



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariana Franco Fragoso

Efeitos da ingestão da polpa de açaí liofilizada (*Euterpe oleracea* Mart.) no processo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan

Mariana Franco Fragoso

Efeitos da ingestão da polpa liofilizada de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no processo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fragoso, Mariana Franco.

Efeitos da ingestão da polpa de açaí liofilizada (*Euterpe oleracea* Mart) no processo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar. / Mariana Franco Fragoso. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luis Fernando Barbisan
Capes: 40105008

1. Açaí. 2. Polpa de frutas. 3. Carcinogênese. 4. Cólon (Anatomia) - Câncer. 5. Câncer - Quimioprevenção. 6. Colite.

Palavras-chave: Carcinogênese de cólon; Inflamação aguda; Polpa liofilizada de açaí; Quimioprevenção.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA FRANCO FRAGOSO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 14:00 horas, no(a) Sala 05 da Central de Aulas 3 do IB/Botucatu - Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN - Orientador(a) do(a) Depto. de Morfologia / IB/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO do(a) Depto. de Morfologia / IB/Botucatu - Unesp, Profa Dra CAMILA RENATA CORREA CAMACHO do(a) Depto. de Clínica Médica/Unipex / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO do(a) Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) / Hospital de Câncer de Barretos, Profa. Dra. JULIANA ELAINE PEROBELLI do(a) Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) / Campus Baixada Santista, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MARIANA FRANCO FRAGOSO, intitulada **Efeitos da ingestão da polpa de açaí liofilizada (*Euterpe oleracea* Mart.) no processo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN


Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO


Profa Dra CAMILA RENATA CORREA CAMACHO


Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO


Profa. Dra. JULIANA ELAINE PEROBELLI

Dedicatória

A meus pais

Por estarem sempre presentes, por serem meu alicerce e por me apoiarem em todas as minhas decisões. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim durante toda minha vida. Eu jamais teria chegado tão longe se não fosse pelo incentivo e amor incondicional de vocês dois! EU AMO VOCÊS!

Agradecimentos

A **Deus**, por ter me abençoado em todos os momentos, por sempre ter iluminado meu caminho, por ter me dado forças para superar a saudade, a ansiedade e todas as dificuldades desse período. Agradeço por ter me dado saúde e disposição para a realização de mais esta conquista!

À **minha mãe Onélia**, pelo bom humor e por sempre ter uma palavra de carinho e força para me levantar nos meus piores dias. Por ser minha melhor amiga e estar sempre por perto quando eu preciso. Obrigada por tudo que fez por mim e meus irmãos. Você me ensinou a ser uma mulher de força e trabalhadora. Tenho muito orgulho de tê-la como minha mãe. Eu te amo muito! Obrigada por tudo!

Ao **meu pai Amauri**, minha primeira referência de Doutor que tive na vida. Obrigada pelas noites que sentou comigo para me ensinar Física e Química. Obrigada por sempre brigar comigo quando eu me mostro pessimista. Obrigada pelo incentivo e por acreditar na pessoa que sou. Sei que você não é muito de demonstrar, mas sinto todo o carinho que tem por mim. Tenho muito orgulho de dizer que sou sua filha! Amo muito você!

Aos meus irmãos **Matheus e Marina**, pela torcida, pelo carinho e pelas visitas que amenizavam a saudade e renovavam meu ânimo para continuar! Amo vocês!

À minha **Tia Nona**, pessoa bastante querida e especial em minha vida. Obrigada pelos banquetes em sua casa, por todo o carinho e torcida pela minha felicidade!

A todos **meus tios e tias, primos e primas**. Obrigada pela torcida. Amo

todos vocês!

*À **Vovó Adete** (in memoriam) e à **Vovó Zézé** (in memoriam), ao meu padrinho **Ari Fragoso** (in memoriam), ao meu **Tio Dudu** (in memoriam), que mesmo não estando mais presentes nesse plano, sei que torcem por mim e estão felizes com essa conquista. Eternas saudades!*

*Ao meu namorado **Rodrigo Macedo**, por toda atenção, amor, cumplicidade, lealdade, amizade e carinho nesses últimos meses! Você é muito importante na minha vida e estou muito feliz de compartilhá-la com você. Obrigada por me fazer uma mulher mais feliz! Amo você, Gordo!*

*À **Mellby** (in memoriam), porque simplesmente nunca vou esquecê-la!*

*A “**Raninho**” (Honey) e **Alfredo**, cachorros da minha vida! Agradeço pelos momentos de alegria, carinho e lealdade!*

*Aos meus antigos amigos da UEPB, **George** e **Eline**, pela amizade, pelo incentivo, pelas longas conversas e apoio em todos os momentos. Obrigada por estarem sempre dispostos a me escutar, principalmente nos meus piores momentos. Saibam que nossa amizade significa muito para mim e que prezo bastante por ela. Amo vocês!*

*Às minhas amigas de infância/adolescência, **Mariana Alves**, **Laise**, **Lais** e **Katiusca**. Obrigada por estarem sempre por perto. Que nossa amizade perdure para sempre! Muito amor por todas!*

*Aos amigos dos tempos de graduação da UEPB, **Uirá**, **Magna**, **Allyson**, **Aninha**, **Dani**, **Ribamar**, **Fernanda**, **Raoni**, **Badel**. Vocês são toppest! Todo o sucesso do mundo para todos nós!*

À **Rosângela**, dona do pensionato onde morei nos últimos 6 anos, por ter preenchido o papel de mãe em muitos momentos e cuidado de mim sempre que precisei, sem nunca hesitar.

