marco Cesar Cunegundes
7 Guimarães¹, Fábio Daumas Nunes³, Anderson Nogueira Mendes⁴, Niels Olsen
8 Saraiva Camara⁵, Iuri Drumund Louro¹, Adriana Madeira Alvares da Silva¹, Leonardo
9 Oliveira Trivillin².

10 ¹Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe. Vitória, ES, Brasil;

11 ²Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. Alegre, ES, Brasil;

12 ³Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

13 ⁴Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina, PI, Brasil.

14 ⁵Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

15 *Autor correspondente: julianadalbo@hotmail.com

16 **Destaques**

- 17 • Polpa do fruto juçara aumenta a viabilidade de células HT-29 e Caco-2.
- 18 • Polpa e extrato do fruto juçara diminui a expressão de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e
- 19 *Caspase* em adenocarcinoma colorretal.
- 20 • Fruto juçara protege células Ht-29 e Caco-2 da apoptose.

21 **Resumo**

22 Compostos bioativos presentes nos alimentos, como os existentes no fruto juçara tem
23 demonstrado ação no aumento de apoptose em células de câncer colorretal. Diante
24 disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da suplementação com
25 fruto Juçara, na forma de polpa e extrato, na intensidade de expressão gênica de *Nrf2*,
26 *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagens celular de adenocarcinoma colorretal Caco-2
27 e HT-29. Células HT-29 e Caco-2 foram expostas a diferentes concentrações de polpa
28 e extrato do fruto juçara por 24 horas. Posteriormente realizou-se teste de viabilidade
29 celular por MTS e amplificação de RNA por qRT-PCR. Como resultado, foi observado
30 aumento na viabilidade das células HT-29 e Caco-2 incubadas em concentrações de
31 5 mg/ml e 50 mg/mL de polpa do fruto Juçara, respectivamente. Também, houve

32 diminuição da expressão gênica de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* nas células Ht-29
33 e Caco-2 expostas a concentração de 0,1 mg/mL e de 0,5 mg/mL de extrato. Ainda,
34 em células Ht-29, observou-se diminuição da expressão gênica de *Nrf2*, *Bax* e
35 *Caspase 3* nas concentrações de 5 mg/mL (exceto *Nrf2*) e 50 mg/mL de polpa.
36 Finalmente, em células Caco-2, diminuição da expressão de *Nrf2*, *Keap1* e *Caspase*
37 *3* na concentração de 10 mg/L de polpa do fruto juçara. Conclui-se que a polpa e o
38 extrato do fruto juçara regula positivamente *Nrf2* e negativamente *Keap1* em
39 adenocarcinoma colorretal. Sugerimos que *Keap1*, ao ser inibido pelo fruto juçara,
40 diminui *Bax* e, conseqüentemente, a atividade da *Caspase 3*, aumentando a sobrevivência
41 das células cancerígenas.

42 **Palavras chaves:** Substâncias fenólicas; Viabilidade celular; *Bax*; *Caspase 3*;
43 antioxidantes; câncer colorretal.

44 1. Introdução

45 Entre os numerosos tipos de câncer, as neoplasias colorretais estão entre os três
46 principais, com maior taxa de incidência e mortalidade em todo o mundo. Em 2018
47 apresentou 861.663 casos de mortes e 1.800.977 novos casos [1].

48 No câncer colorretal, a apoptose é um processo crítico. Sabe-se que a expansão
49 clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade
50 proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose [2]. Contudo,
51 compostos bioativos presentes nos alimentos, como os presentes no fruto juçara tem
52 demonstrado ação no aumento de apoptose em células de câncer colorretal, dessa
53 forma, refletindo um importante mecanismo de prevenção [3].

54 O fruto juçara é constituído de proteínas, açúcares, fibras, fração lipídica, vitaminas C,
55 E e minerais [4]. E ainda, por compostos bioativos, tais como ácidos benzoicos,
56 cafeico, clorogênico, ferúlico, protocatecuíco, *p*-cumárico, siringico, vanílico,
57 flavonoides e saponinas [5–8].

58 Os compostos bioativos podem impedir o início da carcinogênese colorretal através
59 da eliminação direta de radicais livres ou por gerar sinais de estresse químico ou
60 eletrofílico. Para tal, os compostos bioativos ativam proteínas relacionadas a várias
61 vias de sinalização celular, dentre estas a via de apoptose [3,9–12].

62 Essas proteínas são mediadas pela ativação do complexo proteína Keap1 (*Kelch-like*
63 *ECH-associated Protein 1*), associada ao fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor*
64 *erythroid 2 [NF-E2] - related factor 2*). Na presença do estresse oxidativo ocorre a
65 inibição da atividade da ubiquitina-E3-ligase no complexo *Keap1-Cul3* com
66 subsequente liberação do *Nrf2* [3,10,11,13]. A dissociação *Nrf2-Keap1* leva à
67 diminuição da taxa de proteólise e aumenta *Nrf2* no núcleo. No núcleo, o *Nrf2* associa-
68 se com a proteína sMaf (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*), formando um
69 heterodímero *Nrf2/sMaf*, que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou
70 ao elemento de resposta eletrolítica (EpRE), localizados na região promotora dos
71 genes alvos [11,14–16].

72 Os genes ativados por *Nrf2* atuam na manutenção da homeostase celular, no sistema
73 de detoxificação e também na via de apoptose [14]. A ativação de *Nrf2* regula *Bcl-xL*
74 [17], reduz negativamente a proteína pro-apoptótica *Bax* e, conseqüentemente, reduz
75 a atividade de *Caspase 3* para proteger as células da apoptose. Assim, a indução de
76 *Bcl-xL* mediada por *Nrf2* desempenha um papel importante na diminuição da apoptose
77 celular e no aumento da sobrevivência celular [15].

78 Por outro lado, Keap1 degrada a proteína anti-poptótica *Bcl-xL*, através da ubiquitina
79 do complexo *Keap1-Cul3-Rbx1* e, assim, aumenta e/ou ativa fatores pró-apoptóticos
80 como o *Bax* [18,19]. Quando ativado, *Bax* migra do citoplasma para a membrana
81 mitocondrial externa, onde constituem oligômeros, formando poros e subsequente
82 liberação de citocromo c. O citocromo c associa-se com APAF-1 e pró-caspase 9,
83 formando o complexo apoptosoma. A *Caspase 9* é clivada e ativa a *Caspases 3*,
84 levando à morte da célula [20,21].

85 Na busca de descoberta de novos medicamentos, estudos tem investigado o efeito de
86 substâncias bioativas, principalmente os antioxidantes derivados de alimentos, como
87 frutas e legumes na prevenção do câncer. No entanto, a literatura não descreve
88 estudos sobre o efeito do fruto juçara na prevenção de câncer colorretal,
89 principalmente relacionado a via *Nrf2/Keap1* associada à apoptose. Diante disso, este
90 trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da suplementação com fruto Juçara,
91 na forma de polpa e extrato, na expressão gênica de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3*,
92 em linhagens celular de adenocarcinoma colorretal Caco-2 e HT-29.

93 2. Materiais e métodos

94 **2.1. Fruto Juçara**

95 Foi utilizado um lote comercial de polpa fina (tipo C) [22] e orgânica do fruto Juçara
96 (*Euterpe edulis* Martius), obtido em uma agroindústria de polpa de juçara da cidade
97 de Rio Novo do Sul, localizada na região Sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. Deste
98 lote de polpa foram extraídas as substâncias fenólicas, com posterior liofilização do
99 extrato [23].

100 **2.2. Cultura Celular**

101 As linhagens celulares utilizadas foram Caco-2 e HT-29, ambas adenocarcinoma
102 colorretal humano e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células
103 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's® (DEMEM, Gibco, Germany),
104 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 0,1% de solução antibiótica-antimicótica
105 para Caco-2 e 1% da solução antibiótica-antimicótica para HT-29. As células foram
106 mantidas a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂.

107 **2.3. Teste de viabilidade celular**

108 Foram distribuídas 8×10^3 células por poço em placas de cultura de 96 poços. As
109 células foram cultivadas até atingirem o tempo de ligação nas placas (48 horas). Após,
110 as células foram expostas a diferentes concentrações de polpa do fruto Juçara
111 (5mg/mL, 10mg/mL, 50mg/mL e 100mg/mL) e de extrato de substâncias fenólicas
112 (0,05mg/mL, 0,1mg/mL, 0,5mg/mL e 1mg/mL) e por tempo de 24 horas.

113 Passado o tempo de exposição, analisou-se a viabilidade celular por meio do método
114 colorimétrico baseado na biorredução do composto MTS (Promega® #G3580). A
115 absorvância foi lida em leitor de microplacas no comprimento de 490 nm, usando
116 como controle células não expostas ao fruto juçara. O experimento foi realizado em
117 triplicata.

118 **2.4. Extração de RNA**

119 A extração de RNA foi realizada em triplicata e com Trizol (*Life Technologies*),
120 seguindo as especificações do fabricante. A quantificação de RNA foi feita no
121 espectrofotômetro Nanodrop® e a qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de
122 agarose a 1%.

123 **2.5. qRT-PCR**

124 O RNA total das células foi utilizado para sintetizar cDNA e posterior amplificação por
 125 qRT-PCR empregando o kit real GoTaq® 1-Step qRT-PCR System (Promega). A
 126 técnica foi realizada em triplicata. Utilizou-se o gene *GAPDH* como gene de referência
 127 e primers específicos para os genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3*, ambos foram
 128 desenhados no programa de bioinformática PrimerQuest (Tabela 1). A análise da
 129 expressão gênica foi realizada pelo método ΔCT e $\Delta\Delta\text{CT}$ e os valores de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ foram
 130 aplicados na montagem dos gráficos [24].

131 Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no qRT-PCR.

Gene	Sequência	Tm
Nrf2	Reverse 5'-CAG AAT CAC TGA GGC CAA GTA G -3'	Tm: 55.1°C
	Forward 5'- CCG GCA TTT CAC TAA ACA CAA G -3'	Tm: 54.6°C
Keap1	Reverse 5'- ACT CGT TCC TCT CTG GGT AG -3'	Tm: 55.4°C
	Forward 5'- TGT CCT CAA TCG TCT CCT TTA TG -3'	Tm: 54.3°C
Bax	Reverse 5'- GAT CAG TTC CGG CAC CTT G -3'	Tm: 56.1°C
	Forward 5'- TCT GAC GGC AAC TTC AAC TG -3'	Tm: 55.3°C
Caspase 3	Reverse 5'- ATA ATA ACC AGG TGC TGT GGA G -3'	Tm: 54.5°C
	Forward 5'- AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG -3'	Tm: 54.7°C
GAPDH	Reverse 5'- GAG TCC TTC CAC GAT ACC AAA G -3'	Tm: 55.1°C
	Forward 5'- GGT GTG AAC CAT GAG AAG TAT GA -3'	Tm: 54.5°C

132

133 2.6. Análise de dados

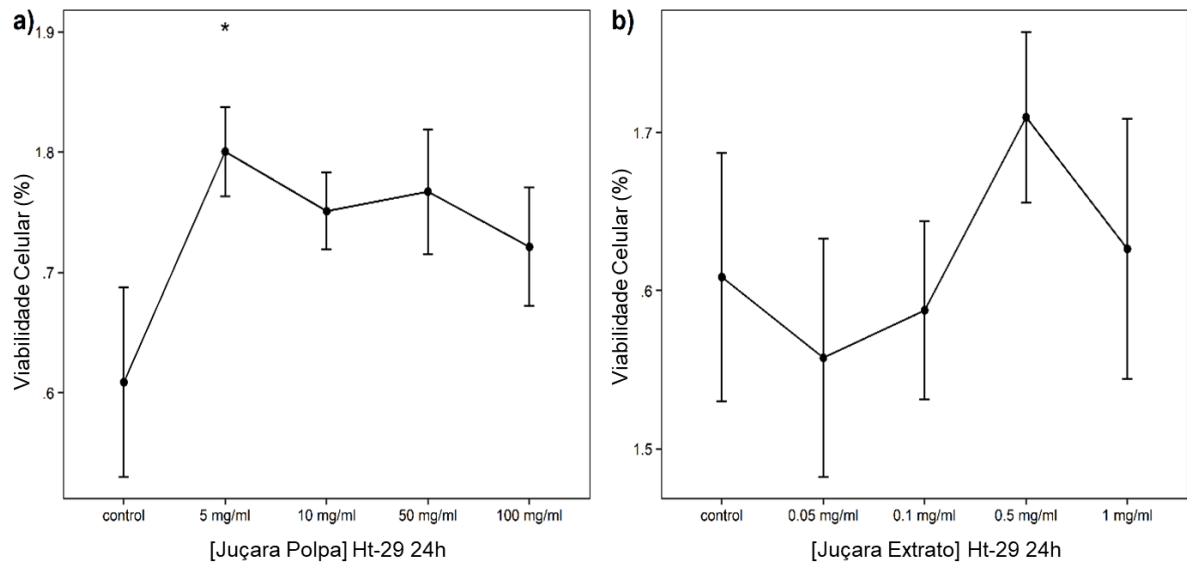
134 Todas as variáveis passaram por análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. As
 135 variáveis de viabilidade celular (Caco-2) passaram pelo teste de análise de variância
 136 One-way (ANOVA), seguido por pós hoc teste de Tukey. As variáveis viabilidade
 137 celular (HT-29) e expressão gênica passaram pelo teste de análise de variância
 138 Kruskal-Wallis, seguido por pós hoc teste de Dumn. Todas as análises e figuras foram
 139 desenvolvidas no Software Estatístico de livre acesso R (R Development Core Team),
 140 considerando um nível de significância de 5%.

141 3. Resultados

142 3.1. Viabilidade Celular

143 Foi observado aumento significativo ($p=0.0128$) na viabilidade das células de HT-29
 144 incubadas na concentração de 5 mg/ml de polpa do fruto Juçara em relação ao
 145 controle (Figura 1a). As células de HT-29 incubadas em diferentes concentrações de

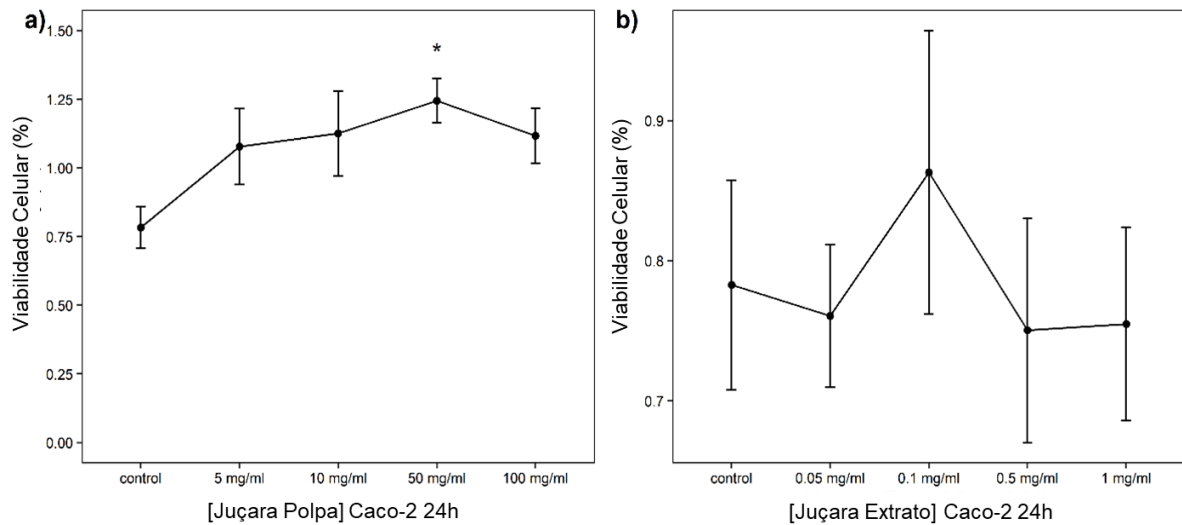
146 extrato de substâncias fenólicas não apresentaram diferenças significativas na
 147 viabilidade celular (Figura 1b).



148

149 Figura 1. Efeito *in vitro* da viabilidade em linhagem celular de adenocarcinoma
 150 colorretal (HT-29) incubadas com polpa e extrato de substâncias fenólicas do fruto
 151 Juçara. (a) Análise da viabilidade inferida após incubação com polpa do fruto Juçara
 152 por 24h. (b) Análise da viabilidade inferida após incubação com extrato de compostos
 153 fenólicos por 24h. * diferença estatística significativa quanto ao percentual de
 154 viabilidade celular $p < 0,05$.

155 A linhagem celular Caco-2 apresentou aumento significativo ($p=0.0378$) da viabilidade
 156 celular quando incubadas na concentração de 50 mg/mL de polpa do fruto Juçara em
 157 comparação ao controle (Figura 2a). As células de Caco-2 incubadas em diferentes
 158 concentrações de extrato de substâncias fenólicas não apresentaram diferenças
 159 significativas na viabilidade celular (Figura 2b).



160

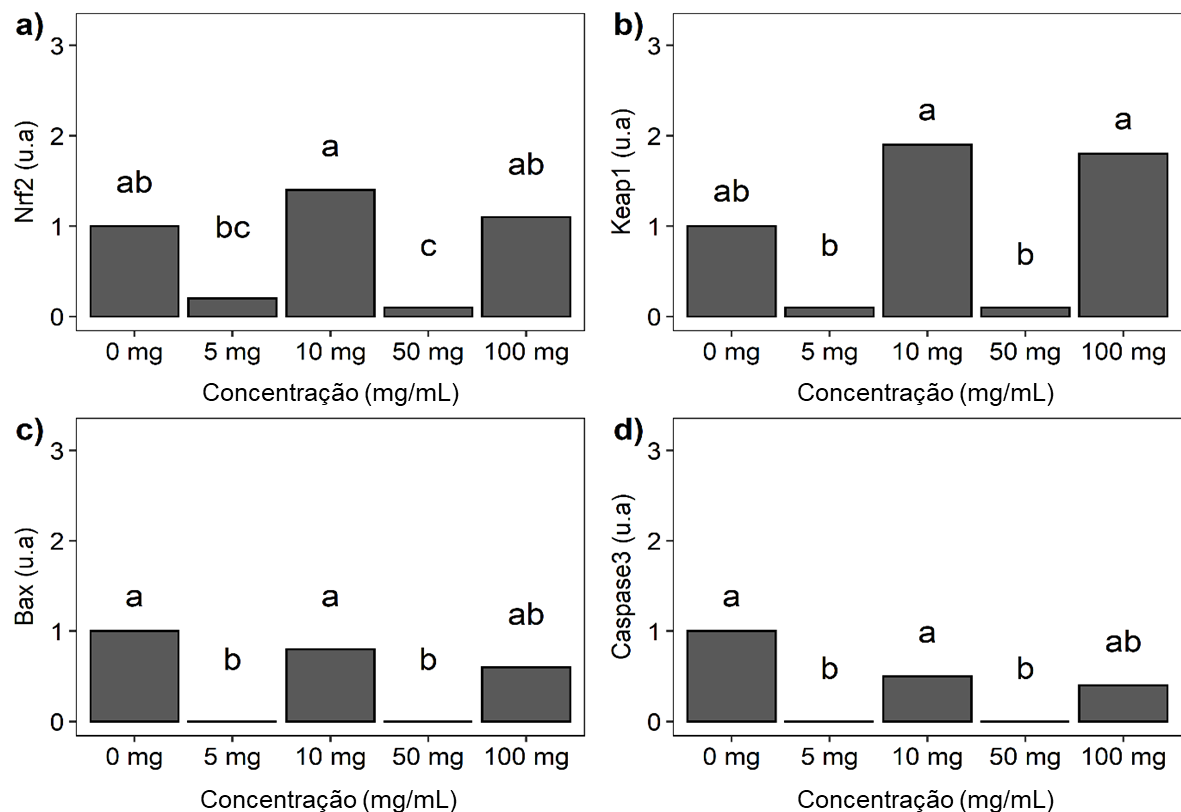
161 Figura 2. Efeito in vitro da viabilidade em linhagem celular de adenocarcinoma
 162 colorretal (Caco-2) incubadas com suco de polpa e extrato de substâncias fenólicas
 163 do fruto Juçara. (a) Análise da viabilidade inferida após incubação com polpa do fruto
 164 Juçara por 24h. (B) Análise da viabilidade inferida após incubação com extrato de
 165 compostos fenólicos por 24h. * diferença estatística significativa quanto ao percentual
 166 de viabilidade celular $p < 0,05$.

167 3.2. Perfil de expressão de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem 168 celular de HT-29 exposta à concentração de polpa do fruto Juçara.

169 O gene *Nrf2* demonstrou diminuição da expressão gênica em células Ht-29 expostas a
 170 concentração de 50 mg/mL ($p=0.0179$) de polpa do fruto juçara em comparação ao
 171 controle (Figura 3a). A concentração de 50 mg/mL também promoveu diminuição da
 172 expressão do gene em comparação à concentração de 100 mg/mL ($p=0.0088$) de
 173 polpa do fruto juçara. Ainda, houve diminuição da expressão de *Nrf2* na exposição à
 174 concentração de 5 mg/mL em comparação à exposição na concentração de 10 mg/mL
 175 ($p=0.0179$) de polpa.

176 Quanto ao gene *Keap1*, não houve diferença significativa nas células H-29 expostas
 177 às diferentes concentrações de polpa do fruto juçara ao comparar com o controle
 178 (Figura 3b). Porém, nas concentrações de 5 mg/mL de 50 mg/mL observou-se
 179 diminuição da expressão gênica ao serem comparadas com as concentrações de 10
 180 mg/mL ($p=0.0010$; $p=0.0112$ respectivamente) e 100mg/mL ($p=0.0041$; $p=0.0339$
 181 respectivamente) de polpa.

182 Em relação aos genes *Bax* e *Caspase 3*, houve diminuição da expressão gênica em
 183 células Ht-29 expostas às concentrações de 5 mg/mL ($p=0.0010$) e de 50mg/mL
 184 ($p=0.0041$) de polpa em comparação com o controle (Figura 3c e 3d). A concentração
 185 de 5 mg/mL, quando comparada às demais concentrações, promoveu diminuição da
 186 expressão gênica em comparação à concentração de 10 mg/mL ($p=0.0112$) de polpa.
 187 Também ocorreu diminuição da expressão de *Bax* e *Caspase 3* na concentração de
 188 50mg/mL de polpa em comparação à concentração de 10 mg/mL ($p=0.0339$) de polpa.



189

190 Figura 3. Perfil de expressão dos genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem
 191 celular de HT-29 expostas à diferentes concentrações de polpa do fruto Juçara. a)
 192 Perfil de expressão de *Nrf2*. b) Perfil de expressão de *Keap1*. c) Perfil de expressão
 193 de *Bax*. d) Perfil de expressão de *Caspase 3*. Letras diferentes entre colunas
 194 significam diferença estatística significativa entre as médias de expressão gênica.

195

3.3. Perfil de expressão de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem celular de HT-29 exposta à concentração de Extrato de substâncias fenólicas

196

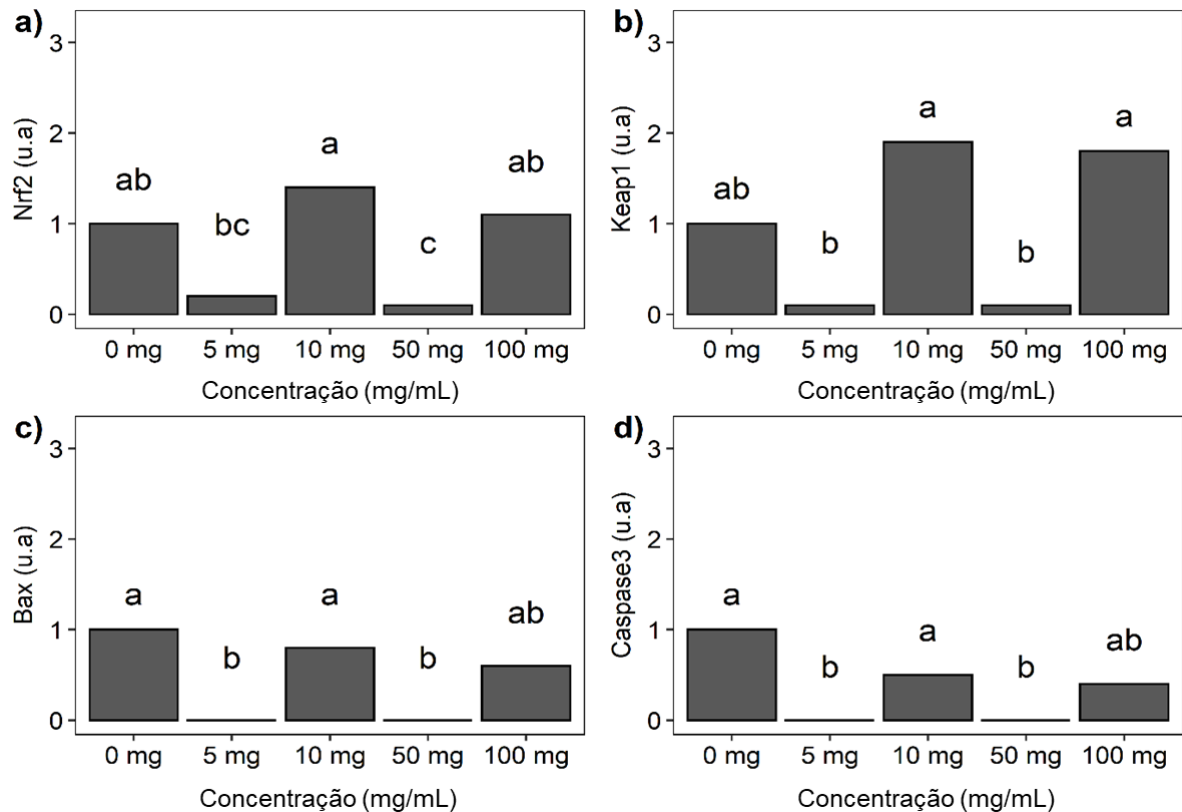
197

198 Foi observada diminuição na expressão de *Nrf2* nas células Ht-29 expostas a
 199 concentração de 0,5 mg/mL ($p=0.0414$) de extrato de substâncias fenólicas em

200 comparação ao controle (Figura 4a). A concentração de 0,5 mg/mL de extrato também
201 promoveu diminuição da expressão gênica em comparação às concentrações de 0,05
202 mg/mL ($p=0.0023$) e de 1mg/mL ($p=0.0053$) de extrato. Ainda, houve diminuição da
203 expressão de *Nrf2* nas células expostas a concentração de 0,1 mg/mL em
204 comparação às concentrações de 0,05 mg/mL ($p=0.0142$) e de 1mg/mL ($p=0.0053$)
205 de extrato.