À **Natália Silveira**, por estar ao meu lado desde 2011, quando chegamos perdidas nessa cidade. Obrigada pela amizade e por todos os momentos de diversão que passamos juntas! Só quem mora longe da família sabe como é importante esse tipo de companheirismo. Você é como uma irmã para mim e, com certeza, fez minha vida em Botucatu menos solitária. Amo você!

À **Rafaela Polycarpo**, por estar sempre presente (mesmo com toda a distância) e por ser uma nova irmã em minha vida. Amo você!

À todas as moradoras e ex-moradoras da “Vila do Chaves”, em especial **Aline Garbuglio** pela convivência, muitas vezes difícil, pelos momentos de descontração e pela amizade. A experiência de morar com pessoas tão diferentes foi extremamente enriquecedora! Obrigada pela paciência de aturar meu mau humor e minhas TPMs! Adoro você!

À **Maísa Pinheiro**, pela amizade e por todas as risadas que demos juntas! Você é demais! Obrigada por toda força, principalmente nos momentos de incertezas sobre nosso futuro!

Às minhas amigas botucatuenses **Fernanda** e **Camila**, pela amizade e todos os momentos de diversão durante todos esses anos.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração. Agradeço pela oportunidade de ter sido aluna desta casa. Serei eternamente orgulhosa de ter obtido meus títulos em tão renomada instituição.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan**, um dos maiores exemplos de humildade que já vi na vida! Obrigada pela oportunidade de ter sido recebida em seu laboratório, por toda a paciência e por todo conhecimento compartilhado. Agradeço a confiança depositada em mim durante todos esses anos. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos passados, não apenas como pesquisador, mas também como ser humano.

A toda a equipe do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (**Joyce, Gisele, Guilherme, Nelci, Flavinha, Tony, Bruno, Muriele, Mariana Tablas, Renata**) pela ajuda no biotério e por todos os momentos descontração e comilança. Obrigada me deixarem fazer parte dessa família científica!

À **Profa. Dra. Camila Correa**, à **Profa. Dra. Cláudia Pellizon**, à **Profa. Dra. Daisy Salvadori**, à **Profa. Dra. Maeli Dal Pai** e ao **Prof. Robson Carvalho**. Obrigada a todos por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de experimentos para este projeto e pelo acolhimento nos momentos de dúvidas experimentais e teóricas.

Aos **funcionários do Departamento de Morfologia e de Patologia**, e aos **funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, por todo auxílio.

Ao bioterista **Paulo César (PC)**, por todas as rotinas de biotério e sacrifícios.

À **Profa. Dra. Luciana Azevedo** (Universidade Federal de Alfenas) e à **Dra. Renata Galhardo Borguini** (Embrapa Agroindústria de Alimentos), pela realização das análises na polpa de açaí.

À **Karen Johnston**, por ter se tornado uma mãe para mim em um outro país durante meu estágio nos EUA. Serei eternamente grata por ter aberto as portas da sua casa e me recebido como filha. Você com certeza se tornou parte da minha família! Obrigada por absolutamente tudo! Minha experiência fora do Brasil não teria sido a mesma se eu não tivesse morado com você durante esse ano! Thank you for everything you did to me!

Ao **Fox Chase Cancer Center**, por ser tão receptivo com estudantes estrangeiros. Agradeço a chance de ter trabalhado lá e ter sido tão bem recebida por todos.

À **Profa. Dra. Margie L. Clapper**, minha orientadora do período do Doutorado Sanduíche. Serei eternamente grata pela oportunidade dada, por acreditar em mim e fazer com que eu também acreditasse no meu potencial. Sua orientação foi extremamente importante para minha autoconfiança como cientista.

À **Wen-Chi, Lisa, Jing, Arlene, Esther, Kristen**, obrigada por tudo que fizeram por mim durante meu ano de estágio no exterior. Aprendi muito com todas vocês! Sinto muitas saudades de trabalhar com essa equipe!

Aos meus amigos do Fox Chase Cancer Center, **Daniela Araiza, Débora Vendramini, Daniela Di Marcantonio, Paula, Janusz, Ralph, Esteban!** The best crew! Thank you for being my family during my time in Philly. I miss you every day!