206 O perfil de expressão de *Keap1* analisado não apresentou diferença significativa nas
207 células Ht-29 expostas às diferentes concentrações de extrato de substâncias
208 fenólicas ao comparar com o controle (Figura 4b). No entanto, foi observada
209 diminuição da expressão de *Keap1* na exposição a concentração de 0,1 mg/mL em
210 comparação às concentrações de 0,05 mg/mL ($P=0.0069$) e de 1mg/mL ($p=0.0142$)
211 de extrato. Observou-se também uma diminuição na expressão do gene nas células
212 expostas a concentração de 0,5 mg/mL em comparação às concentrações de 0,05
213 mg/mL ($p=0.0031$) e 1mg/mL ($p=0.0069$) de extrato.

214 Os genes *Bax* e *Caspase 3* apresentaram diminuição da expressão gênica nas células
215 Ht-29 expostas às concentrações de 0,1 mg/mL ($p= 0.0179$) e de 0,5
216 mg/mL($p=0.0031$) de extrato de substâncias fenólicas em comparação ao controle
217 (Figura 4c e 4d). A concentração de 0,1 mg/mL também promoveu diminuição da
218 expressão dos genes em comparação a concentração de 0,05 mg/mL ($p= 0.0223$) de
219 extrato. Ao comparar a concentração de 0,5 mg/mL com as demais, verificou-se
220 diminuição da expressão de *Bax* e *Caspase 3* em comparação as concentrações de
221 0,05 mg/mL ($p=0.0041$) e de 1,0 mg/mL ($p=0.0414$) de extrato de substâncias
222 fenólicas.



223

224

225

226

227

228

Figura 4. Perfil de expressão dos genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem celular de HT-29 expostas à concentração de extrato de substâncias fenólicas. a) Perfil de expressão de *Nrf2*. b) Perfil de expressão de *Keap1*. c) Perfil de expressão de *Bax*. d) Perfil de expressão de *Caspase 3*. Letras diferentes entre colunas significam diferença estatística significativa entre as médias de expressão gênica.

229

230

3.4. Perfil de expressão de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem celular de Caco-2 exposta à concentração de polpa do fruto Juçara.

231

232

233

234

235

Observou-se diminuição da expressão de *Nrf2* nas células Caco-2 expostas às concentrações de 10 mg/mL ($p=0.0011$) e de 50 mg/mL ($p=0.0271$) de polpa do fruto juçara em comparação ao controle (Figura 5a). A concentração de 10 mg/mL também promoveu diminuição da expressão do gene em comparação à concentração de 5 mg/mL polpa ($p=0.0271$).

236

237

238

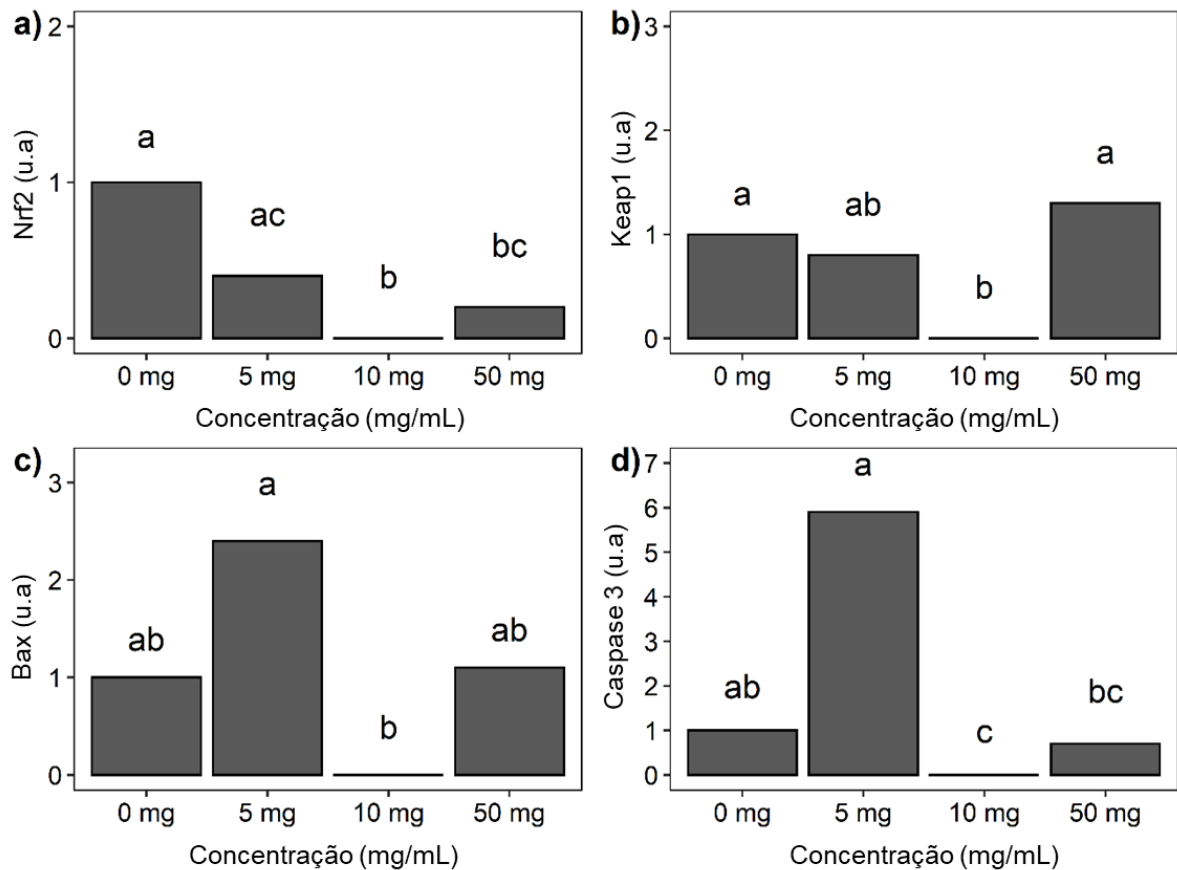
239

240

O gene *Keap1* apresentou diminuição da expressão nas células Caco-2 expostas à concentração de 10 mg/mL ($p=0.0271$) de polpa, quando comparado ao controle (Figura 5b). Ainda, na concentração de 10 mg/mL verificou-se diminuição da expressão de *Keap1* ao comparar com a concentração de 50 mg/mL de polpa ($p=0.0046$).

241 O perfil de expressão de *Bax* analisado não apresentou diferença significativa nas
242 células expostas às diferentes concentrações de polpa do fruto juçara ao comparar
243 com o controle (Figura 5c). Entretanto, foi observada diminuição na expressão de *Bax*
244 quando exposto à concentração de 10 mg/mL de polpa em comparação à
245 concentração de 5 mg/mL de polpa ($p=0.0011$).

246 Quanto ao perfil de expressão de *Caspase 3*, nosso resultado demonstrou diminuição
247 da expressão nas células Caco-2 expostas apenas à concentração de 10 mg/mL
248 ($p=0.0271$) de polpa em comparação ao controle (Figura 5d). Também verificou-se
249 diminuição da expressão do gene nas concentrações de 10 mg/mL ($p=0.0011$) e de
250 50 mg/mL ($p=0.0271$) em comparação à concentração de 5 mg/mL de polpa do fruto
251 juçara.



252

253 Figura 5. Perfil de expressão dos genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem
 254 celular de Caco-2 expostas à diferentes concentrações de polpa do fruto Juçara. a)
 255 Perfil de expressão de *Nrf2*. b) Perfil de expressão de *Keap1*. c) Perfil de expressão
 256 de *Bax*. d) Perfil de expressão de *Caspase 3*. Letras diferentes entre colunas
 257 significam diferença estatística significativa entre as médias de expressão gênica.

258

3.5. Perfil de expressão de *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem 259 celular de Caco-2 exposta à concentração de Extrato de substâncias 260 fenólicas.

261

262

263

264

265

266

O nível de expressão observado para os genes *Nrf2* e *Caspase 3* foram menores nas
 células Caco-2 expostas as concentrações de 0,1 mg/mL ($p=0.0011$) e de 0,5 mg/mL
 ($p= 0.0208$) de extrato em comparação ao controle (Figura 6a e 6d). A exposição à
 concentração de 0,1 mg/mL de extrato também promoveu diminuição da expressão
 dos genes quando comparada à concentração de 0,05 mg/mL ($p=0.0208$) de extrato
 de substâncias fenólicas.

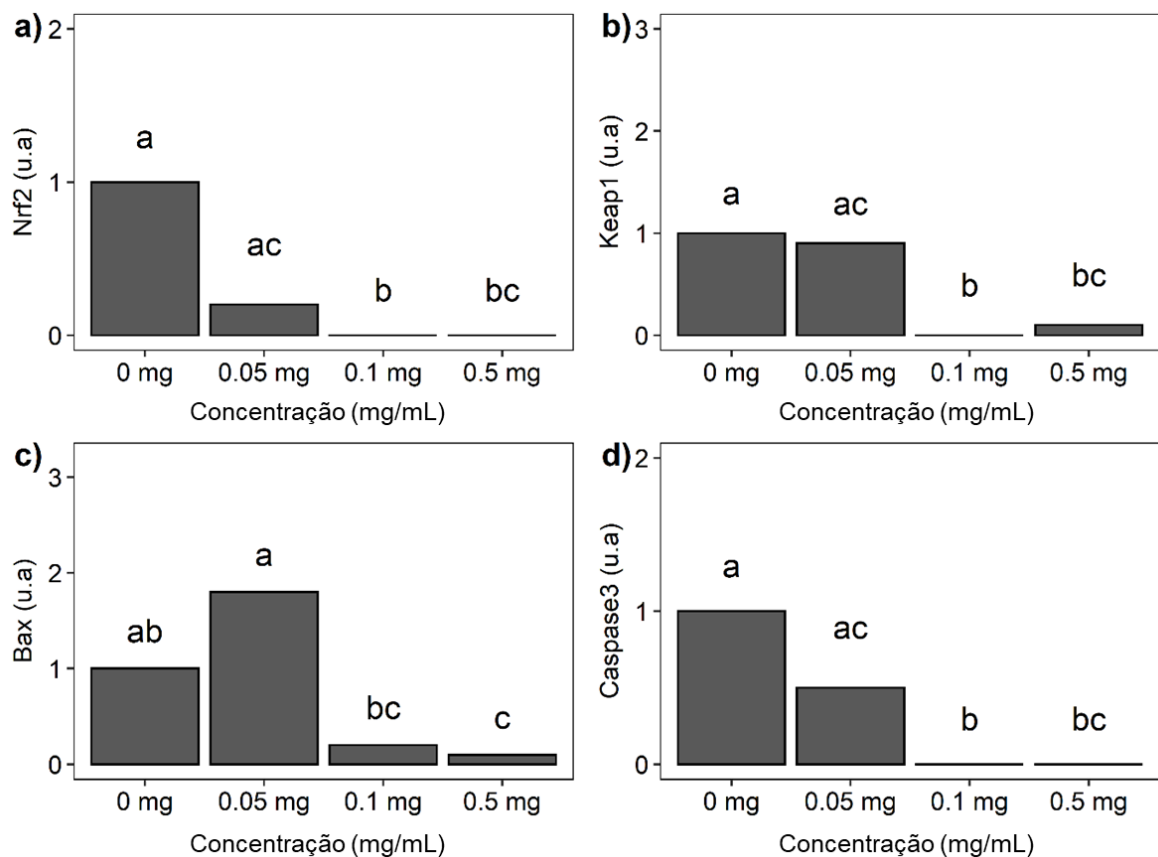
267

268

O perfil de expressão de *Keap1* analisado segue o mesmo padrão observado para
Nrf2 e *Caspase 3*. Foi observada diminuição apenas nas células Caco-2 expostas às

269 concentrações de 0,1 mg/mL ($p=0.0033$) e de 0,5 mg/mL ($p=0.0087$) de extrato, em
 270 comparação ao controle (Figura 6b). Também verificou-se diminuição da expressão
 271 gênica de *Keap1* nas células expostas à concentração de 0,1 mg/mL quando
 272 comparada à concentração de 0,05 mg/mL ($p=0.0447$) de extrato.

273 Quanto à expressão de *Bax*, observou-se diminuição nas células Caco-2 expostas
 274 apenas à concentração de 0,5 mg/mL de extrato ($p=0.0157$), em comparação ao
 275 controle (Figura 6c). Ainda, a concentração de 0,5 mg/mL apresentou diminuição da
 276 expressão de *Bax* em comparação à concentração de 0,05 mg/mL de extrato
 277 ($p=0.0016$). A concentração de 0,1 mg/mL de extrato também apresentou diminuição
 278 da expressão gênica quando comparada à concentração de 0,05 mg/mL de extrato
 279 ($p=0.0271$).



280

281 Figura 6. Perfil de expressão dos genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em linhagem
 282 celular de Caco-2 expostas à diferentes concentrações de extrato de substâncias
 283 fenólicas. a) Perfil de expressão de *Nrf2*. b) Perfil de expressão de *Keap1*. c) Perfil de
 284 expressão de *Bax*. d) Perfil de expressão de *Caspase 3*. Letras diferentes entre
 285 colunas significam diferença estatística significativa entre as médias de expressão
 286 gênica.

287 4. Discussão

288 As linhagens de células Caco-2 e Ht-29, apesar de vindas de um mesmo tipo tumoral,
289 apresentam características distintas. A linhagem Caco-2 são células com fenótipo
290 mais diferenciado e proliferação mais lenta [25]. Isto justifica a diferença da viabilidade
291 celular encontrada entre células Caco-2 e Ht-29 neste trabalho, ao serem expostas às
292 mesmas concentrações de polpa do fruto juçara, como demonstrado nas Figuras 1 e
293 2.

294 Não foram encontrados na literatura estudos sobre o efeito do fruto juçara em
295 linhagens de células, principalmente relacionado ao câncer colorretal. No entanto, Lim
296 & Lim (2006) demonstraram os efeitos de sucos de frutas cítricas, os quais apresentam
297 propriedades bioativas semelhantes à juçara em células Caco-2. O estudo
298 demonstrou efeitos citotóxicos dos sucos de lima e de limão na concentração $\geq 30\%$.
299 As análises dos sucos de toranja e pummelo a 10% não afetaram a viabilidade celular
300 e o suco de laranja aumentou a viabilidade celular apenas em concentrações mais
301 baixas ($< 30\%$) [26].

302 Outro estudo dos mesmos autores analisou o suco de cereja da Cornualha, rico em
303 substâncias antioxidantes em células Ht-29 e Caco-2. Esta análise apresentou efeitos
304 inibidores na viabilidade de células expostas a concentrações crescentes do suco
305 (0,0007-1% v/v) por 72 h [26]. Matusiewicz e colaboradores (2019) verificaram o efeito
306 antioxidante do suco de raiz de cenoura em células Caco-2 e o resultado de ensaio
307 de 24 horas de células expostas ao suco nas concentrações de 10, 1 e 0,1 mg/mL
308 também demonstrou redução da viabilidade celular [27].

309 Mediante nossos estudos, é possível aferir que o fruto juçara, tanto na forma de polpa
310 como extrato de substâncias fenólicas, não foi capaz de reduzir a viabilidade celular.
311 Além disso, sugerimos que concentrações menores de polpa do fruto juçara aumente
312 a sobrevivência das células cancerígenas, visto o aumento da viabilidade celular de Ht-29
313 na concentração de 5 mg/mL de polpa. Ainda, insinuamos que a atividade máxima de
314 viabilidade celular de Caco-2 seja na concentração de 50 mg/mL. Uma vez que, a
315 relação dose-resposta apresenta modelo hormético em forma de U invertido [28].

316 Em relação à análise do perfil de expressão gênica, observou-se diminuição da
317 expressão dos genes *Nrf2*, *Keap1*, *Bax* e *Caspase 3* em células Ht-29 e Caco-2

318 expostas à concentração de 0,5 mg/mL de extrato de substâncias fenólicas (Figura 4
319 e 6). Também é notório a diminuição da expressão de todos os genes analisados em
320 ambas as linhagens para a concentração 0,1mg/mL de extrato. Além disso, nossos
321 dados apresentam resposta hormética em forma de U. Ou seja, em doses baixas, há
322 um efeito adverso alto, no qual diminui com o aumento da dose e à medida que a dose
323 é aumentada uma resposta adversa aparece e aumenta [28].

324 Tan e colaboradores (2011) estudaram o efeito do extrato de ameixa de Kakadu, rico
325 em substâncias antioxidantes, em células Ht-29. No estudo, as células foram
326 submetidas às concentrações igual ou superior a 200 µg/ml por 12h, sendo verificado
327 aumento da expressão de *Nrf2* e *Keap1* [29]. Pesquisa realizada em células caco-2
328 expostas a extrato de cebola, diluídos 1:2 em meio DMEM/FBS por 6h também
329 apresentou aumento da expressão de *keap1* e *Nrf2* [30].

330 Estudo com protocatecualdeído, um polifenol extraído do fungo *Phellinus gilvus*,
331 realizado em células Ht-29, expôs aumento da expressão de *Bax* e *Caspase 3* [31].
332 Ainda neste sentido, Elkhateeb e colaboradores (2018) constataram regulação
333 positiva de *Bax* e, conseqüentemente, aumento da expressão de *Caspase 3* em suas
334 pesquisas. Para tal, os autores expuseram células Caco-2 ao extrato de cogumelo
335 nas concentrações de 80 e 160 µg/mL [32]. Diante do exposto, nossos resultados
336 contrapõe as pesquisas descritas anteriormente, demonstrando inibição da expressão
337 dos genes analisados.

338 Ainda em referência à expressão gênica, nossos resultados apontaram diminuição da
339 expressão de *Nrf2*, *Bax* e *Caspase 3* em células Ht-29 expostas à concentração de
340 50 mg/mL de polpa do fruto juçara em comparação ao controle (Figura 3). Também
341 foi demonstrada a diminuição da expressão de *Bax* e *Caspase 3* na concentração de
342 5mg/mL de polpa. Na linhagem Caco-2 houve a diminuição da expressão de *Nrf2*,
343 *Keap1* e *Caspase 3* na concentração de 10 mg/L de polpa, sendo notório também a
344 diminuição em *Bax* (Figura 5).

345 Nossos achados estão de acordo com Szaefer e colaboradores (2015), que
346 verificaram diminuição do nível de *Nrf2* em células normais de epitélio de mama,
347 submetidas à concentração de 25 ml/L de suco de couve por 72h. Os autores
348 averiguaram o gene *Nrf2* como um importante mediador na expressão de genes da
349 enzima fase II (detoxificação) [33].

350 Quanto à análise da expressão de *Bax* e *Caspase 3*, Das e colaboradores (2016)
351 também encontraram diminuição de *Bax* em cardiomiócitos, após tratamento com
352 suco de raiz de beterraba (0,5 e 50 lg/ml) por 24h. Os autores associaram esta
353 diminuição à regulação negativa da proteína pró-apoptótica pelo suco [34]. Entretanto,
354 Farhadi e colaboradores (2015) encontraram aumento da expressão de *Bax* e de
355 *caspase-3*. O experimento foi realizado em células de carcinoma epidermoide humano
356 e carcinoma hepatocelular, expostas ao suco de alho e ao de groselha na
357 concentração de 1µg/mL. A pesquisa demonstrou genes dependentes e relacionou à
358 regulação positiva da via de apoptose [35].

359 Em nosso experimento os genes analisados apresentaram o mesmo padrão de
360 expressão nas diferentes concentrações de extrato fenólico e polpa do fruto juçara,
361 isso confirma a associação entre as vias, como descrito pelos autores anteriormente.
362 Os genes ativados por *Nrf2* atuam na manutenção da homeostase celular, no sistema
363 de detoxificação e também na via de apoptose, como o gene *Bcl-xL*. Assim, a
364 regulação de *Bcl-xL* mediada por *Nrf2* é capaz de reduzir negativamente a proteína
365 pro-apoptótica *Bax*, aumentando a sobrevivência celular [15]. Nosso trabalho
366 demonstra que a inibição de *Nrf2* pelo fruto juçara pode ser positiva, uma vez que sua
367 expressão está associada ao aumento de *Bcl-xL*, a qual desregula o *Bax* e diminuiu a
368 atividade da *caspase 3*, protegendo a célula da apoptose.

369 Contudo, o gene *Keap1* funciona como uma proteína supressora de tumor, atua na
370 repressão e desestabilização do *Bcl-xL*, promovendo a diminuição dos heterodímeros
371 de *Bcl-xL*: *Bax*, facilitando a apoptose das células cancerígenas e contribuindo para
372 o aumento da apoptose celular [36]. Assim, a inibição de *Keap1*, tanto pelo extrato
373 quanto pela polpa do fruto juçara, regula negativamente a via de apoptose mediada
374 por *Bax* e *Caspase 3*, aumentando a sobrevivência das células cancerígenas.

375 Interessantemente também verificamos que, mesmo as linhagens de células Caco-2
376 e Ht-29 apresentando características distintas, o fruto juçara exibiu ação inibitória da
377 expressão gênica em ambas as linhagens. Entretanto, observamos não existir
378 dosagens estabelecidas para o fruto juçara, principalmente em células de
379 adenocarcinoma colorretal, sendo importante continuar as investigações sobre
380 dosagem e tempo de exposição das células.

381 **5. Conclusão**

382 Diante das análises dos resultados conclui-se que a polpa e o extrato do fruto juçara
383 regula positivamente *Nrf2* e negativamente *Keap1*, protegendo a célula da apoptose.
384 Por ser via dependentes, sugerimos que *Keap1* ao ser inibido pelo fruto juçara, diminui
385 *Bax* e conseqüentemente a atividade da *Caspase 3* aumentando a sobrevivência das
386 células cancerígenas.

387 **6. Declaração de interesse**

388 Nenhuma

389 **7. Financiamento**

390 Este trabalho foi financiado pelas Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do
391 Espírito Santo – FAPES; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
392 Superior – CAPES.

393 **8. Contribuição dos autores**

394 Juliana Dalbó: Conceitualização, Metodologia, Investigação, Análise formal, Redação
395 - rascunho original, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Magda Delorece
396 Lugon: Metodologia, Investigação, Análise formal, Redação - rascunho original,
397 Visualização. Flávia Vitorino Freitas: Metodologia, Investigação, Análise formal,
398 Redação - rascunho original, Visualização. Ivana Alece Arantes Moreno: Análise
399 formal, Redação - rascunho original. Joaquim Gasparini dos Santos: Metodologia,
400 Redação - Revisão e Edição. Mayara Mota de Oliveira: Metodologia, Redação -
401 Revisão e Edição. Adriana Fraga Costa Samos Paris: Metodologia, Investigação,
402 Redação - Revisão e Edição. Greiciane Gaburro Paneto: Conceitualização, Redação
403 - Revisão e Edição, Visualização. Marco Cesar Cunegundes Guimarães:
404 Conceitualização, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Fábio Daumas Nunes:
405 Conceitualização, Recursos, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Anderson
406 Nogueira Mendes: Conceitualização, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Niels
407 Olsen Saraiva Camara: Conceitualização, Recursos, Redação - Revisão e Edição,
408 Visualização. Iuri Drumund Louro Recursos: Conceitualização, Recursos, Redação -
409 Revisão e Edição, Visualização. Adriana Madeira Alvares da Silva: Conceitualização,
410 Recursos, Administração do projeto, Redação - Revisão e Edição. Leonardo Oliveira
411 Trivillin: Conceitualização, Administração do projeto, Aquisição de financiamento,
412 Redação - Revisão e Edição. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

413 **9. Referencias**

- 414 [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer
415 statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for
416 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424.
417 <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- 418 [2] Ismail NI, Othman I, Abas F, Lajis NH, Naidu R. Mechanism of apoptosis induced
419 by curcumin in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20.
420 <https://doi.org/10.3390/ijms20102454>.
- 421 [3] Wang X, Saud SM, Zhang X, Li W, Hua B. Protective effect of Shaoyao
422 Decoction against colorectal cancer via the Keap1–Nrf2–ARE signaling
423 pathway. *J Ethnopharmacol* 2019;241.
424 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111981>.
- 425 [4] Schulz M, da Silva Campelo Borges G, Gonzaga LV, Oliveira Costa AC, Fett R.
426 Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of
427 bioactive compounds. *Food Res Int* 2016;89:14–26.
428 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>.
- 429 [5] Cardoso AL, Di Pietro PF, Vieira FGK, Boaventura BCB, de Liz S, da Silva
430 Campelo Borges G, et al. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and
431 antioxidant activity in healthy individuals. *J Funct Foods* 2015;17:152–62.
432 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.014>.
- 433 [6] Silva Campelo Borges G, Gracieli Kunradi Vieira F, Copetti C, Valdemiro
434 Gonzaga L, Zambiasi RC, Mancini Filho J, et al. Chemical characterization,
435 bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit
436 from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res Int* 2011;44:2128–33.
437 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.006>.
- 438 [7] Moreira RM, Martins ML, Leite Júnior BR de C, Martins EMF, Ramos AM,
439 Cristianini M, et al. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with
440 added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT - Food*
441 *Sci Technol* 2017;77:259–68. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.049>.
- 442 [8] Reis SO, da Luz TC, da Silva Couto CVM, Dalbó J, Nunes L de C, Martins MC,
443 et al. Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation Reduces Aberrant Crypt

- 444 Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of
445 Carcinogenesis-Induced Rats. *Nutr Cancer* 2019.
446 <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1649437>.
- 447 [9] Nualsanit T, Rojanapanthu P, Gritsanapan W, Lee SH, Lawson D, Baek SJ.
448 Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human
449 colorectal cancer cells. *J Nutr Biochem* 2012;23:915–23.
450 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.04.017>.
- 451 [10] Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong ANT. Dietary phytochemicals
452 and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms
453 in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther* 2013;137:153–71.
454 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.09.008>.
- 455 [11] Chang LC, Fan CW, Tseng WK, Hua CC. Associations between the Nrf2/Keap1
456 pathway and mitochondrial functions in colorectal cancer are affected by
457 metastasis. *Cancer Biomarkers* 2020;27:163–71. <https://doi.org/10.3233/CBM-190828>.
- 459 [12] Luo KW, Ko CH, Yue GGL, Lee JKM, Li KK, Lee M, et al. Green tea (*Camellia*
460 *sinensis*) extract inhibits both the metastasis and osteolytic components of
461 mammary cancer 4T1 lesions in mice. *J Nutr Biochem* 2014;25:395–403.
462 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.013>.
- 463 [13] Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong ANT. Dietary phytochemicals
464 and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms
465 in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther* 2013;137:153–71.
466 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.09.008>.
- 467 [14] Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2
468 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*
469 2013;1:45–9. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.
- 470 [15] Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell
471 survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med* 2013;57:119–31.
472 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.014>.
- 473 [16] Leinonen HM, Kansanen E, Pölönen P, Heinäniemi M, Levonen AL. Role of the
474 keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Adv. Cancer Res.*, vol. 122, Academic Press Inc.;

- 475 2014, p. 281–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00008-6>.
- 476 [17] Gupta P, Choudhury S, Ghosh S, Mukherjee S, Chowdhury O, Sain A, et al.
477 Dietary pomegranate supplement alleviates murine pancreatitis by modulating
478 Nrf2-p21 interaction and controlling apoptosis to survival switch. *J Nutr Biochem*
479 2019;66:17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.009>.
- 480 [18] Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell
481 survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med* 2013;57:119–31.
482 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.014>.
- 483 [19] Hassan HA, Serag HM, Qadir MS, Ramadan MF. Cape gooseberry (*Physalis*
484 *peruviana*) juice as a modulator agent for hepatocellular carcinoma-linked
485 apoptosis and cell cycle arrest. *Biomed Pharmacother* 2017;94:1129–37.
486 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.014>.
- 487 [20] Prakash D, Sudhandiran G. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium
488 chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain. *J*
489 *Nutr Biochem* 2015;26:1527–39. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.017>.
- 490 [21] Nagaraj NS, Anilakumar KR, Singh O V. Diallyl disulfide causes caspase-
491 dependent apoptosis in human cancer cells through a Bax-triggered
492 mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2010;21:405–12.
493 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.015>.
- 494 [22] Instrução Normativa Nº 1, DE 07 DE JANEIRO DE 2000. n.d.
- 495 [23] Santana AA, Cano-Higueta DM, De Oliveira RA, Telis VRN. Influence of different
496 combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp
497 (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chem* 2016;212:1–9.
498 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>.
- 499 [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-
500 time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
501 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- 502 [25] Van Eyk AD. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-
503 293 cells. *Drug Chem Toxicol* 2015;38:318–27.
504 <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.966381>.

- 505 [26] Lim SL, Lim LY. Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport
506 pathways of Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm* 2006;307:42–50.
507 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.09.017>.
- 508 [27] Matusiewicz M, Bączek KB, Kosieradzka I, Niemiec T, Grodzik M, Szczepaniak
509 J, et al. Effect of juice and extracts from *Saposhnikovia divaricata* root on the
510 colon cancer cells Caco-2. *Int J Mol Sci* 2019;20.
511 <https://doi.org/10.3390/ijms20184526>.
- 512 [28] Hayes DP. Nutritional hormesis. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:147–59.
513 <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602507>.
- 514 [29] Tan AC, Konczak I, Ramzan I, Zabaras D, Sze DMY. Potential antioxidant,
515 antiinflammatory, and proapoptotic anticancer activities of Kakadu plum and
516 Illawarra plum polyphenolic fractions. *Nutr Cancer* 2011;63:1074–84.
517 <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.596646>.
- 518 [30] Wit NJW, Hulst M, Govers C, Van Der Meulen J, Van Hoef A, Stoop G, et al.
519 Effects of digested onion extracts on intestinal gene expression: An interspecies
520 comparison using different intestine models. *PLoS One* 2016;11.
521 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160719>.
- 522 [31] Zhong S, Li Y-G, Ji D-F, Lin T-B, Lv Z-Q. Protocatechualdehyde Induces S-
523 Phase Arrest and Apoptosis by Stimulating the p27KIP1-Cyclin A/D1-CDK2 and
524 Mitochondrial Apoptotic Pathways in HT-29 Cells. *Molecules* 2016;21:934.
525 <https://doi.org/10.3390/molecules21070934>.
- 526 [32] Elkhateeb WA, Zaghlol GM, El-Garawani IM, Ahmed EF, Rateb ME, Abdel
527 Moneim AE. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis
528 through different pathways: In vivo and in vitro anticancer studies. *Biomed*
529 *Pharmacother* 2018;101:264–77. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.058>.
- 530 [33] Szaefer H, Krajka-Kuźniak V, Licznarska B, Bartoszek A, Baer-Dubowska W.
531 Cabbage Juices and Indoles Modulate the Expression Profile of AhR, ER α , and
532 Nrf2 in Human Breast Cell Lines. *Nutr Cancer* 2015;67:1344–56.
533 <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1082111>.
- 534 [34] Das S, Filippone SM, Williams DS, Das A, Kukreja RC. Beet root juice protects
535 against doxorubicin toxicity in cardiomyocytes while enhancing apoptosis in

- 536 breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2016;421:89–101.
537 <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2789-8>.
- 538 [35] Farhadi F, Jahanpour S, Hazem K, Aghbali A, Baradran B, Vahid Pakdel SM.
539 Garlic (*Allium sativum*) Fresh Juice Induces Apoptosis in Human Oral Squamous
540 Cell Carcinoma: The Involvement of Caspase-3, Bax and Bcl-2. *J Dent Res Dent
541 Clin Dent Prospects* 2015;9:267–73. <https://doi.org/10.15171/joddd.2015.047>.
- 542 [36] Tian H, Zhang BF, Di JH, Jiang G, Chen FF, Li HZ, et al. Keap1: One stone kills
543 three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Lett* 2012;325:26–34.
544 <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.007>.
- 545

5 CAPITULO 2

Artigo intitulado “Effect of supplementation with juice and pulp extract of Juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) on weight gain, hematological and biochemical profile of rats with induced colorectal cancer”.

Artigo submetido à revista Journal of Biomedical Science.

1 **Effect of supplementation with juice and pulp extract of Juçara fruit (*Euterpe***
2 ***edulis* Martius) on weight gain, hematological and biochemical profile of rats**
3 **with induced colorectal cancer**

4 Juliana Dalbó^{1*}, Flávia Vitorino Freitas², Cinthia Vida Monteiro da Silva Couto¹, Mayra
5 Cardozo Mendes², Heberth de Paula², Bárbara Risse-Quaioto¹, Suzanny Oliveira
6 Mendes¹, Tamires dos Santos Vieira¹, Bruno Régis Lyrio Ferraz², Marco Cesar
7 Cunegundes Guimarães¹, Fábio Daumas Nunes³, Anderson Nogueira Mendes⁴, Iuri
8 Drumund Louro¹, Adriana Madeira Alvares da Silva¹, Leonardo Oliveira Trivillin².

9 ¹Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe. Vitória, ES, Brasil;

10 ²Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. Alegre, ES, Brasil;

11 ³Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil;

12 ⁴Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina, PI, Brasil.

13 **Corresponding author**

14 *Juliana Dalbó, email: julianadalbo@hotmail.com

15 **Abstract**

16 **Background:** Clinical manifestations of colorectal cancer directly influence patient's
17 quality of life, in which weight loss and metabolic variations are identified. However,
18 chemoprevention of colorectal cancer, as well as prevention of clinical changes can be
19 achieved by the consumption of dietary substances. In this context, we aimed to
20 investigate the effect of supplementation with juice and pulp extract of Juçara fruit
21 (*Euterpe edulis Martius*) on body weight gain, hematological parameters and serum
22 biochemical profile in rats with induced colorectal cancer.

23 **Methods:** 43 male Wistar rats were used, 11 as a control group (G1) and 32 for
24 induction of colorectal cancer by subcutaneous administration of 1,2-
25 dimethylhydrazine (Groups G2, G3 and G4). Juçara juice and pulp extract were used
26 for supplementation in rats induced by colorectal carcinogenesis (G3 and G4,
27 respectively). Body weight gain, food consumption, biochemical and hematological
28 profile were evaluated in the 11th and 23rd weeks of the experiment. Shapiro-Wilk
29 normality test, One-way variance analysis followed by Tukey's post hoc or Kruskal-
30 Wallis analysis of variance, followed by Dumn's post hoc were used to verify
31 differences in means or medians between groups.

32 **Results:** Results revealed loss of body weight in the groups induced to cancer in 23rd
33 week, and lower food consumption by the same groups in the 11th and 23rd weeks.
34 There was a decrease in aspartate aminotransferase levels in G3 group and an
35 increase of low density lipoproteins levels in G4 group at the 11th week. And an
36 increase of alanine aminotransferase levels in G3 group compared to G1 and G2
37 groups at the 11th week was observed. A decrease in serum albumin levels was
38 observed in G3 group compared to G1 group at the 23rd week. And hematological
39 changes were associated with animals age.

40 **Conclusions:** We conclude that supplementation with juçara fruit acts positively on
41 aspartate aminotransferase levels, however, significantly affect food consumption and
42 body weight gain with negative effects on serum albumin and liver biochemical markers
43 such as alanine aminotransferase and low density lipoprotein.

44 **Trial registration:** Ethics and Animal Use Committee of Federal University of Espírito
45 Santo (043/2013).

46 **Key words:** Bioactive substances; Biochemical markers; Experimental
47 carcinogenesis; Nutritional effect.

48 **Introduction**

49 Colorectal cancer is a global health problem, in 2018 it presented 861,663 death cases
50 and 1,800,977 new cases. These rates lead the disease to the second leading cause
51 of mortality in the world and the third most common type of cancer [1].

52 In colorectal cancer development, it is evidenced clinical manifestations which directly
53 influence patient's quality of life, as it is related to consumption and absorption of
54 nutrients [2]. Clinical manifestations frequently shown are weight reduction, associated
55 with muscle and fat tissue depletion, immune dysfunction, among other metabolic
56 variations. Simultaneously, changes in biochemical and hematological parameters
57 occur, mainly in albumin, leukocytes and erythrocytes levels [2].

58 However, dietary substances consumption contributes to chemoprevention of
59 colorectal cancer, in which they prevent, inhibit or invert its development risk [3,4]. In
60 this context, the antioxidant and anti-inflammatory properties of fruits and vegetables

61 can contribute to the protective process for carcinogenesis and colorectal cancer
62 progression, as well as in its clinical manifestations [5,6].

63 The Juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) fruit, native from Brazilian Atlantic Forest,
64 stands out for its high concentration of phenolic compounds, which have been studied
65 in the prevention of cardiovascular, neurodegenerative diseases and cancer, due to
66 their chemical and photochemical composition , with anti-inflammatory, antidiabetic,
67 antimicrobial and antioxidant potential [3,7].

68 Antioxidant substances act in lipid peroxidation mediated by free radicals, through its
69 elimination [8–11]. Thus, these substances act in regulation of gene expression and
70 modulation of cell signaling pathways involved in DNA damage repair, cell proliferation,
71 invasion [11,12] and apoptosis [13].

72 Antioxidants also prevent liver damage caused by lipid peroxidation and maintain its
73 enzymes regulation such as alanine aminotransferase (ALT) [14] and aspartate
74 aminotransferase (AST) [3,15–17]. These substances are known to act in the reduction
75 of fasting blood glucose [18] and in the increase of high density lipoproteins (HDL)
76 levels [3,17,19], also presenting functionality in decreasing blood levels of triglycerides
77 [20], total cholesterol, low density lipoproteins (LDL) [21] and VLDL [22].

78 Substances with antioxidant properties reduce the rate of circulating inflammatory cells
79 and the inflammatory process, as well as restore hemoglobin levels, that improve the
80 condition of myelosuppression and anemia, which are the main complications of
81 cancer chemotherapy [23,24], still, it acts in the increase of hematocrit and
82 erythrocytes levels [25].

83 Despite the growing study on bioactive compounds present in fruitful species, more
84 information is still needed about their antitumor properties, as well as the clinical
85 manifestations during the development of cancer, such as metabolic changes,
86 especially those observed in colorectal cancer patients. On the other hand,
87 understanding bioactive substances effects on metabolic profile of cancer patients
88 would be of great importance for nutritional support during disease stages. In this
89 context, we aimed to investigate the effect of supplementation with juice and pulp
90 extract of Juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) on body weight gain, hematological
91 parameters and serum biochemical profile in rats with induced colorectal cancer.

92 **Methods**

93 **Juice and pulp extract of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit**

94 A commercial batch of fine pulp (type C) of organic Juçara (*Euterpe edulis* Martius)
95 fruit, from the city Rio Novo do Sul, located in the southern region of the state of Espírito
96 Santo (latitude 20° 49' 30" S, longitude 41° 00' 00" W), was used. The lot purchased
97 from juçara fruit pulp complies with the Identity and Quality Standards (PIQ) of
98 Normative Instruction N° 01, from January 7, 2000, of Brazilian Ministry of Agriculture
99 and Food Supply.

100 Phenolic substances were extracted from the pulp according to the methodology of
101 Weinges and Nader (1992) [26]. From the pulp extract, anthocyanin pigment was
102 quantified by differential pH method, according to Giusti and Wrolstad (2001) [27],
103 resulting in 107.08 mg of cyanidin-3-glycoside per gram of pulp. The value found for
104 total anthocyanins was used to calculate supplementation of pulp juice and lyophilized
105 phenolic substances, following the formula $DxP/[]$, so that each animal received
106 1mg/kg of total anthocyanins.

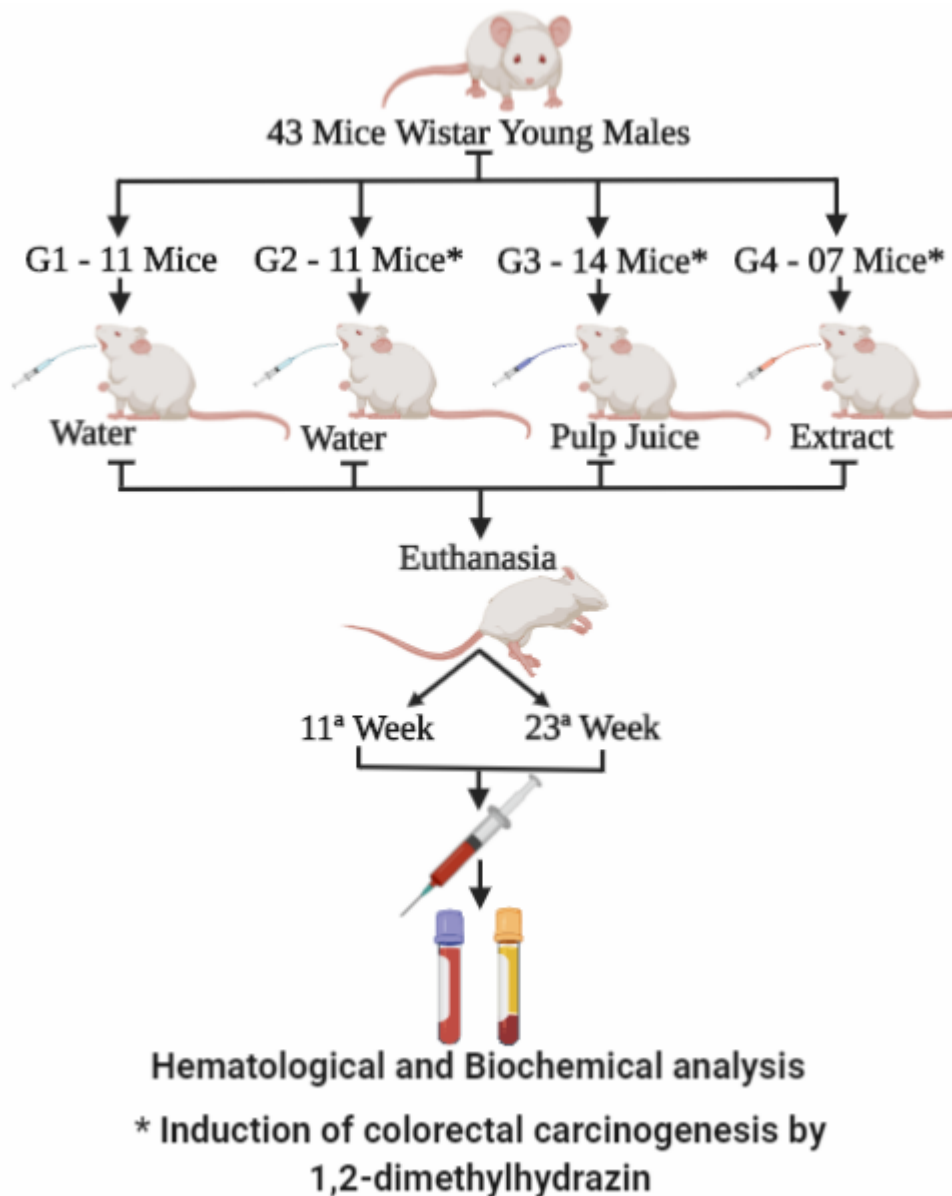
107 **Experimental Model**

108 For the experiment 43 male Wistar rats, four months old, were included, randomly
109 divided into four experimental groups, namely G1 Group: 11 animals without
110 carcinogenesis induction and not supplemented with Juçara fruit; G2 Group: 11
111 animals induced to carcinogenesis and not supplemented with Juçara fruit; G3 Group:
112 14 animals induced to carcinogenesis and supplemented with Juçara fruit juice, at a
113 concentration of 1.0% (w/v); G4 Group: 07 animals induced to carcinogenesis and
114 supplemented with extract of lyophilized phenolic substances from Juçara fruit pulp,
115 diluted in water at a concentration of 0.2% (w/v) (Figure 1).

116 For colorectal carcinogenesis induction, 1,2-dimethylhydrazine (DMH) chemical agent
117 was used, according to methodology modified by Laranjeira et al. (1998) [28], in which
118 DMH was dissolved in 0.9% NaCl containing 1.5% EDTA as a vehicle, at a final pH of
119 6.5, which was achieved with the use of 1N NaOH solution when necessary. DMH
120 application occurred subcutaneously, once a week, for a period of five weeks, in the
121 final dose of 240mg/kg.

122 In the sixth week of the experiment, supplementation with juice and extract of phenolic
 123 substances was started, in the form of gavage, with availability three times a week,
 124 according to methodology modified by Reis and Contributors (2019) [29]. Animals'
 125 weight was monitored weekly and the feed intake daily by weighing, during 23 weeks
 126 of experiment.

127 In the 11th week (M1), euthanasia was performed to collect blood by cardiac puncture,
 128 from four animals in each group, except G4, in which only two animals were
 129 euthanized, due to the lower sample in the group. On the 23rd week (M2), a second
 130 blood collection was performed with the remaining animals.



131

132 Figure 1. Methodology development representation used in the experiment.

133 **Biochemical and hematological parameters**

134 To assess total plasma proteins, a manual density and protein refractometer was used.
135 Analyzes of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total
136 cholesterol, triglyceride, high density lipoproteins (HDL), low density lipoproteins (LDL),
137 very low density lipoproteins (VLDL), albumin and hemoglobin levels were performed
138 by the automatic biochemical analyzer (BS 120 Mindray). Hematocrit analysis was
139 performed by capillary with hematocrit reading card aid. Leukogram, erythrogram and
140 differential leukometry were performed using a Nikon® light microscope.

141 **Data analysis**

142 Variables such as weight gain, food consumption, AST, ALT, total cholesterol and
143 fractions, triglycerides, serum albumin, total plasma protein, erythrocytes, hematocrit,
144 hemoglobin and leukometry (total leukocytes and cell count) were analyzed for
145 normality by Shapiro-Wilk test.

146 In the 11th week, the variables body weight gain, total cholesterol, HDL, erythrocytes,
147 hematocrit and neutrophils were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA),
148 followed by Tukey's post hoc test when necessary. The variables food consumption,
149 AST, ALT, LDL, VLDL, triglycerides, total plasma protein, serum albumin, hemoglobin,
150 total leukocytes, lymphocytes, monocytes, basophils and eosinophils were tested by
151 Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by Dumn's post hoc test when required.

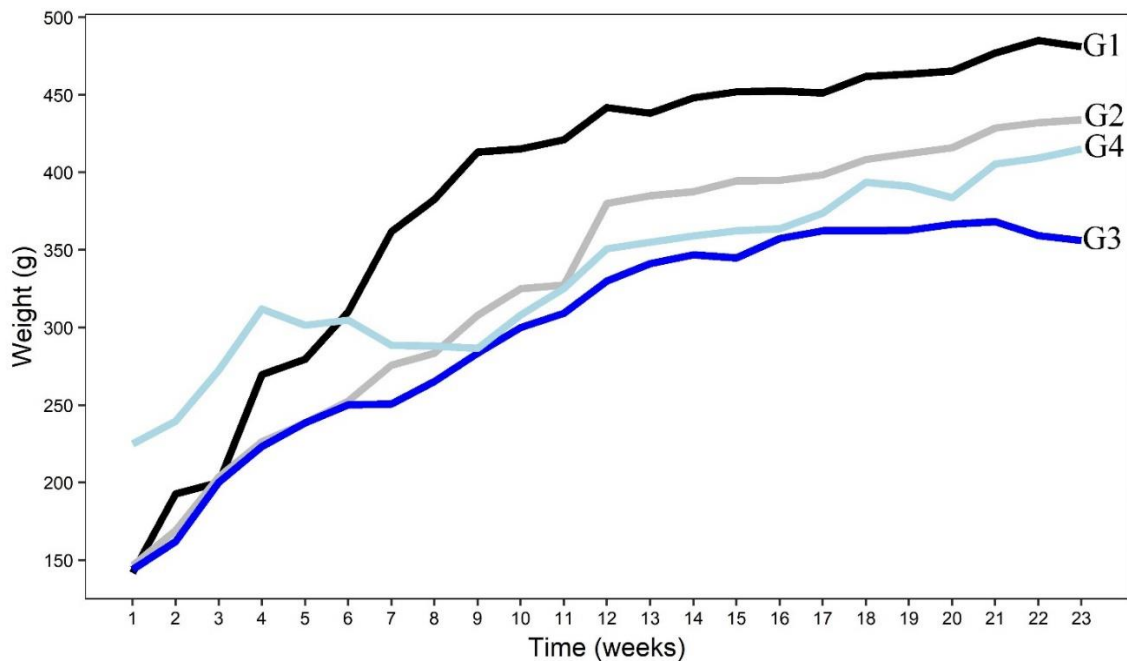
152 In the 23rd week of experiment, variables total cholesterol, HDL, erythrocytes,
153 hematocrit and neutrophils were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA),
154 followed by Tukey's post hoc when necessary. While the variables body weight gain,
155 food consumption, AST, ALT, LDL, VLDL, triglycerides, total plasma protein, serum
156 albumin, hemoglobin, total leukocytes, lymphocytes, monocytes, basophils and
157 eosinophils were tested by Kruskal-Wallis analysis of variance , followed by Dumn's
158 post hoc when necessary.

159 All analyzes and figures were developed using R Statistical Software (R Development
160 Core Team), considering a significance level of 5%.

161 **Results**

162 **Body weight gain and food consumption**

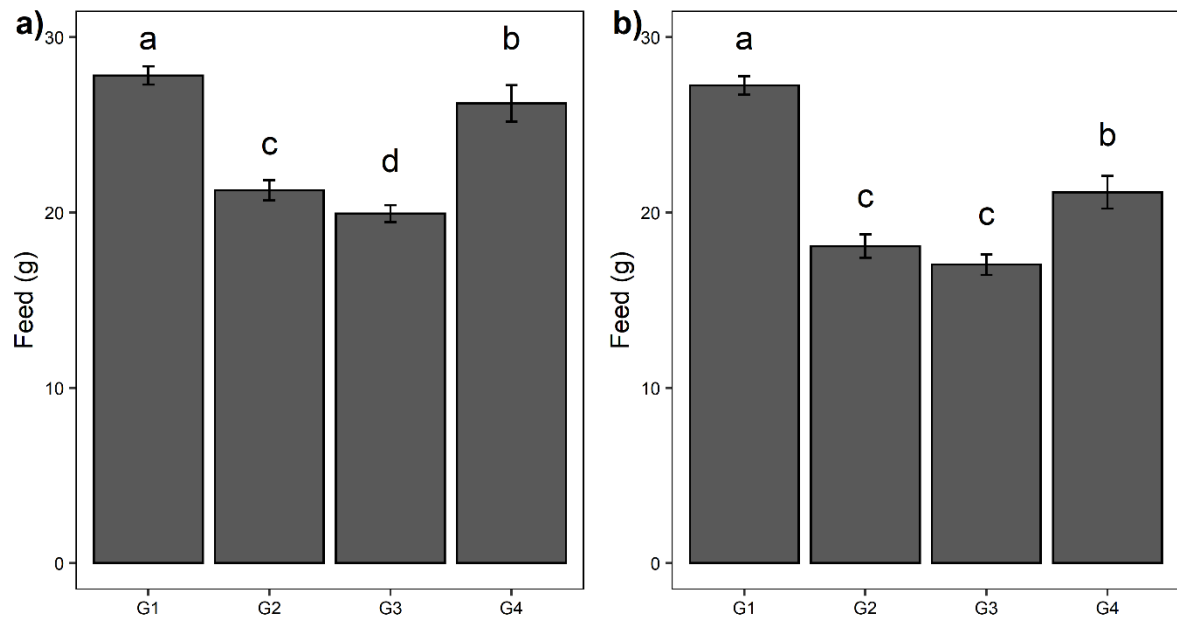
163 Body weight gain from the animals of this study during the 23 weeks of experiment is
 164 shown on figure 2. During the first 11 weeks it was observed no significant difference
 165 between studied groups ($p>0.005$). However, in the 23rd week of experimentation,
 166 there was a significant reduction in body weight gain of animals belonging to groups
 167 G2 ($p=0.1017$), G3 ($p=0.0108$) and G4 ($p=0.0057$), when compared to animals in group
 168 G1.



169

170 Figure 2. Body weight gain of rats submitted or not to colorectal carcinogenesis.
 171 Weekly monitoring of animals' body weight gaining during the 23 weeks of experiment
 172 of animals not induced and not supplemented with juçara fruit (G1), induced to
 173 colorectal carcinogenesis and not supplemented with juçara fruit (G2), induced to
 174 colorectal carcinogenesis and supplemented with juçara fruit juice (G3) and induced to
 175 colorectal carcinogenesis and supplemented with extract of juçara fruit pulp (G4).

176 Feed intake decreased in groups induced to carcinogenesis compared to group G1
 177 ($p<0.00001$) in both analyzes of the 11th and 23rd week (Figure 3). It is also observed
 178 a decrease in food consumption in groups G2 ($p=0.0097$) and G3 ($p<0.00001$) in the
 179 11th week compared to the G4 group, as well as in the 23rd week in groups G2 and G3
 180 compared to the G4 group ($p=0.0264$ for both groups). Still, in 23rd week there was a
 181 decrease in group G3 compared to group G2 ($p=0.0264$).



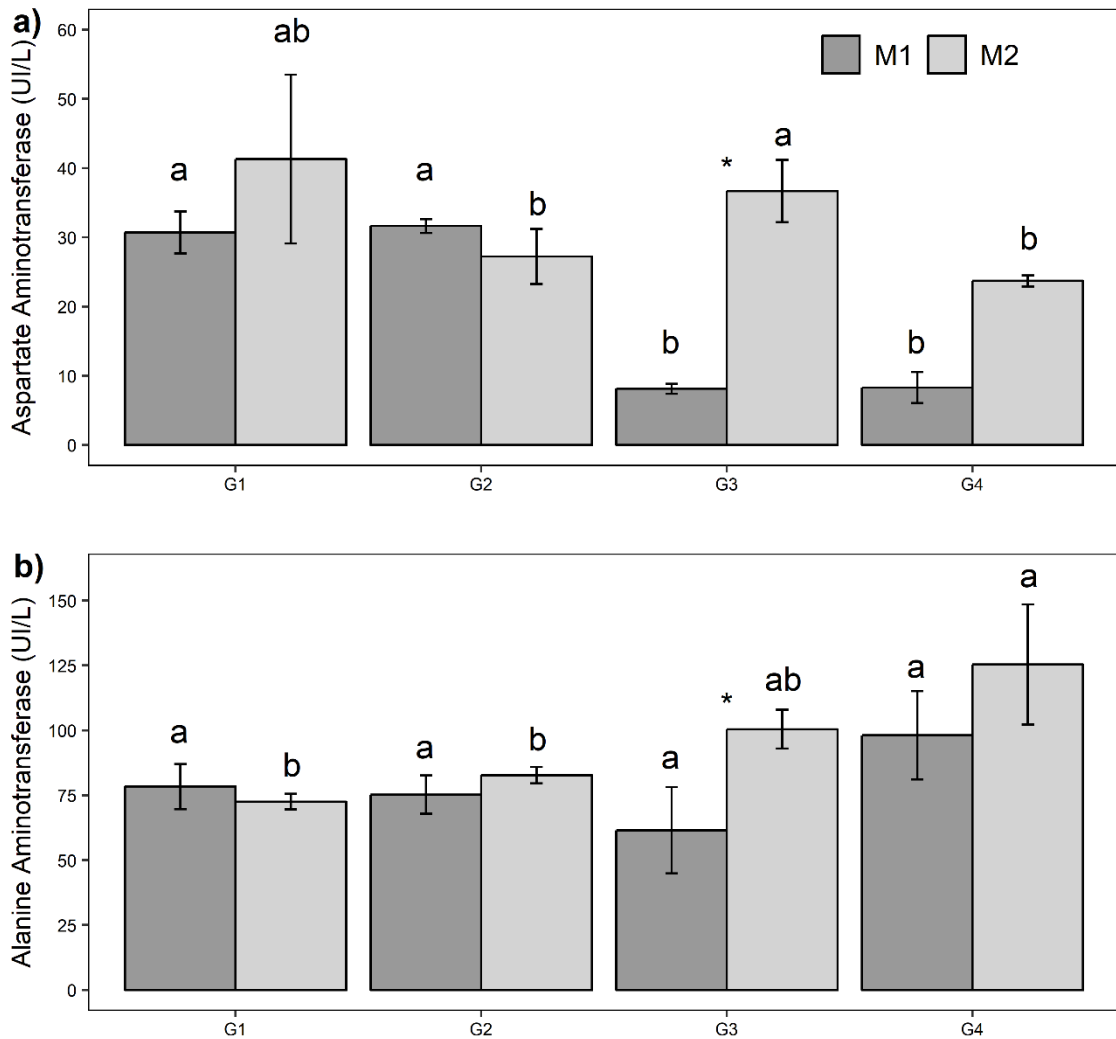
182

183 Figure 3. Food consumption of rats a) monitoring of food consumption in the 11th week
 184 (M1) of experiment. b) monitoring of food consumption in the 23rd week (M2) of
 185 experiment. The means with different letters differ from each other and means with the
 186 same letters do not differ from each other.

187 **Biochemical parameters**

188 There was a decrease of aspartate aminotransferase (AST) levels in the 11th week of
 189 experimentation in groups G3 ($p=0.0255$) and G4 ($p=0.0084$) compared to groups G1
 190 and G2, respectively (Figure 4a). Significant decreases in AST levels were also
 191 observed in the 23rd week of experimentation in G2 ($p=0.0369$) and G4 ($p=0.0338$)
 192 groups in relation to G3 group. In addition, a significant increase of AST levels was
 193 identified in G3 group from 11th to 23rd week of experimentation ($p=0.0003$).

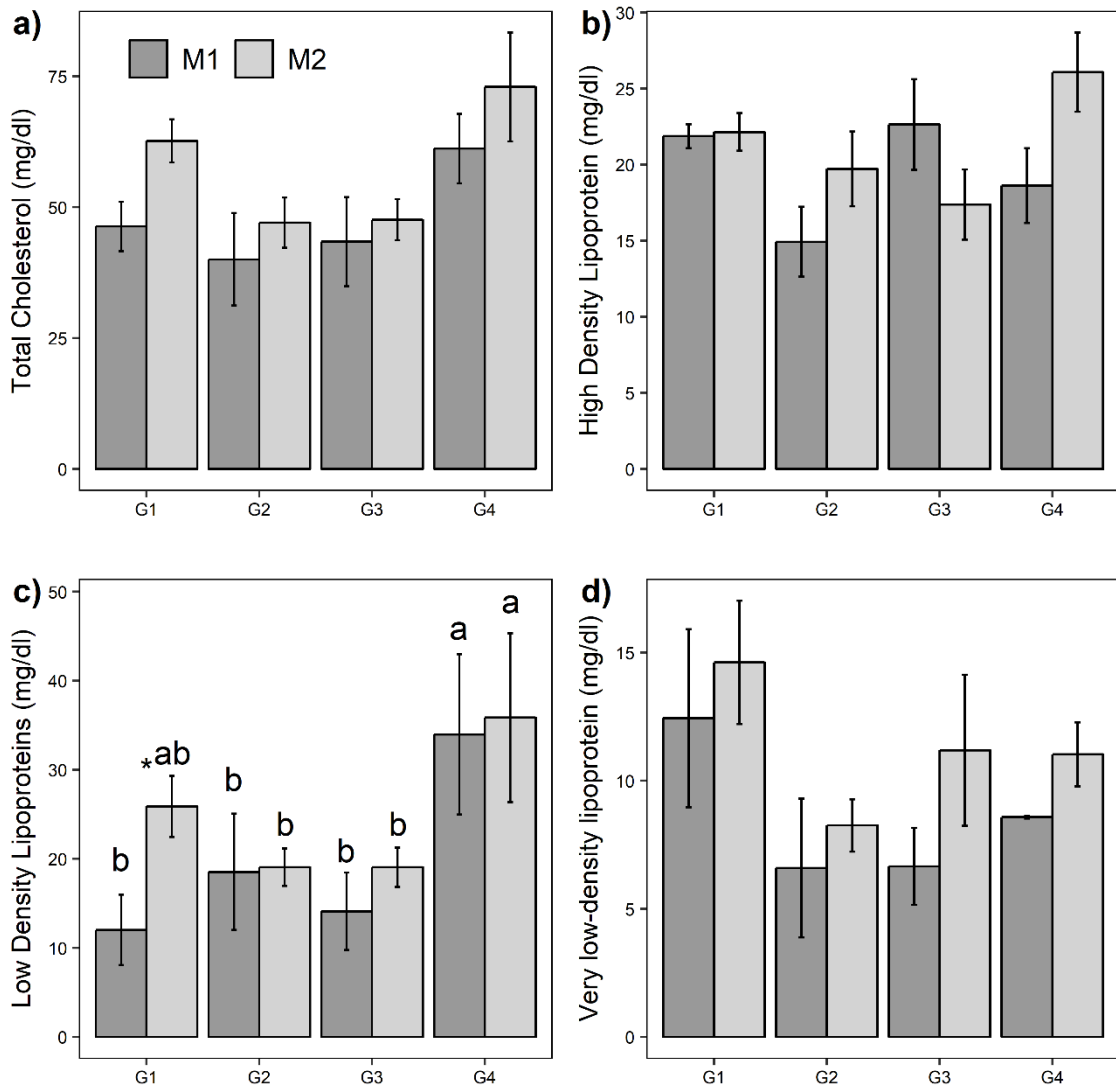
194 Alanine aminotransferase (ALT) levels analysis did not reveal any significant difference
 195 in 11th week of experimentation (Figure 4b). However, there was a significant increase
 196 in ALT levels at the 23rd week in G4 group compared to G1 ($p=0.0008$) and G2
 197 ($p=0.0202$) group. Furthermore, the results reveal a significant increase in ALT levels
 198 in G3 group from 11th week to 23rd week of experimentation ($p=0.0207$).



199

200 Figure 4. Aspartate aminotransferase and alanine transferase levels. M1 – 11th week
 201 of experiment and M2 – 23rd week of experiment. a) Aspartate aminotransferase levels
 202 b) Alanina aminotransferase leves. * significant increase in parameters in the group
 203 from M1 to M2. The means with different letters differ from each other and means with
 204 same letters do not differ from each other.

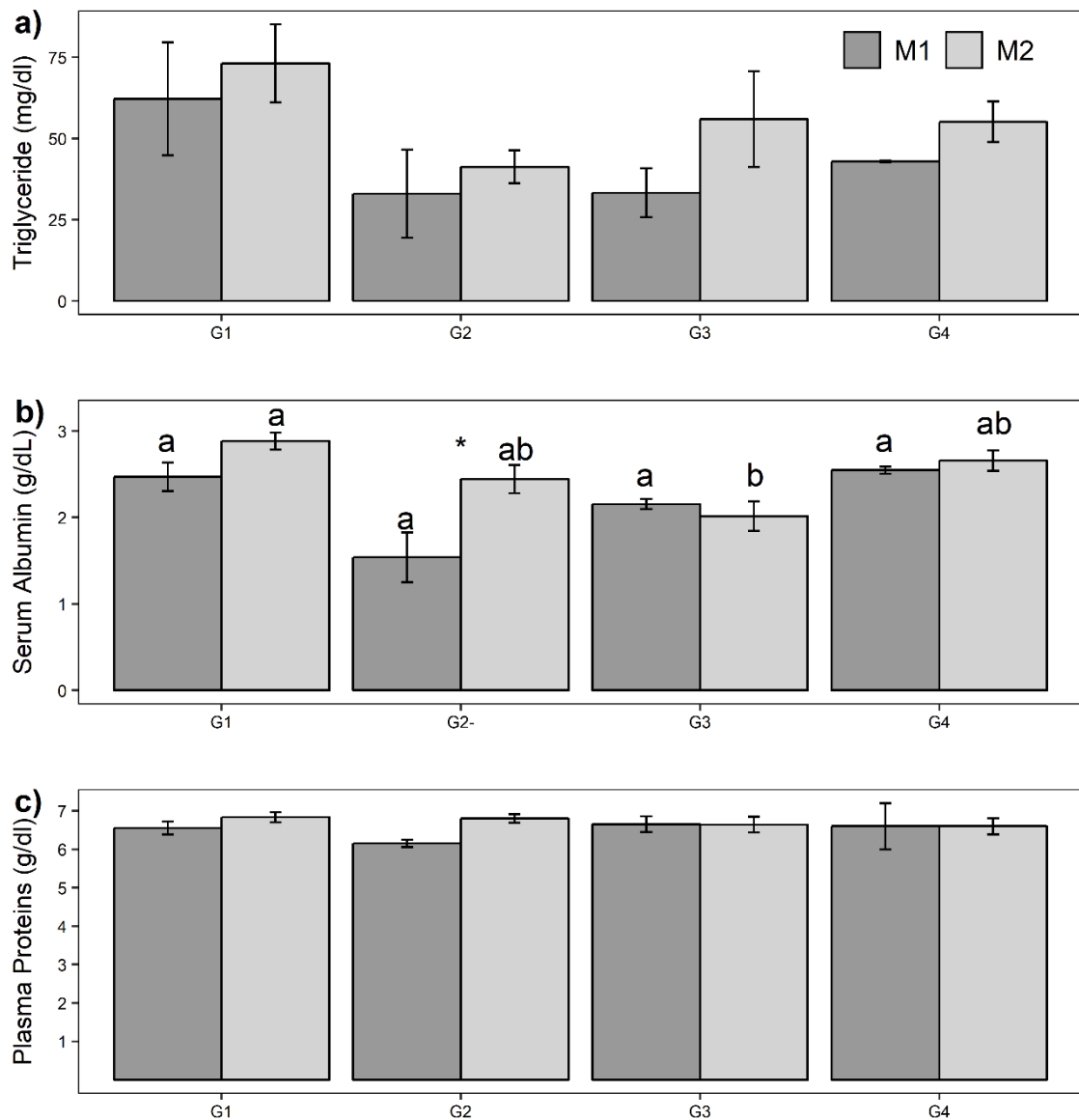
205 The levels of total cholesterol, high-density lipoproteins (HDL) and very low-density
 206 lipoproteins (VLDL) do not present a significant difference between experimental
 207 groups, in 11th and 23rd weeks of experiment (Figure 5). However, there was a
 208 significant increase of low-density lipoproteins (LDL) levels in G4 group compared to
 209 G1 ($p=0.0117$), G2 ($p=0.0414$) and G3 ($p=0.0203$) groups in M1. Still, it was possible
 210 to observe a significant increase in LDL levels in G4 group compared to groups G2
 211 ($p=0.0475$) and G3 ($p=0.0360$) in M2. Moreover, there was also a significant increase
 212 in LDL levels in G1 group from 11th week to 23rd week of study ($p=0.0084$).



213

214 Figure 5. Total cholesterol, HDL, LDL and VLDL levels. M1 - 11th week of experiment
 215 and M2 - 23rd week of experiment. a) Total cholesterol levels. b) HDL levels. c) LDL
 216 levels. d) VLDL levels. * significant increase in parameters in the group from M1 to M2.
 217 Means with different letters differ from each other and means with equal letters do not
 218 differ from each other.

219 As for triglycerides and total plasma protein, no difference was observed between the
 220 experimental groups, both in 11th and 23rd weeks of experimentation (Figure 6).
 221 However, serum albumin levels showed a significant difference, with decreased levels
 222 in G3 group in relation to G1 ($p=0.0005$) in 23rd week. In addition, analyzes show a
 223 significant increase in serum albumin levels in G2 group ($p=0.0127$) from 11th to 23rd
 224 week of study (figure 6b).



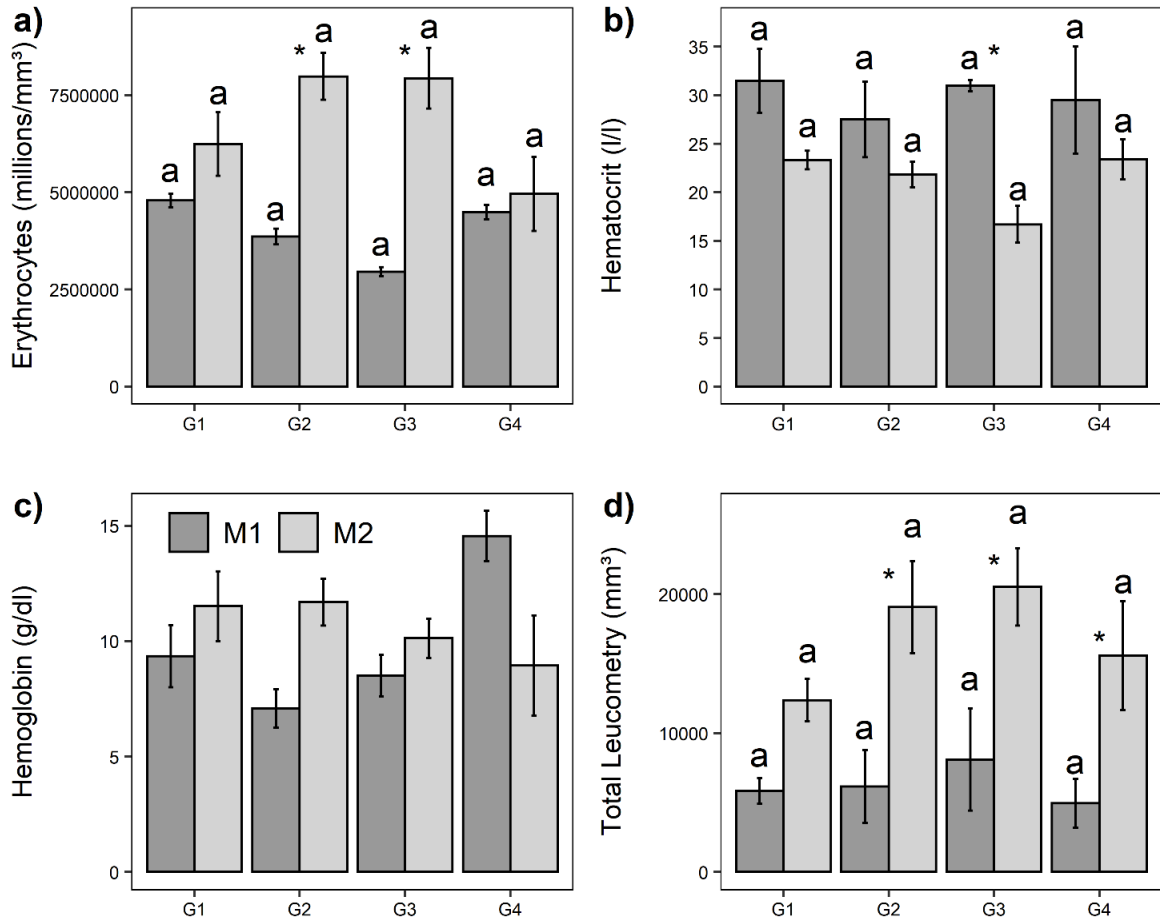
225

226 Figure 6. Triglyceride, serum albumin and total plasma protein levels. M1 – 11th week
 227 of experiment and M2 – 23rd week of experiment. a) Triglyceride levels. b) Serum
 228 albumin levels. c) Total plasma protein levels. * significant increase in parameters in
 229 the group from M1 to M2. The means with different letters differ from each other and
 230 means with the same letters do not differ from each other

231 Hematological parameters

232 Our result shows an increase in erythrocyte parameters in groups G2 ($p=0.0009$) and
 233 G3 ($p=0.0055$) from 11th to 23rd week of study (Figure 7a). There was also a decrease
 234 in hematocrit parameters in G3 ($p=0.0008$) from 11th to 23rd week of study (Figure 7b).

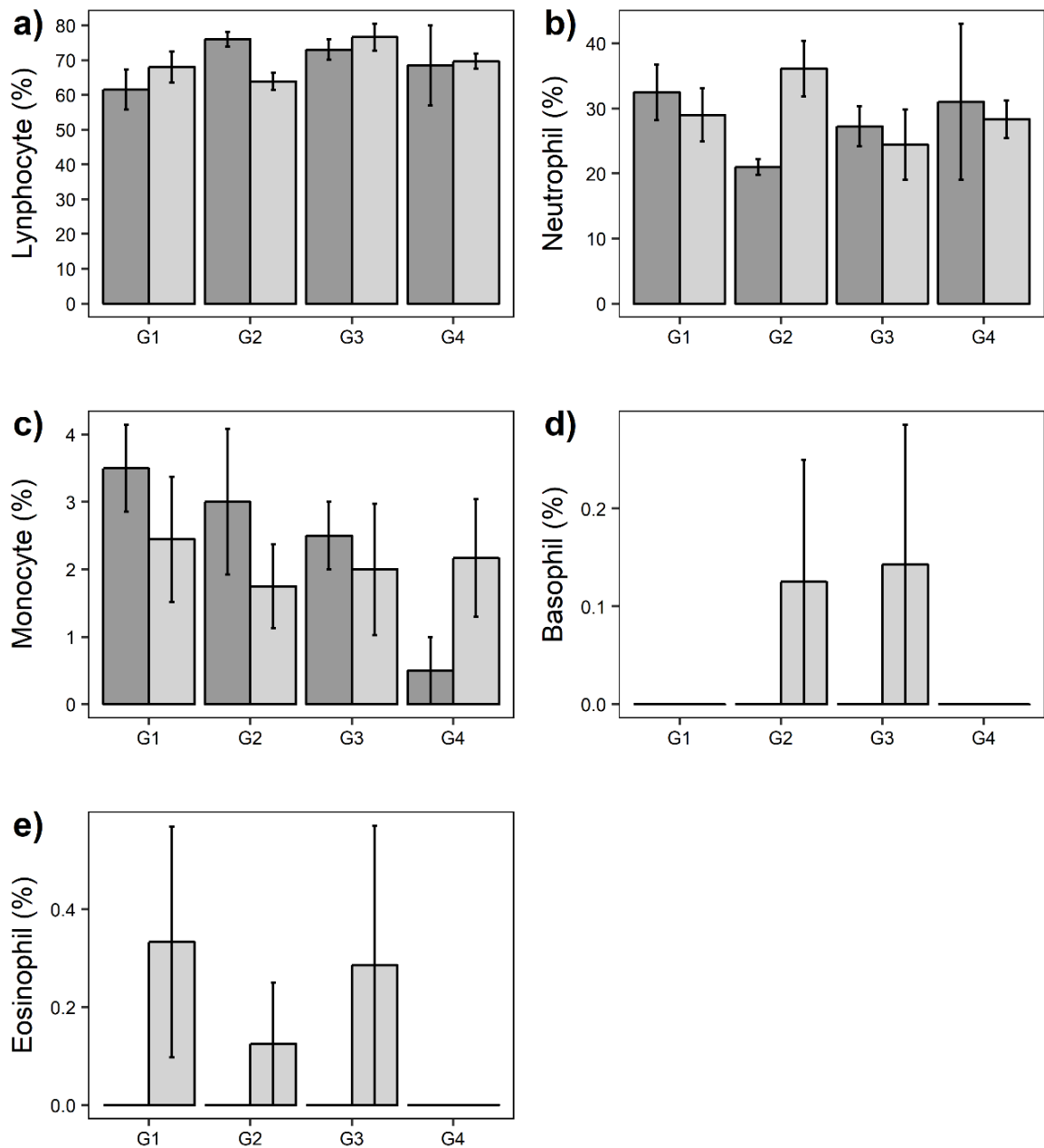
235 Hemoglobin analyzes did not show variance between groups in 11th and 23rd weeks of
 236 experiment (Figure 7c). However, leukogram indicates a significant increase in levels
 237 in groups G2 ($p=0.0041$), G3 ($p=0.0055$) and G4 ($p=0.0432$) from 11th to 23rd week of
 238 study (Figure 7d).



239

240 Figure 7. Leukogram, erythrogram, hemoglobin and hematocrit levels. M1 – 11th week
 241 of experiment and M2 – 23rd week of experiment. a) Erythrocytes levels. b) Hemoglobin
 242 levels. c) Hematocrit levels. d) Total leukocytes levels. * significant increase or
 243 decrease in parameters in the group from M1 to M2. The averages with the same
 244 letters do not differ.

245 As for the relative leukocyte count (lymphocytes, monocytes, neutrophils, basophils
 246 and eosinophils), no difference was observed between studied groups (Figure 8).



247

248 Figure 8. Relative values of leukogram. Dark gray column: M1 – 11th week of
 249 experiment. Light gray column: M2 – 23rd week of experiment. a) Lymphocyte levels,
 250 b) Neutrophil levels, c) Monocyte levels, d) Basophil levels, e) Eosinophil levels. Means
 251 without letters did not show variance between groups.

252 Discussion

253 Our results showed that animals subjected to colorectal carcinogenesis and
 254 supplemented with juçara fruit showed important metabolic changes, especially with
 255 regard to food consumption and weight gain, as well as changes in alanine

256 aminotransferase (ALT), low density lipids (LDL) and albumin levels. In colorectal
257 carcinogenesis, besides colonic mucosa changes, there were also clinical changes
258 such as weight loss, immune dysfunction and resulting metabolic variations, as well as
259 changes in biochemical and hematological parameters [2].

260 Regarding body weight, our results showed a reduction in weight gain in groups
261 induced by carcinogenesis during the 23 weeks of experiment. A study performed by
262 Saad-Hossne and collaborators (2005) with humans in advanced stages of colorectal
263 cancer also showed loss of body weight [30]. About these results, it is described that
264 the first noticeable sign in colorectal cancer is weight loss, mainly involved with the
265 damage caused by advanced disease and associated with decreased food intake and
266 increased energy expenditure or both [31,32]. Interestingly, our animals induced to
267 colorectal carcinogenesis showed a reduction in food consumption in the early stages
268 of experiment. Thus, the relationship between food consumption and body weight gain
269 in patients with colorectal cancer should be evaluated in order to avoid severe
270 metabolic changes.

271 Following the proposal to evaluate metabolic changes in patients with colorectal
272 cancer, our results regarding AST, showed that supplementation with juçara fruit tends
273 to recover normal levels in the presence of established neoplastic lesions, where
274 metabolic changes are extremely serious. A study found a reduction in serum AST
275 levels when mice were supplemented for 7 days with aqueous extract of *H. japonicum*,
276 a phytotherapeutic rich in oxidizing substances [33]. Son et al. (2017) also found that
277 supplementation with phenolic acid and flavonoid reduced levels of AST and ALT
278 which were increased by the induction of D-galactosamine (GalN) in rats [34]. In this
279 way, the Juçara fruit can play an important role in preventing liver damage, since the
280 first signs of toxicity are given by the increased plasma levels of AST and ALT [15,35].

281 As for ALT levels, our results showed a significant increase in the group supplemented
282 with pulp extract of juçara fruit, at an advanced stage of neoplastic development.
283 However, the use of aqueous green tea extract, rich in phenolic substances, promotes
284 a reduction in serum ALT levels in rats [14]. The literature describes an increase in
285 ALT levels commonly related to lipid peroxidation mediated by oxidative stress [16,17].

286 We believe that in our study, supplementation with pulp extract of juçara fruit caused
287 liver overload or even potentiated oxidative stress, and consequently elevated ALT

288 levels. Another important point to be evaluated is the dosage and supplementation
289 time, since there are no established dosages for this product, and especially when
290 related to patients with colorectal cancer.

291 The lipid profile of animals in this study show any significant changes, except for LDL,
292 which was elevated in the group supplemented with pulp extract of juçara fruit since
293 the beginning of colorectal carcinogenesis. There was an increase in LDL levels
294 between 11th and 23rd weeks of study in G1 group, a fact possibly related to the
295 animals' age [36].

296 A study by Dembistky and collaborators (2011) associated polyphenols and fibers
297 present in fruits and vegetables to prevent LDL oxidation, with a reduction in serum
298 levels [12]. Another study on LDL levels associated polyphenols with reduced intestinal
299 absorption of dietary lipids by interfering with their emulsification, digestion and micellar
300 solubilization [37]. On the other hand, the increase in the LDL fraction is also
301 associated with the increase in oxidative stress, which in turn can promote neoplastic
302 growth [22]. Thus, we believe that animals belonging to G4 group presented high levels
303 of LDL due to greater oxidative stress caused by supplementation with extract, similar
304 to what was observed with ALT, therefore, the study of LDL and ALT in supplemented
305 colorectal cancer patients with juçara fruit deserves further investigation.

306 Regarding albumin analysis, our results showed a reduction in their levels in the group
307 supplemented with juçara pulp juice compared to G1 group in the 23rd week of
308 experiment. In humans, serum albumin is one of the parameters used to assess
309 nutritional status of cancer patients. Besides, a decrease in albumin levels is correlated
310 with chronic malnutrition and increased morbidity and mortality [38]. Interestingly, in
311 our study, the group with the lowest albumin level also had low food intake compared
312 to others, possibly related to higher caloric intake of lipids present in the fruit pulp of
313 juçara [39], which leads to lower dietary intake and, consequently, alteration of albumin
314 parameters due to lower protein intake.

315 In relation to hematological analysis, an increase in leukocyte levels from 11th to 23rd
316 week was observed in the groups induced to carcinogenesis. Colorectal cancer is
317 correlated with inflammation and it is important in mediating leukocyte production in
318 response to reactive oxygen species in the carcinogenesis process [40]. This fact
319 justifies the high number of leukocytes in the presence of a tumor. In addition to the

320 groups induced to carcinogenesis, an increase in white blood cell count over the weeks
321 in group G1 is noticeable. A study demonstrated the progressive increase in white
322 blood cell count with the growth and advancement of healthy Wistar rats [41].
323 O'Connell et al. (2015) corroborate the increase in leukometry with the growth of
324 animals [42]. Thus, it is possible to verify an increase in leukometry over time during
325 the experiment and that it is related to the animal's physiology.

326 **Conclusions**

327 We conclude that supplementation with juçara fruit acts positively on aspartate
328 aminotransferase levels, however, significantly affect food consumption and body
329 weight gain, with important effects on serum albumin and liver biochemical markers
330 such as alanine aminotransferase and lipoprotein low density.

331 **List of abbreviations**

332 AST - aspartate aminotransferase
333 ALT - alanine aminotransferase
334 HDL - high density lipoproteins
335 LDL - low density lipoproteins
336 DMH -1,2-Dimetilhidrazina
337 VLDL - very low density lipoprotein
338 M1 - 11th week of experiment
339 M2 - 23rd week of experiment

340 **Declarations**

341 **Ethical approval and consent to participate**

342 This study was approved by Ethics and Animal Use Committee of Federal University
343 of Espírito Santo under protocol 043/2013.

344 **Consent for publication**

345 Not applicable

346 **Availability of data and materials**

347 All data generated or analyzed during this study is included in this published article.

348 **Competitive interests**

349 The authors declare that they have no competing interests.

350 **Funding**

351 This study was funded by the Foundation for Research and Innovation Support of the
352 State of Espírito Santo – FAPES and by Coordination for the Improvement of Higher
353 Education Personnel - CAPES. The funders had no role in study design, data collection
354 and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

355 **Authors' contribution**

356 Study concept and design: JD, IDL, LOT, AMAS, FDN; Extraction and quantification of
357 phenolic substances: JD, CVMSC; Colorectal carcinogenesis induction, body weight
358 monitoring and supplementation: JD, CVMSC, LOT; Biochemical and hematological
359 analysis: JD, MCM, HP; Statistical analysis: JD, FVF, ANM; Manuscript writing: JD,
360 BR, SOM, TSV, BRLF, MCCG, ANM, LOT, AMAS. All authors read and approved the
361 final manuscript.

362 **Acknowledgment**

363 To Biotechnology/Renorbio Graduate Program, Federal University of Espírito Santo;
364 to the Foundation for Research and Innovation Support of the State of Espírito Santo
365 – FAPES and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel
366 - CAPES.

367 **Author information**

368 Not applicable.

369 **References**

- 370 1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer
371 statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36
372 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. American Cancer Society; 2018;68:394–
373 424.
- 374 2. Niños DL. Desnutrição em Crianças até 12 Anos com Leucemia Atendidas no Grupo
375 em Defesa de Criança com Câncer no Município de Jundiaí , SP Malnutrition in

- 376 Children up to 12 Years Old with Leukemia Treated at the Institute for the Defense of
377 Children with Cancer in. *Rev Bras Cancerol.* 2012;58:231–9.
- 378 3. Oliveira JR, Camargo SEA, Oliveira LD. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as
379 therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science;*
380 2019;26:1–22.
- 381 4. Leser SM, Soares E de A. Aspectos nutricionais e atividade física na prevenção do
382 câncer colorretal TT - Dietary factors and physical activity in colorectal cancer
383 prevention. *Nutr Rev Soc Bras Aliment Nutr.* 2001;21:121–45.
- 384 5. Moura NA, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MAM, et al.
385 Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon
386 carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:2902–10.
- 387 6. Chen CL, Chen CY, Chen YP, Huang YB, Lin MW, Wu DC, et al. Betulinic acid
388 enhances TGF- β signaling by altering TGF- β receptors partitioning between lipid-
389 raft/caveolae and non-caveolae membrane microdomains in mink lung epithelial cells.
390 *J Biomed Sci.* 2016;23:1–15.
- 391 7. He J, Giusti MM. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties.
392 *Annu Rev Food Sci Technol.* 2010;1:163–87.
- 393 8. Morsy MD, Mostafa OA, Hassan WN. A potential protective effect of α -tocopherol on
394 vascular complication in spinal cord reperfusion injury in rats. *J Biomed Sci.* 2010;17.
- 395 9. Ping-Chia L, I-Ju L, Yu-Ching L, Li-Ching C, Wen-Chung C. Substance P scavenger
396 enhances antioxidant defenses and prevents prothrombotic effects on the rat lung after
397 acute exposure to oil smoke. *J Biomed Sci.* 2009;16.
- 398 10. Castillo RL, Zepeda AB, Short SE, Figueroa E, Bustos-Obregon E, Farías JG.
399 Protective effects of polyunsaturated fatty acids supplementation against testicular
400 damage induced by intermittent hypobaric hypoxia in rats. *J Biomed Sci.* 2015;22:1–
401 9.
- 402 11. Hou CW. Pu-Erh tea and GABA attenuates oxidative stress in kainic acid-induced
403 status epilepticus. *J Biomed Sci [Internet]. BioMed Central Ltd;* 2011;18:75. Available
404 from: <http://www.jbiomedsci.com/content/18/1/75>

- 405 12. Dembitsky VM, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S,
406 Trakhtenberg S, et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological
407 activity and active metabolites. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44:1671–
408 701. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.003>
- 409 13. Wu S-Y, Wen Y-C, Ku C-C, Yang Y-C, Chow J-M, Yang S-F, et al. Penfluridol
410 triggers cytoprotective autophagy and cellular apoptosis through ROS induction and
411 activation of the PP2A-modulated MAPK pathway in acute myeloid leukemia with
412 different FLT3 statuses. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science*; 2019;26:1–13.
- 413 14. Lin BR, Yu CJ, Chen WC, Lee HS, Chang HM, Lee YC, et al. Green tea extract
414 supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of
415 apoptotic and proinflammatory signaling. *J Biomed Sci*. 2009;16:1–14.
- 416 15. Du H, Zhao X, You JS, Park JY, Kim SH, Chang KJ. Antioxidant and hepatic
417 protective effects of lotus root hot water extract with taurine supplementation in rats
418 fed a high fat diet. *J Biomed Sci*. 2010;17:1–6.
- 419 16. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A specific, accurate, and sensitive
420 measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res*. 2013;54:852–8.
- 421 17. Rezazadeh A, Yazdanparast R, Molaei M. Amelioration of diet-induced
422 nonalcoholic steatohepatitis in rats by Mn-salen complexes via reduction of oxidative
423 stress. *J Biomed Sci* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;19:26. Available from:
424 <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/26>
- 425 18. Ogawa S, Matsumae T, Kataoka T, Yazaki Y, Yamaguchi H. Effect of acacia
426 polyphenol on glucose homeostasis in subjects with impaired glucose tolerance: A
427 randomized multicenter feeding trial. *Exp Ther Med*. 2013;5:1566–72.
- 428 19. Lenquiste SA, Batista AG, Marineli R da S, Dragano NRV, Maróstica MR. Freeze-
429 dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves
430 insulin resistance in obese rats. *Food Res Int*. 2012;49:153–60.
- 431 20. Araújo CRR, Esteves EA, Dessimoni-Pinto NAV, Batista ÂG. Myrciaria cauliflora
432 peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. *J Med Food*.
433 2014;17:262–7.

- 434 21. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)
435 berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot
436 study. *Nutr J* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;10:45. Available from:
437 <http://www.nutritionj.com/content/10/1/45>
- 438 22. Kuo DC, Hsu SP, Chien CT. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces
439 high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl. *J*
440 *Biomed Sci*. 2009;16:1–10.
- 441 23. Khatun M, Habib MR, Rabbi MA, Amin R, Islam MF, Nurujjaman M, et al.
442 Antioxidant, cytotoxic and antineoplastic effects of *Carissa carandas* Linn. leaves. *Exp*
443 *Toxicol Pathol* [Internet]. Elsevier; 2017;69:469–76. Available from:
444 <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2017.03.008>
- 445 24. Hoagland HC. Hematologic complications of cancer chemotherapy. *Semin Oncol*
446 [Internet]. 1982 [cited 2019 Oct 2];9:95–102. Available from:
447 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7071611>
- 448 25. Ludidi A, Baloyi MC, Khathi A, Sibiyi NH, Ngubane PS. The effects of *Momordica*
449 *balsamina* methanolic extract on haematological function in streptozotocin-induced
450 diabetic rats: Effects on selected markers. *Biomed Pharmacother*. 2019;116.
- 451 26. Weinges K, Nader F. Anthocyanins As Food Colors. *Anthocyanins As Food Color*
452 [Internet]. Elsevier; 1982 [cited 2019 Oct 22];93–124. Available from:
453 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124725508X5001X>
- 454 27. Giusti MM, Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their
455 applications in food systems. *Biochem Eng J*. 2003;14:217–25.
- 456 28. Larangeira LLS, Taha MO, Ferme A, Lemos R, Plapler H. LOCALIZAÇÃO DE
457 LESÕES TUMORAIS INDUZIDAS PELA 1,2-DIMETILHIDRAZINA E SEU GRAU DE
458 ATIPIA NO COLON DE RATOS. *Acta Cir Bras. FapUNIFESP (SciELO)*; 1998;13:177–
459 82.
- 460 29. dos Reis SO, da Luz TC, da Silva Couto CVM, Dalbó J, Nunes L de C, Martins
461 MC, et al. Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation Reduces Aberrant Crypt Foci
462 and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of Carcinogenesis-Induced
463 Rats. *Nutr. Cancer*. Routledge; 2019.

- 464 30. Saad-Hossne R, Prado RG, Bakonyi Neto A, Lopes PS, Nascimento SM do,
465 Santos CRV dos, et al. Estudo retrospectivo de pacientes portadores de câncer
466 colorretal atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2000-2003.
467 Rev bras colo-proctol. 2005;25:31–7.
- 468 31. Argilés JM, Busquets S. Cancer Cachexia. Cancer Cachexia. 2013;85:1–73.
- 469 32. Waitzberg DL. Dieta, nutrição e câncer. Editora Atheneu; 2004.
- 470 33. Nahdi A, Hammami I, Ali R Ben, Kallech-Ziri O, El May A, El May MV. Effect of
471 Hypericum humifusum aqueous and methanolic leaf extracts on biochemical and
472 histological parameters in adult rats. Biomed Pharmacother [Internet]. Elsevier;
473 2018;108:144–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.034>
- 474 34. Son YO, Hwang JM, Choi KC, Lee JC. A Phenolic Acid and Flavonoid Fraction
475 Isolated from Lolium multiflorum Lam. Prevents d-Galactosamine-Induced Liver
476 Damages through the Augmentation of Nrf2 Expression. Indian J Clin Biochem
477 [Internet]. Springer India; 2019;34:68–75. Available from:
478 <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0714-x>
- 479 35. Al-Busafi SA, Hilzenrat N. Mild Hypertransaminasemia in Primary Care. ISRN
480 Hepatol. 2013;2013:1–6.
- 481 36. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, García
482 FAR, et al. Screening for Lipid Disorders in Children and Adolescents. JAMA [Internet].
483 2016 [cited 2019 Oct 22];316:625. Available from:
484 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20722144)
485 [;dopt=Citation&list_uids=20722144](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20722144)
- 486 37. Oliveira de Souza M, Silva M, Silva ME, Paula Oliveira R, Pedrosa ML. Diet
487 supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of
488 oxidative stress and the serum lipid profile in rats. Nutrition. 2010;26:804–10.
- 489 38. Silva MPN da. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer TT -
490 Anorexia-caquexia syndrome in cancer patients. Rev bras cancerol [Internet]. 2006
491 [cited 2019 Oct 22];52:59–77. Available from:
492 http://www.inca.gov.br/rbc/n_52/v01/pdf/revisao3.pdf

- 493 39. Guergoletto KB, Costabile A, Flores G, Garcia S, Gibson GR. In vitro fermentation
494 of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chem. Elsevier Ltd*;
495 2016;196:251–8.
- 496 40. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer
497 and various chronic conditions. *J Carcinog.* 2006;5:1–8.
- 498 41. Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, et
499 al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging*
500 *Male.* Taylor and Francis Ltd; 2018;21:145–8.
- 501 42. O’Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, Vernet A, Hall CD, Sun CC, et al.
502 Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for
503 research. *Comp. Med. American Association for Laboratory Animal Science*; 2015. p.
504 96–113.

6 CAPITULO 3

Artigo intitulado “Suplementação com fruto Juçara (*Euterpe edulis* Martius) na proteção ao aparecimento de lesões pré-neoplásicas em modelo induzido de câncer colorretal”.

Artigo a submeter.

1 **Suplementação com fruto Juçara (*Euterpe edulis* Martius) na proteção ao**
2 **aparecimento de lesões pré-neoplásicas em modelo induzido de câncer**
3 **colorretal.**

4 Juliana Dalbó^{1*}, Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis¹, Schalana Oliveira dos
5 Reis¹, Cinthia Vida Monteiro da Silva Couto¹, Viviane Tavares de Paula², Maria A
6 Ferreira², Lucas de Lima Maia¹, Flávia Vitorino Freitas², Jankerle Neves Boeloni²,
7 Marco Cesar Cunegundes Guimarães¹, Fábio Daumas Nunes³, Anderson Nogueira
8 Mendes⁴, Greiciane Gaburro Paneto², Iuri Drumund Louro¹, Adriana Madeira Alvares
9 da Silva¹, Leonardo Oliveira Trivillin².

10 ¹Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe. Vitória, ES, Brasil;

11 ²Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. Alegre, ES, Brasil;

12 ³Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

13 ⁴Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina, PI, Brasil.

14 *Autor correspondente: e-mail julianadalbo@hotmail.com

15 **Destaques**

- 16 • Suco da polpa do fruto Juçara atua na prevenção do aparecimento de criptas
17 aberrantes;
- 18 • Extrato e suco da polpa do fruto juçara promovem a proteção da mucosa cólica,
19 ao atuar sobre número de placa de peyer e mucinas ácidas, respectivamente;
- 20 • Suco da polpa do fruto juçara aumenta expressão da proteína Keap1 em
21 adenocarcinoma colorretal.

22 **Resumo**

23 O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação alimentar a base do
24 fruto Juçara sobre lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de câncer colorretal em ratos
25 Wistar. Para tal, quantificou-se focos de criptas aberrantes e lesões neoplásicas,
26 mucinas em mucosa colorretal, imuno-histoquímica e caracterização histopatológica
27 de adenocarcinoma tubular. Os resultados demonstram diminuição de 50,06% dos
28 focos de criptas e aumento do percentual de mucinas ácidas no grupo J na 11^a
29 semana. Ainda, aumento do número de placa de peyer no grupo E e da expressão de
30 Keap1 no grupo J, na 23^a semana. Conclui-se que a polpa do fruto Juçara pode ser

31 uma aliada na prevenção do câncer colorretal, visto que, atua na prevenção do
32 aparecimento de criptas aberrantes, na regulação da expressão da proteína Keap1 e
33 na proteção mucosa cólica. Assim, abre possibilidade de utilizá-la na suplementação
34 dietética, produtos e medicamentos que favoreçam a prevenção do câncer colorretal.

35 **Palavras chaves:** Criptas aberrantes; Substâncias fenólicas; Placa de peyer; Mucina;
36 via Nrf2/Keap1; Apoptose.

37 1. Introdução

38 O câncer colorretal é a segunda causa de mortalidade no mundo, atingindo quase
39 900.000 mortes anualmente (Ismail, Othman, Abas, Lajis, & Naidu, 2019). No ano de
40 2018, apresentou 1.800.977 novos casos, tornando responsável por cerca de 10% de
41 todos os novos casos de câncer (Bray et al., 2018).

42 O câncer colorretal surge de alterações genéticas causadas principalmente pelo
43 estresse oxidativo, nas quais resultam em modificações da mucosa colônica normal
44 para lesões pré-malignas como focos de criptas aberrantes e displasia. Essas lesões,
45 podem evoluir para adenomas ou carcinomas colorretais (Benedix et al., 2011; Ge et
46 al., 2017; Guergoletto, Costabile, Flores, Garcia, & Gibson, 2016; Rouhollahi,
47 Moghadamtousi, Abdulla, & Mohamed, 2015; Schatzkin & Kelloff, 1995; Schulz et al.,
48 2017).

49 Dentre os casos de câncer colorretal, 90% são causados por adenocarcinomas
50 tubular, viloso ou misto (Benedix et al., 2011; Matthew J Munro, Agadha C
51 Wickremesekera, Paul F Davis, Reginald Marsh & and Tinte Itinteang, 2017; Paschke
52 et al., 2018). Quando formados, os adenocarcinomas são capazes de alterar a
53 composição e produção das mucinas, que são heterogêneos de glicoproteínas
54 produzidas por tecidos epiteliais e dependendo da composição de seus
55 monossacarídeos, podem ser classificadas em neutras ou ácidas (Boleij & Tjalsma,
56 2012). Ambas as mucinas desempenham um papel protetor para os tecidos epiteliais
57 adjacentes sob condições fisiológicas normais. Dessa forma, alterações como
58 diminuição na produção de mucinas pelos adenocarcinomas aumentam os danos a
59 mucosa cólica (Boleij & Tjalsma, 2012).

60 Assim como as mucinas, as placas de peyer também atuam na defesa da mucosa
61 cólica por meio da indução imunológica ou de defesa contra antígenos. Para tal, as

62 placas de peyer utilizam uma complexa interação entre células do sistema
63 imunológico localizadas nos folículos linfóides e no epitélio folicular associado (Cerutti,
64 Chen, & Chorny, 2011).

65 Além da defesa natural do organismo, o consumo de alimentos ricos em antioxidantes,
66 como o Juçara (*Euterpe edulis* Martius) pode contribuir na prevenção e tratamento do
67 câncer colorretal. Visto que, essas substâncias presentes no fruto estão relacionadas
68 a redução do estresse oxidativo (Bulotta et al., 2011; Schulz et al., 2015) e expressão
69 de proteínas relacionadas com a via de apoptose (Parolin & Messias Reason, 2001).

70 O fruto juçara é nativo da mata atlântica brasileira e possui importante valor nutricional
71 (Silva Campelo Borges et al., 2011). O fruto é constituído de proteínas, açúcares,
72 fibras, fração lipídica com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e menor teor de
73 lipídios saturados e ainda, vitaminas C e E e minerais e β -caroteno (Guergoletto et al.,
74 2016; Schulz et al., 2017). Além disso, o fruto juçara se destaca pelos polifenóis com
75 ação antioxidante, tais como antocianinas, ácidos benzoicos, cafeico, clorogênico,
76 ferúlico, protocatecuíco, *p*-cumárico, siringico, vanílico, flavonoides e saponinas
77 (Cardoso et al., 2015; Martins, 2016; Moreira et al., 2017; Silva Campelo Borges et al.,
78 2011).

79 Os polifenóis atuam na ativação do complexo proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-*
80 *associated Protein 1*) associada ao fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor erythroid*
81 *2 [NF-E2] - related factor 2*). Este complexo após a exposição ao estresse oxidativo,
82 Keap1 é inativado e Nrf2 torna-se fosforilado. No núcleo Nrf2 se liga aos elementos
83 ARE ou EpRE, ativando a expressão de muitos genes, como por exemplo o anti-
84 apoptótico *Bcl-xL* (Qi et al., 2017).

85 Contudo, Keap1 pode mediar a degradação da proteína anti-apoptótica *Bcl-xL*, por
86 meio da ubiquitinação do complexo Keap1-Cul3-Rbx1 e aumenta e/ou ativa o fator
87 pró-apoptótico Bax. Após ser ativado, Bax permite a liberação do citocromo c e este a
88 ativação da Caspases 3 levando a morte da célula, desempenhando assim, um papel
89 importante na carcinogênese colorretal (Niture & Jaiswal, 2013; Parolin & Messias
90 Reason, 2001).

91 Os polifenóis também atuam na prevenção do câncer por mecanismos epigenéticos,
92 principalmente pela metilação do DNA, impedindo a modificação de histonas e a

93 regulação da expressão do miRNA (Link, Balaguer, & Goel, 2010). E ainda, a parada
94 do ciclo celular (Priolli et al., 2016) e efeitos inibitórios na migração e invasividade das
95 células de adenocarcinoma (H. Lee, Kang, Jung, Kim, & Kim, 2011). Além disso,
96 reduzem a proliferação celular em células normais (Medina et al., 2011; Sáez et al.,
97 2018) e também nas células cancerígenas do cólon (Chatthongpisut, Schwartz, &
98 Yongsawatdigul, 2015; Cianciosi et al., 2020; Luna Vital, González De Mejía, Dia, &
99 Loarca-Piña, 2014; Rodrigues et al., 2019).

100 Diante de todas as informações é notória a importância dos estudos em relação aos
101 benefícios do fruto juçara, visto sua riqueza em nutrientes com ação antioxidante,
102 atuando sobre o estresse oxidativo e apoptose no organismo. Entretanto, a literatura
103 apresenta um déficit em estudos sobre o efeito desses nutrientes na prevenção e
104 tratamento do câncer colorretal. Visando contribuir com o entendimento histológico e
105 molecular, esse estudo tem como objetivo investigar o potencial terapêutico do fruto
106 Juçara sobre lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de câncer colorretal em ratos.

107 **2. Materiais e métodos**

108 **2.1. Modelo animal de câncer colorretal**

109 Ratos Wistar, machos jovens, foram designados para um dos quatro grupos
110 experimentais: Grupo N: 11 animais controles; Grupo P: 11 animais apenas induzidos
111 a carcinogênese colorretal; Grupo J: 14 animais induzidos a carcinogênese colorretal
112 e suplementados com o suco da polpa do fruto Juçara; Grupo E: 07 animais induzidos
113 à carcinogênese colorretal e suplementados com extrato de substâncias fenólicas do
114 fruto Juçara. A variação no número de animais entre os grupos é decorrente da morte
115 de alguns no decorrer do experimento.

116 Após uma semana de ambientação foi realizada a indução de carcinogênese
117 colorretal pelo agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em 32 animais. A aplicação
118 do agente químico foi realizada por via subcutânea, uma vez por semana, por um
119 período de cinco semanas, na dose final de 240mg/kg, conforme metodologia de Jucá
120 e colaboradores (Jucá, Bandeira, Carvalho, & Leal, 2014)

121 **2.2. Polpa e extrato do fruto juçara**

122 Para o preparo do suco e do extrato foi utilizado um lote de polpa fina (Tipo C),
123 (*Instrução Normativa Nº 1, DE 07 DE JANEIRO DE 2000*, n.d.), orgânica do fruto de

124 Juçara (*Euterpe edulis* Martius), adquirida de uma processadora de polpa de frutas da
125 cidade de Rio Novo do Sul, no Estado do Espírito Santo (latitude 20° 51' 45" S,
126 longitude 40° 56' 11" W).

127 Segundo as informações nutricionais do rótulo, em 100g de polpa contém 0,6 g de
128 carboidrato, 1,0 g de proteína, 3,0 g de fibras alimentares e 13,0 mg de sódio, $3,33 \pm$
129 $0,08$ de Lipídios (%) e $0,82 \pm 0,11$ de Proteína (%). Ainda, contém $298,86 \pm 27,68$ de
130 Antocianina total (mg de cianidina 3-glicosídeo.100g-1); $16,06 \pm 1,38$ Atividade
131 Antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.g-1}$) e $1226,39 \pm 21,0$ de Conteúdo Fenólico total (mg
132 AGE.100g-1) conforme a caracterização físico-química da polpa de Juçara realizada
133 por Martins (2016) (Martins, 2016).

134 A partir da polpa foi preparado o suco com diluição a 0,2% em água e foi realizada a
135 extração das substâncias fenólicas de acordo com a metodologia de Santana e
136 colaboradores (2016) (Santana, Cano-Higuita, De Oliveira, & Telis, 2016).
137 Posteriormente quantificou-se o pigmento antocianina no extrato pelo método do pH
138 diferencial, de acordo com Giusti e Wrolstad (2003) (Giusti & Wrolstad, 2003). O valor
139 encontrado de antocianinas totais foi utilizado para o cálculo de suplementação de
140 suco e extrato da polpa, seguindo a formula $DxP/[]$, de forma que cada animal
141 recebesse 1mg/Kg de antocianinas totais.

142 **2.3. Suplementação a base do fruto Juçara**

143 Após cinco semanas de indução a carcinogênese colorretal, iniciou-se a
144 suplementação com o suco de polpa do fruto Juçara na concentração de 1,0 % (M/V)
145 e extrato de substâncias fenólicas liofilizado na concentração de 0,2% (M/V). A
146 suplementação procedeu na forma de gavagem, três vezes na semana, durante 17
147 semanas e acordo com a metodologia de Reis e colaboradores (2019) modificada
148 (Reis et al., 2019).

149 **2.4. Contagem dos focos de criptas aberrantes – FCA**

150 Após cinco semanas de suplementação, quatro animais de cada grupo, exceto o
151 grupo E com apenas dois animais, foram eutanasiados. Seccionou o intestino grosso
152 e o reto, seguidamente abriu-os pela inserção do mesentério.

153 Os intestinos coletados foram lavados em solução PBS e fixados em formaldeído a
154 10%. Em seguida, corou-se os intestinos em solução de azul de metileno a 1%.
155 Posterior, dois analisadores realizaram a identificação dos focos de criptas aberrantes
156 na mucosa intestinal. Para tal, utilizou microscópio óptico de luz Nikon®, em aumento
157 de 400X (Bird, 1987).

158 **2.5. Caracterização histopatológica**

159 Na 23ª semana de experimentação os animais foram eutanasiados para a retirada das
160 lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção no intestino grosso e reto. Os
161 tecidos coletados foram incluídos em parafina e os cortes corados com hematoxilina
162 e eosina. Posterior, realizou-se o diagnóstico por dois patologistas, mediante
163 microscopia óptica em aumento de 400X (Jucá et al., 2014).

164 **2.6. Análises de mucinas**

165 Os intestinos e os adenocarcinomas coletados foram corados com alcian blue e ácido
166 periódico-Schiff para análises de mucinas ácidas e mucinas neutras, respectivamente.
167 O nível de mucina foi definido pelo cálculo da porcentagem média de 10 campos
168 aleatórios por meio do software ImageJ® (Athaydes et al., 2019).

169 **2.7. Imuno-histoquímica**

170 Os cortes foram desparafinizados e reidratados. Em seguida, foram submetidos a
171 recuperação antigênica com citrato de sódio (para Bax e Caspase-3) e com
172 Tris+EDTA (para Nrf2, Keap1 e Bcl-xL) em micro-ondas por 20 minutos.
173 Posteriormente, as lâminas foram lavadas em 1x TRIS e as peroxidases endógenas
174 bloqueadas com peróxido de hidrogênio a 30% em 1x TRIS durante 20 minutos a
175 25°C. Logo após, foram incubadas em solução de bloqueio de proteínas inespecíficas
176 (3% de leite em pó diluído em 1x TRIS) durante 60 minutos a 25°C.

177 Na sequência, as lâminas foram encubadas com anticorpos primários anti-Nrf2 (1:50,
178 Ab-AF0639, Affinity Biosciences), anti-Keap1 (1:50, sc-514914, Santa Cruz
179 Biotechnology), anti-Bcl-xL (1:50, sc-8392, Santa Cruz Biotechnology), anti-BAX
180 (1:150, sc-7480, Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo anti-capase-3 clivada (1:150,
181 Asp175, Cel Signaling Technology, Danvers MA) durante 12 horas a 4°C. Após essa
182 etapa, aplicou-se aos cortes o sistema de detecção de tecido de rato (N-Histofine –

183 SimpleStain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®) e realizou a visualização da
184 coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO). A contra coloração
185 foi realizada por hematoxilina de Harris e posteriormente as lâminas foram
186 desidratadas e montadas com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

187 **2.8. Avaliação da expressão proteica**

188 A avaliação da expressão das proteínas foi semi-quantitativa e realizada em dois
189 momentos diferentes com o auxílio do microscópico óptico Zeiss® em aumento de
190 400x. As lâminas foram classificadas, segundo o percentual de células coradas: 0
191 (0% de células marcadas), 1 (<10%); 2 ($10 \leq 50\%$) e 3 (>50% de células marcadas) e
192 pela intensidade de coloração: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte). Ambas
193 pontuações foram multiplicadas e o escore obtido foi utilizado para análise estatística
194 (Soini et al., 2000).

195 **2.9. Índice apoptótico**

196 O índice apoptótico foi calculado a partir da média da contagem de 100 células em
197 cinco campos aleatórios, para cada amostra. A contagem foi realizada por dois
198 analisadores, em microscopia óptica, aumento de 400X (Athaydes et al., 2019).

199 **2.10. Análise de dado**

200 Todas as variáveis passaram por análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. As
201 variáveis das médias de focos de criptas aberrantes e de mucinas neutras foram
202 submetidas a análise de variância One-way (ANOVA) para um critério, seguido pela
203 análise pós hoc com o teste de Tukey.

204 As variáveis da histopatologia de mucosa colorretal, mucinas ácidas, expressão
205 proteica e índice apoptótico passaram pela análise de variância Kruskal-Wallis,
206 seguido pela análise pós hoc Teste de Dumn, quando necessário. Todas as análises
207 descritas anteriormente e figuras foram desenvolvidas no Software Estatístico de livre
208 acesso R (R Development Core Team), considerando um nível de significância de 5%.

209 A caracterização histopatológica dos adenocarcinomas tubulares, passou pelo teste
210 de Qui-Quadrado e analisada no Software Estatístico SPSS, considerando a relação
211 significativa quando o valor de $p < 0,05$.

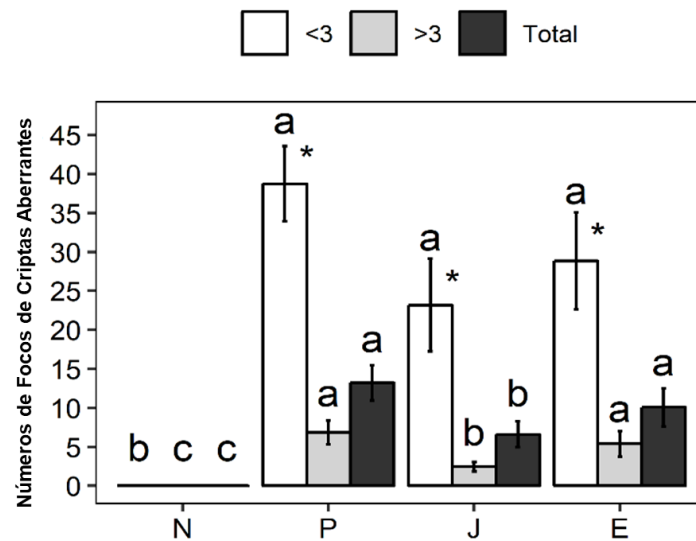
212 3. Resultados

213 3.1. Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes – FCA

214 O grupo N não apresentou nenhum FCA, no entanto os grupos, P ($p=0.0000$), J
215 ($p=0.0000$) e E ($p=0.0053$) demonstraram aumento significativo de focos com número
216 igual ou menor de três criptas ($FCA \leq 3$) em comparação ao número de focos com
217 mais de três criptas ($FCA >3$) (Figura 1).

218 Os resultados também mostraram a redução no número de focos com mais de três
219 criptas ($FCA >3$) no grupo J quando comparado ao grupo P ($p=0.0088$) e ao grupo E
220 ($p=0.0170$). Também é possível observar redução significativa no número de focos
221 totais de criptas aberrantes no grupo J em comparação ao grupo P ($p=0.0068$) e ao
222 grupo E ($p=0.0208$).

223 Houve redução percentual no grupo J de 40.21% de focos ≤ 3 de criptas aberrantes e
224 de 64.02% de focos >3 de criptas aberrantes e ainda de 50.06% de focos totais de
225 criptas aberrantes comparado ao grupo P. Além disso, houve a diminuição de 25.59%
226 de focos ≤ 3 de criptas aberrantes, 21.34% de focos >3 de criptas aberrantes e 24.28%
227 de focos totais de criptas aberrantes no grupo E do grupo P.

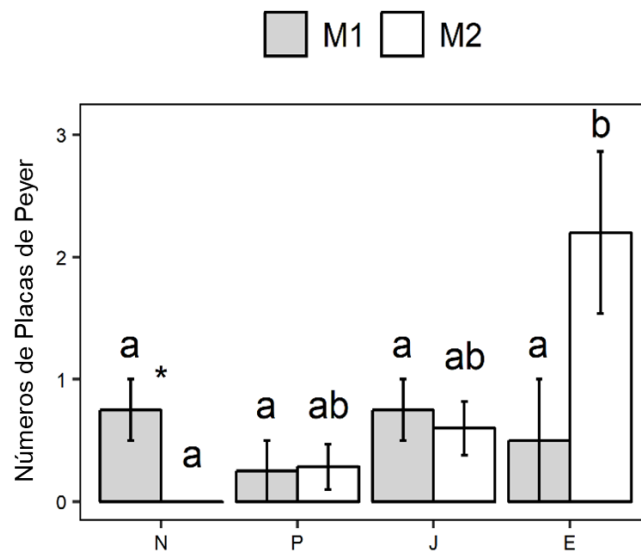


228

229 **Figura 1. Média de focos de criptas aberrantes encontrados em mucosa**
 230 **colorretal.** N: animais controles; P: animais apenas induzidos a carcinogênese
 231 colorretal; J: animais induzidos a carcinogênese colorretal e suplementados com o
 232 suco da polpa do fruto Juçara; E: animais induzidos à carcinogênese colorretal e
 233 suplementados com extrato do fruto Juçara.*o número de focos ≤ 3 de criptas
 234 aberrantes diferem significativamente do número de focos >3 de criptas aberrantes
 235 entre o grupo. As médias com letras diferentes diferem entre si e médias com letras
 236 iguais não diferem entre si.

237 3.2. Caracterização histopatológica

238 Ao analisar as mucosas colorretais, foi observado aumento significativo de placa de
 239 peyer no grupo E em comparação aos grupos N ($p=0.0002$), P ($p=0.0036$) e J
 240 ($p=0.0194$), na 23^a semana de experimento. Ainda, os resultados mostraram
 241 diminuição significativa do número de placa de peyer da 11^a semana para a 23^a
 242 semana no grupo P ($p=0.0209$) (Figura 2).

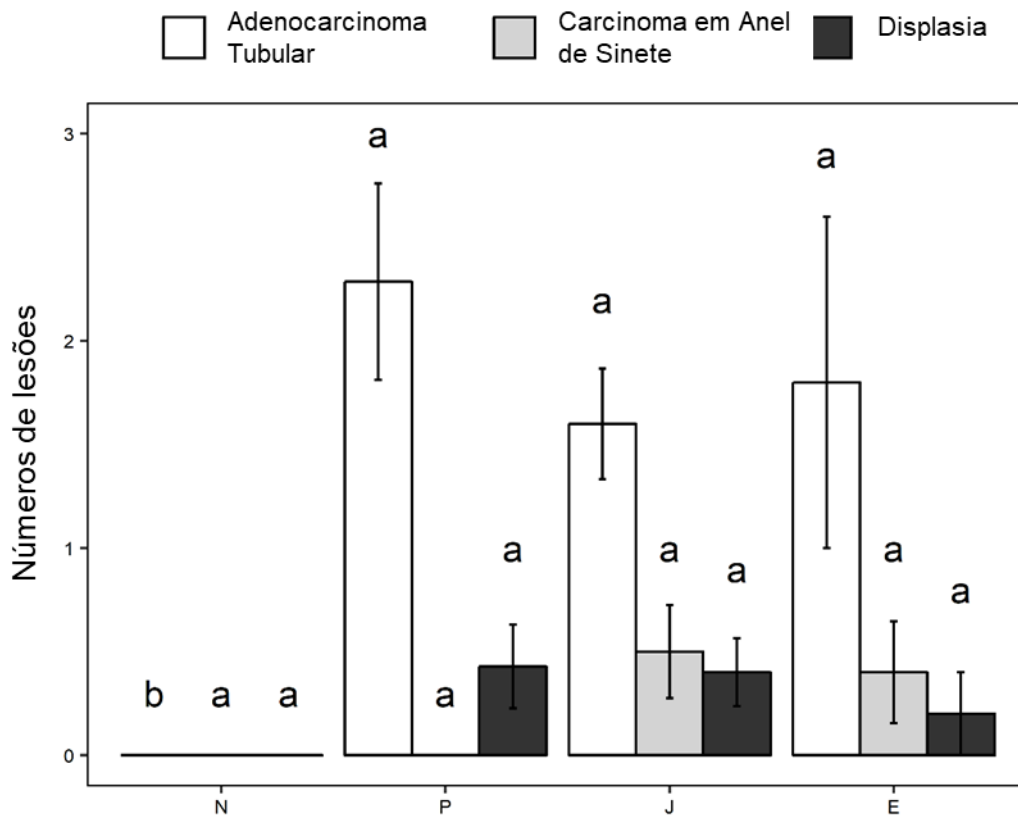


243

244 **Figura 2. Análise de placas de peyer em mucosa colorretal.** M1 - 11^a semana de
 245 experimento e M2 - 23^a semana de experimento. N: animais controles; P: animais
 246 apenas induzidos a carcinogênese colorretal; J: animais induzidos a carcinogênese
 247 colorretal e suplementados com o suco da polpa do fruto Juçara; E: animais induzidos
 248 à carcinogênese colorretal e suplementados com extrato do fruto Juçara. * Diferença
 249 significativa das placas de peyer no grupo de M1 para M2. As médias com letras
 250 diferentes diferem entre si e médias com letras iguais não diferem entre si.

251 Na análise do número de lesões dos animais estudados, observou-se 39 lesões no
 252 grupo P, com o mínimo de quatro e o máximo de nove lesões por animal (média de
 253 5,5 lesões). No Grupo J foram encontradas 42 lesões, com no mínimo duas e no
 254 máximo seis (média de 8,4 lesões). No grupo E foram encontradas 29 lesões, com no
 255 mínimo de seis lesões por animal e máximo de oito (média de 7,25 lesões).

256 Dentre as lesões, encontrou-se displasia, adenocarcinoma tubular e carcinoma em
 257 anel de sinete. O resultado demonstrou presença de adenocarcinoma tubular nos
 258 grupos P, J e E (Figura 3).



259

260 **Figura 3. Análises de lesões em mucosa colorretal na 23ª semana de**
 261 **experimento.** N: animais controles; P: animais apenas induzidos a carcinogênese
 262 colorretal; J: animais induzidos a carcinogênese colorretal e suplementados com o
 263 suco da polpa do fruto Juçara; E: animais induzidos à carcinogênese colorretal e
 264 suplementados com extrato do fruto Juçara. As médias com letras diferentes diferem
 265 entre si e médias com letras iguais não diferem entre si.

266

267

268

269

270

Em relação às características histopatológicas de adenocarcinoma tubular, em um primeiro momento os grupos P, J e E apresentaram diferença significativa apenas para inflamação ($p < 0,011$) pelo teste Qui-Quadrado. Entretanto, após ajuste de Bonferroni, ao realizar a comparação par a par entre os grupos, não foi observada a diferença entre os grupos (Tabela 1).

271 **Tabela 1– Descritivo em número e percentual das características**
 272 **histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal de ratos induzidos a**
 273 **carcinogênese colorretal (grupo P, J e E).**

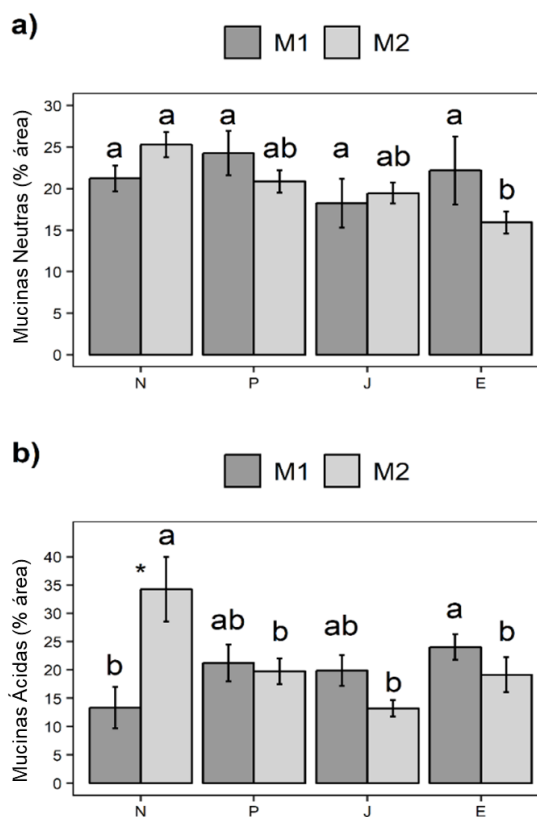
	Adenocarcinoma Tubular Colorretal						
	Grupo P		Grupo J		Grupo E		Valor de p
	n	%	N	%	n	%	
Inflamação							
Branda	0	0,0	4	25	1	11,11	0,011*
Moderada	7	43,75	9	56,25	7	77,77	
Severa	9	56,25	3	18,75	1	11,11	
Polimorfonucleados	16	100	15	93,75	9	100	0,823
Mononucleados	12	75	12	75	7	77,77	0,890
Pleomorfismo							
Ausente	3	18,75	4	25	1	11,11	0,210
Brando	1	6,25	2	12,5	0	0,0	
Moderado	11	68,75	7	43,75	4	44,44	
Severo	1	6,25	3	18,75	4	44,44	
Mitose							
Ausente	0	0,0	2	12,5	1	11,11	0,240
< 3/campo	16	100	14	87,5	8	88,88	
> 3/campo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Invasão Submucosa							
Ausente	2	12,5	3	18,75	4	44,44	0,086
Presente	14	87,5	13	81,25	5	55,55	
Invasão Perineural							
Ausente	14	87,5	14	87,5	9	100	0,369
Presente	2	12,5	2	12,5	0	0,0	
Percentual Glandular							
>95%	7	43,75	10	62,5	5	55,55	0,744
50-95%	9	56,25	2	12,5	4	44,44	
<50%	0	0,0	4	25	0	0,0	
Desmoplasia							
Ausente	12	75	14	87,5	6	66,66	0,793
Presente	4	25	2	12,5	3	33,33	
Debris glandular							
Ausente	1	6,25	1	6,25	1	11,11	0,691
Presente	15	93,75	15	93,75	8	88,88	
Necrose							
Ausente	16	100	11	68,75	9	100	0,597
Presente	0	0,0	5	31,25	0	0,0	
Grau de Diferenciação							
Bem diferenciado	7	43,75	10	62,5	5	55,55	0,744
Moderadamente diferenciado	9	56,25	2	12,5	4	44,44	
Pouco diferenciado	0	0,0	4	25	0	0,0	
TOTAL	16	100	16	100	9	100	

274

* p<0,05 pelo teste Qui-Quadrado (correção por Bonferroni: p=0,017)

275 **3.3. Análises de mucinas**

276 O resultado de mucinas por porcentagem média de área corada (Figura 4) demonstrou
 277 que o grupo E apresentou diminuição do percentual de mucinas neutras em relação
 278 ao grupo N ($p=0.0073534$), após 23 semanas de experimento (figura 4a). Também é
 279 possível verificar aumento significativo no percentual de mucinas ácidas no grupo E
 280 em comparação ao grupo N ($p=0.0439$) na 11ª semana. Além disso, nota-se aumento
 281 no percentual de mucinas ácidas no grupo N em comparação aos grupos ($p=0.0336$),
 282 J ($p=0.0002$) e E ($p=0.0301$) na 23ª semana de experimento (figura 4b).



283

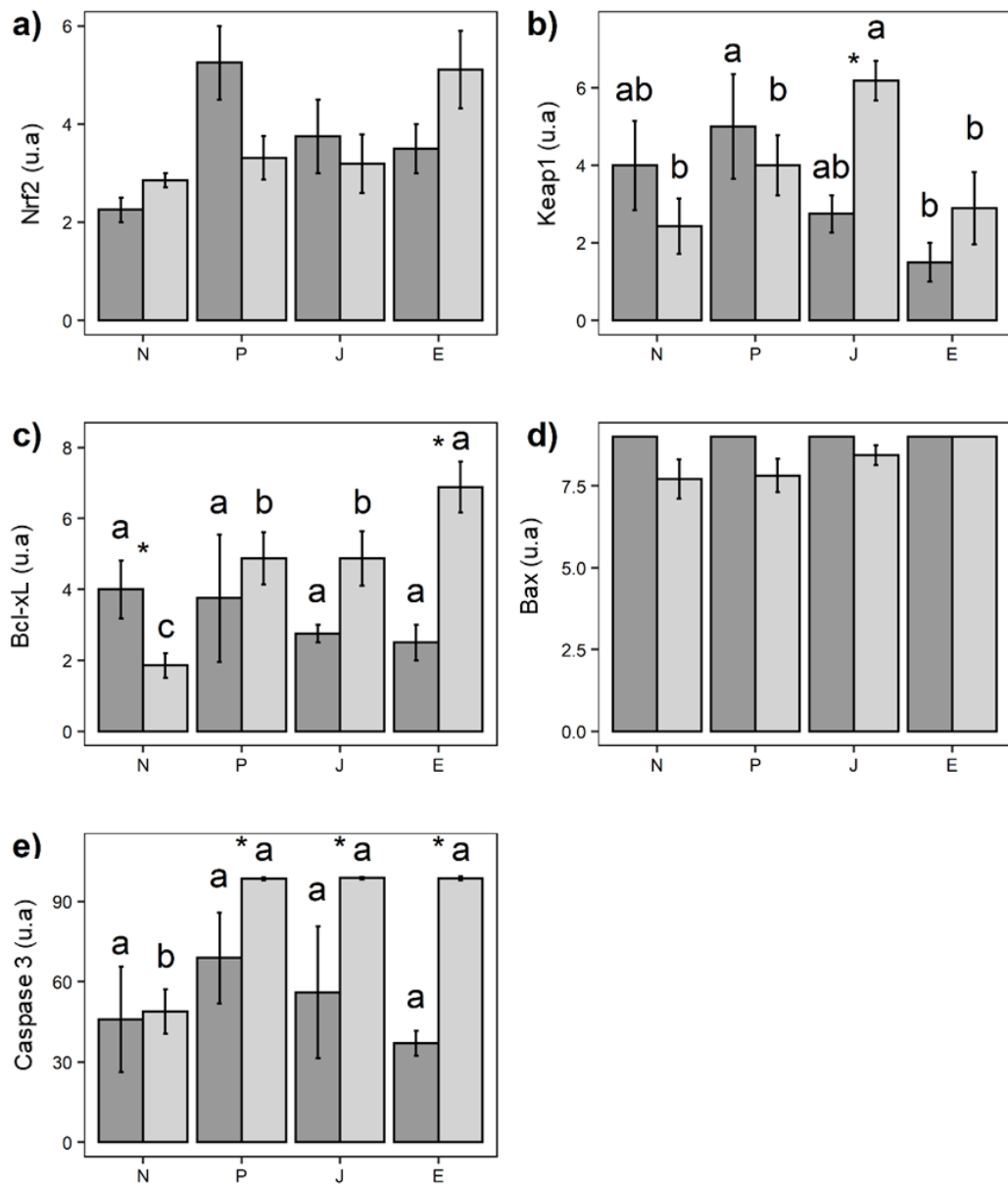
284 **Figura 4. Análise de mucinas por porcentagem média de área corada.** M1 - 11ª
 285 semana de experimento e M2 - 23ª semana de experimento. N: animais controles; P:
 286 animais apenas induzidos a carcinogênese colorretal; J: animais induzidos a
 287 carcinogênese colorretal e suplementados com o suco da polpa do fruto Juçara; E:
 288 animais induzidos à carcinogênese colorretal e suplementados com extrato do fruto
 289 Juçara. a) Análise de mucinas neutras por porcentagem média de área corada. b)
 290 Análise de mucinas ácidas por porcentagem média de área corada. * diferença
 291 significativa no percentual de mucinas no grupo de M1 para M2. As médias com letras
 292 diferentes diferem entre si e médias com letras iguais não diferem entre si.

293 **3.4. Análise da expressão proteica e índice apoptótico**

294 O resultado da análise de expressão das proteínas Nrf2 e Bax não demonstraram
295 diferença significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Figura 5a e 5d). Contudo,
296 a proteína Keap1 apresentou menor expressão no grupo E em comparação ao grupo
297 P ($P=0,0407$) na 11^a semana de experimento. Na 23^a semana foi observado o
298 aumento da expressão no grupo J em comparação aos grupos N ($P=0,0011$), P
299 ($P=0,0070$) e E ($P=0,0007$) (Figura 5b). Além disso, houve aumento entre a 11^a
300 semana para a 23^a semana no grupos J ($P=0,0183$).

301 Quanto a proteína Bcl-xL, nossos resultados mostram aumento de expressão no grupo
302 P ($P=0,0040$) e J ($P=0,0051$) em comparação ao grupo N (Figura 5c). E ainda maior
303 expressão da proteína no grupo E em comparação aos grupos N ($P=0,0001$), P
304 ($P=0,080$) e J ($P=0,0312$). Também mostrou aumento da 11^a semana para a 23^a
305 semana no grupos E ($P=0.0416$).

306 Em relação ao índice apoptótico que foi analisado por Caspase-3 clivada, observou-
307 se maior índice nos grupos P ($p=0,0002$), J ($p=0.0001$) e E ($p=0,0002$) em comparação
308 com o grupo N na 23^a semana de experimento (Figura 5e). Ainda foi possível observar
309 maior índice apoptótico entre a 11^a semana para a 23^a semana, nos grupos P
310 ($p=0.0097$), J ($p=0.0105$) e E ($p=0.0079$).



311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

Figura 5. Análise da expressão da proteína e índice apoptótico. Coluna cor cinza escuro: M1 - 11^a semana de experimento. Coluna cor cinza claro: M2- 23^a semana de experimento. N: animais controles; P: animais apenas induzidos a carcinogênese colorretal; J: animais induzidos a carcinogênese colorretal e suplementados com o suco da polpa do fruto Juçara; E: animais induzidos à carcinogênese colorretal e suplementados com extrato do fruto Juçara. a) Expressão proteica de Nrf2; b) Expressão proteica de Keap1; c) Expressão proteica de Bcl-xL; d) Expressão proteica de Bax; e) Índice apoptótico por Caspase 3 clivada. As médias sem letras não diferem entre si). * Diferença significativa da expressão proteica ou índice apoptótico no grupo de M1 para M2. As médias com letras diferentes diferem entre si e médias com letras iguais não diferem entre si.

323 4. Discussão

324 Já é consagrado na literatura que os tumores malignos intestinais têm início a partir
325 de lesões pré-malignas (Vogelstein et al., 1988) e as criptas aberrantes são
326 consideradas lesões iniciais no colón intestinal com indicativo de risco para a
327 carcinogênese (Ogata, Greca, Luz, Ioshii, & Tomasich, 2010).

328 Nossos resultados mostraram a inibição de mais de 50% dos FCA pela
329 suplementação do suco da polpa do fruto Juçara com uma diminuição de 64.02%
330 do número de focos >3 criptas. O suco do Juçara é um alimento rico em fibras,
331 vitaminas e compostos antioxidantes. Este resultado é compatível com a ideia da
332 presença dos biocompostos protetores ou bioativos antioxidantes, anti-inflamatórios
333 e antitumorais encontrados nesse tipo de fruto que atuam em sinergismo para
334 promover a fitoproteção (Schulz et al., 2015).

335 Reis e colaboradores (2019) também demonstram o efeito protetor do suco do fruto
336 juçara, no estágio de iniciação da carcinogênese no cólon de ratos Wistar induzidos
337 por DMH. Após 14 semanas de suplementação com intervalos de 2 dias e na forma
338 de *ad libitum* do suco do fruto juçara na concentração de 0,3%, foi observada
339 redução de 25% dos FCA (Reis et al., 2019).

340 Corroborando com nossos achados, Romualdo e colaboradores (2015) também
341 verificaram diminuição de FCA em camundongos induzidos à carcinogênese de
342 cólon por azoximetano. Nesse estudo, os animais foram suplementados com 5% de
343 polpa de açaí amazônico em pó na alimentação por 14 semanas (Romualdo et al.,
344 2015) . Nossos experimentos promoveram redução de 50% nos focos de criptas
345 aberrantes com uso de suplementação de suco de polpa de Juçara por seis
346 semanas em uma concentração de 1%.

347 Em relação à análise histopatológica do intestino, nosso estudo observou uma
348 diminuição do número de placas de peyer da 11ª para a 23ª semana de experimento
349 no grupo sem indução e suplementação, fato relacionado à fisiologia normal do
350 intestino (Cerutti et al., 2011). Além disso, foi evidenciado um aumento do número de
351 placas de peyer no grupo E avaliado na 23ª semana de experimento, indicando uma
352 possível ação das substâncias fenólicas presentes no extrato na mucosa intestinal.

353 Nossos achados estão de acordo com os de Bernuy-Osorio e colaboradores (2018)
354 que verificaram um aumento no número de placa de peyer em ratos suplementados
355 com quinoa, grão rico em flavonoides e ácidos fenólicos. O artigo atribuiu a presença
356 das placas de peyer a uma possível ação protetora das mucosas (Bernuy-Osorio,
357 Riveros-Lizana, Villanueva-Espinoza, Suárez-Cunza, & Vílchez-Perales, 2018).

358 Ainda em referência aos resultados histopatológicos dos intestinos, as lesões
359 encontradas foram displasia, adenocarcinomas tubulares e carcinomas de anel em
360 sinete, mostrando a eficácia do protocolo de indução por DMH. Dentre as lesões
361 apresentadas houve diferença significativa entre grupos induzidos e não induzidos ao
362 CCR quanto ao aparecimento do adenocarcinoma tubular. Segundo Jucá e
363 colaboradores (2005), os adenocarcinomas bem diferenciados são os mais comuns
364 em ratos com CCR induzido por DMH (Jucá et al., 2014).

365 Quanto ao estudo de mucinas, nossos resultados mostraram redução de mucinas
366 neutras na 23ª semana no grupo suplementado com extrato. Também foi possível
367 observar um aumento de mucinas ácidas no grupo suplementado com extrato na 11ª
368 semana de experimento e posterior diminuição nos ratos induzidos a carcinogênese
369 na 23ª semana. E ainda, um aumento de mucinas ácidas da 11ª para 23ª semana no
370 grupo N, fato descrito como relacionado a idade (López-Ferrer, Barranco, & de, 2001).

371 A diminuição de mucinas neutras, representa uma regulação negativa pelos
372 compostos fenólicos, visto que a diminuição da produção de mucinas permite maior
373 contato dos compostos carcinogênicos e das bactérias intestinais com os colonócitos,
374 contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório e acelerando o
375 desenvolvimento do CCR (Boleij & Tjalsma, 2012).

376 Já o aumento de mucinas ácidas encontrado na 11ª semana são consistentes com a
377 pesquisa *in vitro* de Volstatova e colaboradores (2019), que demonstraram a
378 capacidade dos polifenóis de modularem a expressão da mucina, levando a um
379 aumento da mesma (Volstatova et al., 2019). Estudos têm relatado a atividade
380 antioxidantes no aumento do conteúdo de mucinas no epitélio a fim de reduzir danos
381 à mucosa cólica, causados pelas espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 2013).
382 E a diminuição das mucinas ácidas apresentadas em nossa análise, pode ser
383 justificado pelo próprio estímulo carcinogênico fornecido aos animais, tendo em vista

384 que CCR reduz a produção das mucinas e altera a composição das mesmas,
385 produzindo mucinas menos glicosiladas (Boleij & Tjalsma, 2012).

386 Com referência a análise da expressão proteica, ao avaliar a proteína Keap1 nosso
387 resultado mostrou aumento da expressão de Keap1 no grupo J na 23ª semana de
388 experimento. Oliveira e colaboradores (2019) também verificaram aumento Keap1 nos
389 níveis séricos de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Nesta pesquisa, os pacientes
390 foram submetidos a ingestão diária de 10 ml de suco de kiwi dourado, rico em
391 antioxidantes, durante nove meses (Oliveira, Camargo, & Oliveira, 2019). Assim, o
392 aumento de keap1 encontrado em nosso trabalho é favorável, visto que, a proteína
393 Keap1 pode mediar a degradação da proteína anti-poptótica Bcl-xL e aumenta a pró-
394 apoptótica Bax e conseqüentemente Caspase 3 levando a morte celular.

395 Contudo, observamos que o aumento da expressão da proteína keap1 pelo suco da
396 polpa do fruto juçara não interferiu na via de apoptose, apresentando padrão de
397 expressão diferentes entre as proteínas. Logo, sugerimos que a intensidade de
398 expressão relatada em nossa pesquisa não foi suficiente para mediar a expressão de
399 Bax.

400 Nossa pesquisa também mostrou aumento da expressão da proteína Bcl-xL nos
401 grupos induzidos a carcinogênese colorretal em comparação ao grupo não induzido.
402 Entre os grupos induzidos a carcinogênese, o grupo suplementado com extrato
403 apresentou maior expressão da proteína de Bcl-xL. A literatura descreve a expressão
404 aumentada desta proteína em uma variedade de cânceres. Estudos encontraram
405 maior expressão da proteína BCL-xL em adenocarcinomas de câncer colorretal do
406 que nos tecidos não tumorais (S. W. Lee et al., 2012).

407 Qin e colaboradores (2014) ao analisar o efeito de a polifenóis de canela em células
408 de glioma C6 de ratos, encontraram regulação positiva da diminuição dos níveis de
409 proteína Bcl-xL (Qin, Panickar, & Anderson, 2014). Estudo em células MDA-MB-231
410 de câncer de mama expostas a curcumina, substância com propriedades
411 antioxidantes, também apresentou diminuição da expressão de *Bcl-xL* (Quispe-Soto
412 & Calaf, 2016). Entretanto, nosso resultado mostrou maior expressão da proteína Bcl-
413 xL no grupo suplementado com extrato de substâncias fenólicas na presença de
414 tumores já desenvolvido, ou seja, houve regulação negativa da proteína, ajudando no
415 desenvolvimento tumoral.

416 No que concerne ao índice apoptótico determinado pela expressão da proteína
417 Caspase-3 clivada, não foi observada alteração na 11^a semana em nenhum dos
418 grupos. Ao analisar os mesmos grupos na 23^a semana, observou-se o aumento do
419 índice apoptótico apenas nos grupos induzidos a carcinogênese colorretal (P, J, E).
420 Ainda, não houve diferença entre grupo suplementado e não suplementado pelo fruto
421 juçara.

422 Pesquisas realizadas em adenomas (Zhao et al., 2018), bem como em carcinomas
423 colorretais, também encontraram maior expressão de Caspase-3 em comparação
424 com a mucosa colônica não neoplásica (Leonardos, Butler, Hewett, Zalewski, &
425 Cowled, 1999). Além disso, Yao e colaboradores (2018) associaram o aumento da
426 expressão de Caspase-3 a um considerado um marcador de prognóstico negativo
427 para pacientes com câncer colorretal (Yao et al., 2018). Isto posto, nosso resultado
428 vai de encontro com os autores citados anteriormente e demonstra que o aumento de
429 caspase 3 encontrado em nosso estudo é decorrente do desenvolvimento do CCR.

430 **5. Conclusão**

431 Diante dos resultados obtidos, o suco da polpa do fruto Juçara apresenta ação
432 protetora na fase inicial do desenvolvimento de câncer colorretal e também na
433 presença de neoplasias já instaladas. Além disso, tanto a polpa como o extrato
434 promoveram a proteção mucosa cólica, ao atuar sobre número de placa de peyer e
435 mucinas ácidas. Assim, a polpa do fruto Juçara pode ser uma aliada na prevenção do
436 câncer colorretal, abrindo possibilidade de utilizá-la na suplementação dietética,
437 produtos e medicamentos que favoreçam a prevenção e tratamento do câncer
438 colorretal.

439 **6. Aprovação ética**

440 Este trabalho teve aprovação pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da
441 Universidade Federal do Espírito Santo sob protocolo 043/2013.

442 **7. Declaração de interesse**

443 Nenhuma no modelo.

444 **8. Financiamento**

445 Este trabalho foi financiado pelas Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do
446 Espírito Santo – FAPES; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
447 Superior – CAPES.

448 **9. Contribuição dos autores**

449 Juliana Dalbó: Conceitualização, Metodologia, Investigação, Análise formal, Redação
450 - rascunho original, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Arícia Leone
451 Evangelista Monteiro de Assis: Metodologia, Investigação, Redação - Revisão e
452 Edição. Schalana Oliveira dos Reis: Investigação, Redação - Revisão e Edição,
453 Visualização. Cinthia Vida Monteiro da Silva Couto: Metodologia, Redação - rascunho
454 original. Viviane Tavares de Paula: Metodologia, Redação - Revisão e Edição. Maria
455 A Ferreira: Metodologia, Redação - rascunho original. Lucas de Lima Maia:
456 Metodologia, Redação - Revisão e Edição. Flávia Vitorino Freitas: Metodologia,
457 Análise formal e Redação - Revisão e Edição, Visualização Jankerle Neves Boeloni:
458 Metodologia, Redação - Revisão e Edição. Marco Cesar Cunegundes Guimarães:
459 Conceitualização, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Fábio Daumas Nunes:
460 Conceitualização, Recursos, Redação - Revisão e Edição, Visualização. Anderson
461 Nogueira Mendes Redação: Conceitualização, Redação -Revisão e Edição,
462 Visualização. Greiciane Gaburro Paneto: Conceitualização, Redação - Revisão e
463 Edição, Visualização. Iuri Drumund Louro Recursos: Conceitualização, Recursos,
464 Redação - Revisão e Edição, Visualização. Adriana Madeira Alvares da Silva:
465 Conceitualização, Recursos, Administração do projeto, Redação - Revisão e Edição.
466 Leonardo Oliveira Trivillin: Conceitualização, Administração do projeto, Aquisição de
467 financiamento, Redação - Revisão e Edição. Todos os autores leram e aprovaram o
468 manuscrito final.

469 **10. Referências**

- 470 Athaydes, B. R., Alves, G. M., Assis, A. L. E. M. de, Gomes, J. V. D., Rodrigues, R. P.,
471 Campagnaro, B. P., ... Gonçalves, R. de C. R. (2019). Avocado seeds (*Persea*
472 *americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food*
473 *Research International*, 119, 751–760.
474 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.057>
- 475 Benedix, F., Schmidt, U., Mroczkowski, P., Gastinger, I., Lippert, H., & Kube, R. (2011).

- 476 Colon carcinoma - Classification into right and left sided cancer or according to
477 colonic subsite? - Analysis of 29 568 patients. *European Journal of Surgical*
478 *Oncology*, 37(2), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2010.12.004>
- 479 Bernuy-Osorio, N. D., Riveros-Lizana, R., Villanueva-Espinoza, M. E., Suárez-Cunza,
480 S., & Vílchez-Perales, C. (2018). Influence of the consumption of quinoa on the
481 biochemical parameters and intestinal histomorphometry in obese rats. *Revista*
482 *Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(2), 228–233.
483 <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3174>
- 484 Bird, R. P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon
485 treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Letters*, 37(2), 147–
486 151. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1)
- 487 Boleij, A., & Tjalsma, H. (2012, August). Gut bacteria in health and disease: A survey
488 on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biological*
489 *Reviews*, Vol. 87, pp. 701–730. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00218.x>
- 490 Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018).
491 Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality
492 worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,
493 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- 494 Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D'Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M., ...
495 Russo, D. (2011). Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells
496 of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry*,
497 127(4), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.025>
- 498 Cardoso, A. L., Di Pietro, P. F., Vieira, F. G. K., Boaventura, B. C. B., de Liz, S., da
499 Silva Campelo Borges, G., ... da Silva, E. L. (2015). Acute consumption of juçara
500 juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. *Journal of*
501 *Functional Foods*, 17, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.014>
- 502 Cerutti, A., Chen, K., & Chorny, A. (2011). Immunoglobulin Responses at the Mucosal
503 Interface. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 273–293.
504 <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101317>
- 505 Chatthongpisut, R., Schwartz, S. J., & Yongsawatdigul, J. (2015). Antioxidant activities

- 506 and antiproliferative activity of Thai purple rice cooked by various methods on
507 human colon cancer cells. *Food Chemistry*, 188, 99–105.
508 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.074>
- 509 Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Ansary, J., Gil, E., Amici, A., Bompadre, S., ...
510 Battino, M. (2020). Phenolic compounds from Mediterranean foods as
511 nutraceutical tools for the prevention of cancer: The effect of honey polyphenols
512 on colorectal cancer stem-like cells from spheroids. *Food Chemistry*, 325, 126881.
513 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126881>
- 514 Ge, W., Zhao, K., Wang, X., Li, H., Yu, M., He, M., ... Hu, Y. (2017). iASPP Is an
515 Antioxidative Factor and Drives Cancer Growth and Drug Resistance by
516 Competing with Nrf2 for Keap1 Binding. *Cancer Cell*, 32(5), 561-573.e6.
517 <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.008>
- 518 Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources
519 and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3),
520 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- 521 Guergoletto, K. B., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., & Gibson, G. R. (2016). In vitro
522 fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food*
523 *Chemistry*, 196, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>
- 524 *Instrução Normativa Nº 1, DE 07 DE JANEIRO DE 2000.* (n.d.).
- 525 Ismail, N. I., Othman, I., Abas, F., Lajis, N. H., & Naidu, R. (2019, May 2). Mechanism
526 of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. *International Journal of*
527 *Molecular Sciences*, Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20102454>
- 528 Jucá, M. J., Bandeira, B. C., Carvalho, D. S., & Leal, A. T. (2014). Comparative study
529 of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer
530 in rats. *Journal of Coloproctology*, 34(3), 167–173.
531 <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2014.06.003>
- 532 Lee, H., Kang, C., Jung, E. S., Kim, J. S., & Kim, E. (2011). Antimetastatic activity of
533 polyphenol-rich extract of *Ecklonia cava* through the inhibition of the Akt pathway
534 in A549 human lung cancer cells. *Food Chemistry*, 127(3), 1229–1236.
535 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.005>

- 536 Lee, S. W., Ahn, Y. Y., Kim, Y. S., Kang, S. B., Nam, S. W., Lee, D. S., ... Kim, J. M.
537 (2012). The immunohistochemical expression of STAT3, Bcl-xL, and MMP-2
538 proteins in colon adenoma and adenocarcinoma. *Gut and Liver*, 6(1), 45–51.
539 <https://doi.org/10.5009/gnl.2012.6.1.45>
- 540 Leonardos, L., Butler, L. M., Hewett, P. J., Zalewski, P. D., & Cowled, P. A. (1999).
541 The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of
542 colorectal carcinoma. *Cancer Letters*, 143(1), 29–35.
543 [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00176-7)
- 544 Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010, December 15). Cancer chemoprevention by
545 dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*,
546 Vol. 80, pp. 1771–1792. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.036>
- 547 López-Ferrer, A., Barranco, C., & de, C. B. (2001). Apomucin expression and
548 association with Lewis antigens during gastric development. *Applied*
549 *Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 9(1), 42–48.
- 550 Luna Vital, D. A., González De Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides
551 in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*,
552 157, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.050>
- 553 Martins, M. C. (2016). *Estudo de parâmetros de extração de polifenóis e antocianinas*
554 *de Jussara (Euterpe edulis Martius)*. Universidade Federal do Espírito Santo.
- 555 Matthew J Munro, Agadha C Wickremesekera, Paul F Davis, Reginald Marsh, S. T. T.,
556 & and Tinte Itinteang. (2017). Renin-angiotensin system and cancer: A review.
557 *Integrative Cancer Science and Therapeutics Integr Cancer Sci Therap*, 4(2), 1–
558 6. <https://doi.org/10.15761/ICST.1000231>
- 559 Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., Da Silva,
560 W. P., ... Rombaldi, C. V. (2011). Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts
561 with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human
562 cancer cells. *Food Chemistry*, 128(4), 916–922.
563 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>
- 564 Moreira, R. M., Martins, M. L., Leite Júnior, B. R. de C., Martins, E. M. F., Ramos, A.
565 M., Cristianini, M., ... Pereira, D. C. de S. (2017). Development of a juçara and

- 566 Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by
567 high pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 259–268.
568 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.049>
- 569 Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2013). Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein
570 enhances cell survival and drug resistance. *Free Radical Biology and Medicine*,
571 57, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.014>
- 572 Ogata, D. C., Greca, F. H., Luz, M. de A., Ioshii, S. O., & Tomasich, F. D. S. (2010).
573 Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: Análise da presença de
574 lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com
575 a expressão da β -catenina e ki-67. *Revista Do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*,
576 37(2), 114–120. <https://doi.org/10.1590/s0100-69912010000200008>
- 577 Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & Oliveira, L. D. (2019). *Rosmarinus officinalis* L.
578 (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*,
579 26(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8>
- 580 Parolin, M. B., & Messias Reason, I. J. (2001). Apoptose como mecanismo de lesão
581 nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*, 38(2), 138–144.
582 <https://doi.org/10.1590/s0004-28032001000200011>
- 583 Paschke, S., Jafarov, S., Staib, L., Kreuser, E.-D., Maulbecker-Armstrong, C.,
584 Roitman, M., ... Kornmann, M. (2018). Are Colon and Rectal Cancer Two Different
585 Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. *International*
586 *Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092577>
- 587 Pereira, J. A., Rodrigues, R., Sato, D. T., Pedroso, P., Júnior, S., Dias, A. M., ... Real
588 Martinez, C. A. (2013). *Evaluation of sucralfate enema in experimental diversion*
589 *colitis* *. <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2013.08.005>
- 590 Priolli, D., Silva, D. D. C., Duarte, A. C., Orfali, G. D. C., Martinez, N. P., Carvalho, P.
591 D. O., & Grizotto, A. Y. K. (2016). Flavonoids Q3G and hydrolyzed rutin
592 demonstrated antitumor activity in colon adenocarcinoma – in vivo study.
593 *European Journal of Cancer*, 61, S147. [https://doi.org/10.1016/s0959-](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(16)61518-6)
594 [8049\(16\)61518-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(16)61518-6)
- 595 Qi, G., Mi, Y., Wang, Y., Li, R., Huang, S., Li, X., & Liu, X. (2017). Neuroprotective

- 596 action of tea polyphenols on oxidative stress-induced apoptosis through the
597 activation of the TrkB/CREB/BDNF pathway and Keap1/Nrf2 signaling pathway in
598 SH-SY5Y cells and mice brain. *Food and Function*, 8(12), 4421–4432.
599 <https://doi.org/10.1039/C7FO00991G>
- 600 Qin, B., Panickar, K. S., & Anderson, R. A. (2014). Cinnamon polyphenols attenuate
601 the hydrogen peroxide-induced down regulation of S100 β secretion by regulating
602 sirtuin 1 in C6 rat glioma cells. *Life Sciences*, 102(1), 72–79.
603 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.038>
- 604 Quispe-Soto, E. T., & Calaf, G. M. (2016). Effect of curcumin and paclitaxel on breast
605 carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 49(6), 2569–2577.
606 <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3741>
- 607 Reis, S. O., da Luz, T. C., da Silva Couto, C. V. M., Dalbó, J., Nunes, L. de C., Martins,
608 M. C., ... Trivilin, L. O. (2019). Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation
609 Reduces Aberrant Crypt Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal
610 Mucosa of Carcinogenesis-Induced Rats. *Nutrition and Cancer*.
611 <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1649437>
- 612 Rodrigues, C. A., Nicácio, A. E., Boeing, J. S., Garcia, F. P., Nakamura, C. V.,
613 Visentainer, J. V., & Maldaner, L. (2019). Rapid extraction method followed by a
614 d-SPE clean-up step for determination of phenolic composition and antioxidant
615 and antiproliferative activities from berry fruits. *Food Chemistry*, 125694.
616 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125694>
- 617 Romualdo, G. R., Fragoso, M. F., Borguini, R. G., de Araújo Santiago, M. C. P.,
618 Fernandes, A. A. H., & Barbisan, L. F. (2015). Protective effects of spray-dried
619 açai (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon
620 carcinogenesis. *Food Research International*, 77, 432–440.
621 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.037>
- 622 Rouhollahi, E., Moghadamtousi, S. Z., Abdulla, M. A., & Mohamed, Z. (2015). P0026
623 The chemopreventive potential of *Curcuma purpurascens* rhizome in reducing
624 azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *European Journal of Cancer*,
625 51, e8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.028>

- 626 Sáez, V., Pastene, E., Vergara, C., Mardones, C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-
627 Alonso, S., ... von Baer, D. (2018). Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir
628 grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and
629 anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*, 265, 101–110.
630 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.050>
- 631 Santana, A. A., Cano-Higuita, D. M., De Oliveira, R. A., & Telis, V. R. N. (2016).
632 Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of
633 jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry*, 212, 1–9.
634 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.148>
- 635 Schatzkin, A., & Kelloff, G. (1995). Chemo- and dietary prevention of colorectal cancer.
636 *European Journal of Cancer*, 31(7–8), 1198–1204. [https://doi.org/10.1016/0959-](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00138-9)
637 [8049\(95\)00138-9](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00138-9)
- 638 Schulz, M., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Borges, G. da S. C., Vitali, L., Micke, G. A.,
639 ... Fett, R. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant
640 potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to in vitro
641 gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 228, 447–454.
642 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.038>
- 643 Schulz, M., Borges, G. da S. C., Gonzaga, L. V., Seraglio, S. K. T., Olivo, I. S.,
644 Azevedo, M. S., ... Fett, R. (2015). Chemical composition, bioactive compounds
645 and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening.
646 *Food Research International*, 77, 125–131.
647 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>
- 648 Silva Campelo Borges, G., Gracieli Kunradi Vieira, F., Copetti, C., Valdemiro Gonzaga,
649 L., Zambiasi, R. C., Mancini Filho, J., & Fett, R. (2011). Chemical characterization,
650 bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit
651 from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44(7),
652 2128–2133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.006>
- 653 Soini, Y., Kahlos, K., Puhakka, A., Lakari, E., Säily, M., Pääkkö, P., & Kinnula, V.
654 (2000). Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in
655 malignant mesothelioma. *British Journal of Cancer*, 83(7), 880–886.
656 <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1384>

- 657 Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert,
658 M., ... Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development.
659 *The New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532.
660 <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- 661 Volstatova, T., Marchica, A., Hroncova, Z., Bernardi, R., Duskocil, I., & Havlik, J.
662 (2019). Effects of chlorogenic acid, epicatechin gallate, and quercetin on mucin
663 expression and secretion in the Caco-2/HT29-MTX cell model. *Food Science and*
664 *Nutrition*, 7(2), 492–498. <https://doi.org/10.1002/fsn3.818>
- 665 Yao, Q., Wang, W., Jin, J., Min, K., Yang, J., Zhong, Y., ... Zhou, Y. (2018). Synergistic
666 role of Caspase-8 and Caspase-3 expressions: Prognostic and predictive
667 biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*, 21(4), 899–908.
668 <https://doi.org/10.3233/CBM-170967>
- 669 Zhao, X. J., Yu, H. W., Yang, Y. Z., Wu, W. Y., Chen, T. Y., Jia, K. K., ... Kong, L. D.
670 (2018). Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition
671 through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. *Redox Biology*, 18,
672 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.002>
- 673

7 CONCLUSÃO

Mediante análise dos resultados foi possível inferir que o fruto juçara aumenta a sobrevivência das células cancerígenas *in vitro*, visto a inibição dos genes Keap1, Bax e Caspase 3, tanto pelo extrato como pela polpa. O fruto juçara também afeta significativamente o consumo alimentar e o ganho de peso corporal. Ainda, apresenta efeitos negativos sobre a albumina sérica e marcadores bioquímicos hepáticos como alanina aminotransferase e lipoproteína de baixa densidade.

Entretanto, suco da polpa do fruto Juçara apresenta ação protetora na fase inicial do desenvolvimento de câncer colorretal *in vivo*, atuando na prevenção do aparecimento de criptas aberrantes e na regulação dos níveis de aspartato aminotransferase, bem como na proteção da mucosa cólica. Além disso, observamos não haver dosagens estabelecidas para esse produto, e principalmente quando relacionado à pacientes com câncer colorretal, sendo relevante avaliarmos dosagem e tempo de exposição das células e de suplementação.

Assim, nossos resultados 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.

8 REFERÊNCIAS

- ABDRABBA, S.; HUSSEIN, S. Chemical composition of pulp, seed and peel of red grape from libya. *Global Journal of Scientific Researches*. v. 3, n. 2, p. 6-11, 2015.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, v. 281, p. 1322-1326, 1998.
- ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 32, p. 1053-61, 1999.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts and Figures 2018*. American Cancer Society, 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 66, n.1, 2007.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. The BCL-2 protein family. *Experimental Cell Research*. v. 256, p. 50-7, 2000.
- ARAÚJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. et al. Myrciaria cauliflora peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. *J Med Food*.v.17, p.262–7, 2014.
- ARMAGHANY, T.; WILSON, J. D.; CHU, Q. et al. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*. v. 5, 2012, p. 19-27.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*. v. 2, p. 420-430, 2002.
- ASSIS, R. V. B. F. Rastreamento e vigilância do câncer colorretal: guidelines mundiais. *GED Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva*. v. 30, n.2, p.62-74, 2011.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*. v. 99, p.191–203, 2006.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARROSO, M. E. S.; OLIVEIRA, B. G.; PIMENTEL, E. F. et al. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius - Juçara palm fruits. *Food Res Int.* v.116, p. 985-993, 2019.

BELOV L.; ZHOU, J.; CHRISTOPHERSON, R. I. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 12, p. 78-113, 2010.

BENEDIX, F.; SCHMIDT, U.; MROCZKOWSKI, P. et. al. Colon carcinoma – Classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite? Analysis of 29568 patients. *European Journal of Surgical Oncology.* v.37, n.2, p.134-139, 2011.

BIERBRAUER, A.; JACOB, M.; VOGLER, M. et al. A direct comparison of selective BH3-mimetics reveals BCL-XL, BCL-2 and MCL-1 as promising therapeutic targets in neuroblastoma. *British Journal of Cancer.* V.122, p.1544–1551, 2020.

BLATT, N. C. D. Estresse oxidativo. Seminário - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology.* v. 15, pg. 725-31, 2003.

BOLEIJ, A.; TJALSMA, H. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.* v. 87, p. 701–730, 2012.

BONNAL, S.C.; LÓPEZ-OREJA, I.; VALCÁRCEL, J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer - implications for care. *Nature Reviews Clinical Oncology.* v.10, 2020.

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C. et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2128–2133, 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo: Patologia Geral. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 463p

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. v. 56, p. 317–333, 1998.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *AC: A cancer journal of clinicians*. V. 68, p. 394-424, 2018.

BRENNER H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. *Lancet*, v. 383, n. 9927, p. 1490–502, 2014.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LITTER, M. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. v. 15, p. 269-90, 1999.

CARAM, A. L. A.; FRACIOSI, K. T. B.; PEREIRA, C. M. et al. Desnutrição em crianças até 12 anos com leucemia atendidos no Grupo em Defesa de Criança com Câncer no Município de Jundiaí, SP. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 58, n. 2, p. 231-239, 2012.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. v.10, 2020.

CERUTTI, A.; CHEN, K.; CHORNY, A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual Review of Immunology*. v. 29, p. 273-93, 2011.

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.

CHENG, P.; WANG, J.; SHAO, W. Monounsaturated fatty acid intake and stroke risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, v. 25, n. 6, p. 1326–1334, 2016.

CHOI, B.; KWAK, M. Shadows of NRF2 in cancer: Resistance to Chemotherapy. *Current Opinion in Toxicology*, v. 1, p. 20-28, 2016.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*. v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

CÓRDOVA, A.; ALVAREZ-MON, M. Behaviour of zinc in physical exercise: a special reference to immunity and fatigue. *Neuroscience e Biobehavioral Reviews*. v. 19, p. 439-45, 1995.

COSTA, E. A.; GONÇALVES, C.; MOREIRA, S. F. et al. Produção de polpa de palmeira juçara: alternativa de renda para a Mata Atlântica. *Revista Tecnologia & Inivação Agropecuária*, p. 60–66, 2008.

COSTA, E.A.D.; CORBELLINI, L. M.; REIS, C. S. et al. Produção de polpa e sementes dos frutos de *Euterpe edulis* – Uma alternativa de geração de renda e uso sustentável da mata Atlântica. Instituto de Permacultura e Ecovilas da Mata Atlântica, São Paulo, 2006.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (eds.). Neoplasia. In: ROBBINS. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 8, p. 233-95.

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. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. v. 24, n. 3, p. 208-24. 2004

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. v. 265, p. 49-72, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos de Fennema*, 4ªed., Porto Alegre: Artimed, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*. v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*. v.102, p. 4489-500, 2002.

DESAGHER, S.; MARTINO, J. C. Mitochondria as the control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*., v. 9, p. 435-440, 2000.

DHANOA, B. S.; COGLIATI, T.; SATISH, A. G. et al. Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Human Genomics*, v. 7, n. 1, p. 7-13, 2013.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, v. 83, n. 2, p. 273-286, 2002.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. 561 Anthocyanins as Food Colors. New York, Academic Press. p. 181-207, 1992.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. v. 25, p. 4798-811, 2006.

FURUKAWA, M.; XIONG, Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*. v. 25, p. 162–171, 2005.

GÁMEZ, B. J.; LUCAS, M. D.; RODRIGUEZ, M. G. Cáncer de pulmón y síndromes paraneoplásicos. *Anales de medicina interna*. v. 18, n. 8, p. 50-56, 2001.

Ge, W., Zhao, K., Wang, X. et al. iASPP Is an Antioxidative Factor and Drives Cancer Growth and Drug Resistance by Competing with Nrf2 for Keap1 Binding. *Cancer Cell*. v. 32, n. 5, p. 561-573, 2017.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *BioFactors*, v. 7, n. 1/2, p. 113-174, 1998.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible 563 sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering 564 Journal*. v. 14, n. 3, p. 217–225, 2003.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; MA, H.; EDMONDS, M. E. et al. Maple polyphenols, ginnalins A-C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chemistry*. v.136, n.2, p.636–642, 2013.

GUERGOLETTI, K. B., COSTABILE, A., FLORES, G. et al. In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*. v. 196, p. 251-258, 2016.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*. v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. 5^a ed. Oxford: Oxford University; 2007

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 34, n. 4, p. 176-88, 2009.

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

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. v. 407, p. 770-76, 2000.

HU, X.; YEE, E.; HARLAN, J. M. et al. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood*. v. 92, p. 2759-2765, 1998.

HUNOT, S.; FLAVELL, R. A. Apoptosis: death of a monopoly?. *Science*. v. 292, p. 865-866, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the aminoterminal Neh2 domain. *Genes & Development*. v. 13, p. 76–86, 1999.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H. et al. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. *Cancer letters*. v. 115, n. 2, p. 173-178, 1997.

KATOH, Y.; IIDA, K.; KANG, M. I. et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 433, p. 342–350, 2005.

KOBAYASHI, A.; KANG, M.-I.; OKAWA, H. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*. v. 24, p. 7130–7139, 2004.

KRAJEWSKA, M.; WANG, H. G.; KRAJEWSKI, S. et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease. *Cancer Research*. v. 57, p. 605-13, 1997.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs. *British Journal of Medicine and Medical Research*, v. 7 (6), p. 438-457, 2015.

KUO, D. C.; HSU, S. P.; CHIEN, C. T. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl. *J Biomed Sci*. v.16, p.1–10, 2009.

LAGANÀ, P.; ANASTASI, G.; MARANO, F. et al. Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*. n.102, v. 5, p.1378-1387, 2019.

LAZARY, V. M. D. Efeitos do consumo de isoflavona na prevenção do câncer de mama. (2010). Monografia (Graduação em Educação e Promoção da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília – DF. 20f, 2010.

LEE, J. K.; DELANEY, C. P.; LIPMAN, J. M. Current state of the art in laparoscopic colorectal surgery for cancer: update on the multi-centric international trials. *Annals of Surgical Innovation and Research*. v. 6, n. 1, p. 5, 2012.

LEE, O. H.; JAIN, A. K.; PAPUSHA, V. et al. An auto-regulatory loop between stress sensors Irf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 282, p. 36412–36420, 2007.

LEE, S. W.; AHN, Y. Y.; KIM, Y. S. et al. The immunohistochemical expression of STAT3, Bcl-xL, and MMP-2 proteins in colon adenoma and adenocarcinoma. *Gut and Liver*. v.6, n.1, p.45–51, 2015.

LIN, B.R.; YU C. J.; CHEN, W. C. et al. Green tea extract supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of apoptotic and proinflammatory signaling. *J Biomed Sci.* v.16, p.1–14, 2009.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J. et al. Flavonóides. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* v. 3, n. 14, 2010.

LUDIDI, A.; BALOYI, M.C.; KHATHI, A et al. The effects of *Momordica balsamina* methanolic extract on haematological function in streptozotocin-induced diabetic rats: Effects on selected markers. *Biomed Pharmacother.* v.116, 2019.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nature Reviews Cancer.* v. 3, n. 6, p. 459–465, 2003.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARKOWITZ, S. D.; BERTOHNOLLI, M. Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine.* v. 361, p. 2449-60, 2009.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal.* v. 36, p. 539-543, 2000.

MELO-JUNIOR, M.R.; MACHADO, M. C. F. P.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. *Revista Paraense de Medicina,* v. 20, n. 4, p. 7-12, 2006.

MILKOVIC, L.; ZARKOVIC, N.; SASO, L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biology,* v. 12, p. 727–732, 2017.

MOON, E. J.; GIACCIA, A. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine,* v. 79, p. 292–299, 2015.

MORAES, V. H. F. Alegações sobre as propriedades funcionais do Licopeno: um estudo com consumidores do município de Campinas/SP. 2007. 118f. Dissertação

(Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

MOREIRA, R. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C. et al. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT. Food Science and Technology*. v. 77, p. 259-268, 2017.

MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Carcinogenesis and transcriptional regulation through Maf recognition elements. *Cancer Science*. v. 98, p. 135-139, 2007.

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

MUNRO, M. J.; WICKREMESEKERA, A. C.; DAVIS, P. F. et al. Renin-angiotensin system and cancer: a review. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. v. 4, p.1–6, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death Differentiation*. v. 18, p. 439–451, 2011.

NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 57, p.119-131, 2013.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 66, p. 36- 44, 2014.

NOVELLO, A. A. Extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidante e antiaterogênica em camundongos ApoE ^{-/-}. (2011). Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 80f, 2011.

OGINO, S.; ODZE, R. D.; KAWASAKI, T. et al. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in

colorectal carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. v. 30, p. 1175–1183, 2006.

OLIVEIRA, D. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R. et al. Vitamina C, carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

OLIVEIRA, J. R.; CAMARGO, S. E. A.; OLIVEIRA, L. D. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science*. v.26, p.1–22, 2019.

OLIVEIRA, M. S. P. *Biologia floral do açaizeiro em Belém, PA*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

OLIVEIRA, R. L.; ALMEIDA, A. C. S.; CARVALHO, C. W. P. et al. Effect of Processing on Bioactive Compounds, Physicochemical and Rheological Characteristics of Juçara, Banana and Strawberry Smoothie. *Plant Foods for Human Nutrition*. v. 73, n. 3, p. 222-227, 2018.

PANDEY, P.; SINGH, A. K.; SINGH, M. et al. The see-saw of Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology /Hematology*, v. 116, p. 89–98, 2017.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*. v. 38, n.2, p. 138-44, 2001.

PARK, S. Y.; NAM, J. S. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Experimental and Molecular Medicine*. v. 52, n. 4, p. 569-581, 2020.

PASCHKE, S.; JAFAROV, S.; STAIB, L. et al. Are colon and rectal cancer two different tumor entities? A proposal to abandon the term colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 19, n. 9, 2018.

PATEL, A. M.; DAVILA, D. G.; PETERS, S. G. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clinic Proceedings*. v. 68, 278-87, 1993.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer*. v. 2, n. 10, p. 764-76, 2002.

PEREIRA, D. C. S.; CAMPOS, A. N. R.; MARTINS, M. L. et al. Extração de compostos bioativos dos frutos da juçara: o açaí da mata atlântica. *Higiene Alimentar*. v. 05, p. 113-120, 2018.

PESSOA, E. Você tem ideias para colocar o fruto da palmeira juçara (não o palmito) no prato?. *Estadão*. 2018. Disponível em: <https://paladar.estadao.com.br/noticias/comida,voce-tem-ideias-para-colocar-o-fruto-da-palmeira-jucara-nao-o-palmito-no-prato,70002331682>. Acessado em: 27 de maio de 2020.

REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 17, p. 2941-2953, 1999.

REIS, A., KAGEYAMA, P. Y. Seed dispersal of palmito (Euterpe edulis Martius-Palmae). *Sellowia*, v. 49/52, p. 60-92, 2000.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGUEZ; J.; LAZEBNIK, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development*. v. 13, p. 3179-3184, 1999.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 385, p.449-64, 2004.

SÁEZ, V.; PASTENE, E.; VERGARA, C. et al. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*. v.265, p.101–110, 2018.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, v. 8, p. 121-137, 2002.

SCAPAGNINI, G.; VASTO, S.; ABRAHAM, N. G. et al. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*. v. 44, p. 192- 201, 2011.

SHI, C.; KEHRL, J. H. Bcl-2 regulates pyroptosis and necroptosis by targeting BH3-like domains in GSDMD and MLKL. *Cell Death Discovery*. v. 5, n.151, 2019.

SHIMA, K.; ORIKAWA, T.; BABA, Y. et al. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes & Control*. v. 22, p. 301–309, 2011.

SIDDIQUI, R. A.; HARVEY, K. A.; ZALOGA, G. P. et al. Modulation of Lipid Rafts by omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Cancer: Implications for Use of Lipids During Nutritional Support. *Nutrition in Clinical Practice*. v. 22, p. 74-88, 2007.

SILVA, P. P. M.; CARMO, L. F.; SILVA, G. M. et al. Physical, chemical, and lipid composition of Juçara (*Euterpe edulis mart.*) Pulp. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*. v. 24, n. 1, p. 7–13, 2013.

STEINBERG, D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*. v. 84, 1420-5, 1991.

SUN, Z.; WU, T.; ZHAO, F. et al. KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Molecular and Cellular Biology*. v. 31, n. 9, p. 1800–1811, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 820 p.

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. v. 43, p. 1800–1811, 2006.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*. v. 281, p. 1312-6, 1998.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; et al. Effects of Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutr J [Internet]*. BioMed Central. p.10-45, 2011.

VERZELLA, D.; PESCATORE, A.; CAPECE, D. et al. Life, death, and autophagy in cancer: NF-κB turns up everywhere. *Cell Death & Disease*. v. 11, n, 210, 2020.

WATSON, A. J.; PRITCHARD, D. M. Lessons from genetically engineered animal

models. VII. Apoptosis in intestinal apithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *American Journal of Physiology*. v. 278, n. 1, p. 1-5, 2000.

WHEELER J. M.; KIM, H. C.; EFSTATHIOU J. A. et al. Hypermethylation of the promotor region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut*. V.48, p. 367–371, 2001.

WOLF, B. B.; GREEN, R. G. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 274, n. 29, p. 20049–20052, 1999.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Research*. v. 5, p. 131-142, 1985.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. International Review of Cytology*. v. 68, p. 251-305, 1980.

XIANG, M.; NAMANI, A.; WU, S. et al. Nrf2: bane or blessing in cancer?. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. v. 140, n. 8, p.1251–1259, 2014.

YIIN, S. J.; LIN, T. H. Effects of metallic antioxidants on cadmium-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. v. 28, n. 1, p. 43-50, 1998.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. v. 74, p. 139-62, 1994.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 92, p. 57-70, 2001.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, U.; BAUM, W. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1551, p. F1-F37, 2001.