Aos meus amigos do **PUB-Philly**, em especial **Fernanda e Rômulo**. Saibam que jamais esquecerei todos os momentos que compartilhamos juntos todas aquelas sextas-feiras de 2015! Todas aquelas risadas jamais serão esquecidas. Tenho muita saudade de vocês. Vocês serão

sempre especiais!

*À **Ali Borget**, pela amizade e excelente companhia!*

*À **Prof. Dra. Edna Cukierman**, por ter disponibilizado seu laboratório no Fox Chase Cancer Center para os ensaios *in vitro*.*

Por fim, agradeço:

*Aos **animais de experimentação**, por suas vidas em prol do desenvolvimento da ciência. Todo meu respeito por esses seres!*

*Aos **membros da banca**.*

*A **CAPES (PDSE 008192/2014-06)** e **FAPESP (2013/17600-0)**, pelo auxílio financeiro durante o período de Doutorado.*

A todos que estiveram torcendo por essa conquista. Muito obrigada!

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* Martius) é um fruto nativo da região amazônica, bastante consumido no Brasil e no mundo. Os efeitos benéficos de seu consumo já foram demonstrados anteriormente em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. O objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos de ação da ingestão de polpa de açaí (AP) liofilizada em um modelo de carcinogênese do cólon associado à colite em ratos e a ação da cianidina 3-rutinosídeo no ensaio de motilidade celular em células de adenocarcinoma de cólon RKO. Ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos que receberam: (G1) dieta basal (n=20); (G2) dieta basal contendo 0,2% de NAC (N-acetilcisteína, um controle positivo) (n=15); (G3 e G4), dieta basal contendo 5,0% ou 7,5% de AP liofilizada, respectivamente (n=20 para cada grupo). Nas semanas 1 e 2, os ratos receberam 4 doses de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, duas vezes por semana). Duas semanas após as administrações de DMH, foi induzida inflamação aguda utilizando ácido 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS). Na semana 3, foram introduzidas intervenções dietéticas. Os efeitos modificadores da cianidina 3-rutinosídeo (C3R, 25 e 50 μ M) foram investigados na motilidade celular em células de adenocarcinoma humano RKO. Essa antocianina foi escolhida de acordo com os dados das análises de perfil de antocianinas realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Primeiramente, os resultados mostraram que C3R (25 μ M), a principal antocianina identificada em AP liofilizada, tinha uma tendência na redução da motilidade das células RKO, conforme analisado pelo ensaio de motilidade celular. Em segundo lugar, a ingestão de AP liofilizada reduziu o número total de focos de criptas aberrantes (FCA) e a multiplicidade de FCA (criptas FCA 1-4 e criptas FCA > 10), proliferação de células tumorais e incidência de tumores com displasia de alto grau. Em terceiro lugar, a AP liofilizada modulou a expressão de seis genes, sendo cinco hiperexpressos (Akt3, Dlc1, Ffar2, Vegfd, Ppara) e um hipoexpresso (Mhs6) envolvidos em diferentes propriedades do câncer. Dessa forma, os resultados indicam que a ingestão de AP liofilizada apresenta atividade antitumoral no modelo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos. Além disso, esses resultados constatarem pela primeira vez a ação benéfica da ingestão polpa de liofilizada de açaí no modelo proposto a partir de análises macroscópicas, microscópicas e moleculares.

Palavras-chave: açaí liofilizado, carcinogênese do cólon, inflamação aguda, prevenção.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) is a native fruit of the Amazon region, widely consumed in Brazil and worldwide. The beneficial effects of its consumption have already been demonstrated in several *in vivo* and *in vitro* studies. The objectives of this study was to evaluate the protective mechanisms of lyophilized açaí pulp (AP) intake in a colon carcinogenesis model associated with colitis in rats and to analyze the effect of cyanidin 3-rutinoside in the cell motility assay in colon adenocarcinoma cells RKO. Male Wistar rats were randomly assigned to four groups that received: (G1) basal diet (n=20); (G2) basal diet containing 0.2% NAC (N-acetylcysteine, a chemopreventive control) (n=15); (G3 and G4), basal diet containing 5.0% or 7.5% of lyophilized AP, respectively (n=20). At weeks 1 and 2, rats received 4 doses of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, twice a week). Two weeks after the administrations of DMH, acute inflammation was induced using 2,4,6-trinitrobenzene acid (TNBS). At week 3, dietary interventions were introduced. The cyanidin 3-rutinoside modifying effects (C3R, 25 and 50 μM) were investigated in cell motility in human RKO adenocarcinoma cells. This cyanidin was chosen based on the data for the anthocyanin profile analysis performed by high performance liquid chromatography (HPLC). First, the results showed that C3R (25 μM), the main anthocyanin identified in lyophilized AP, tended to reduce the motility of RKO cells, as analyzed by the cell motility assay. Second, ingestion of lyophilized AP reduced the total number of aberrant crypt foci (ACF) and the ACF multiplicity (ACF with 1-4 crypts and ACF > 10 crypts), tumor cell proliferation and incidence of tumors with high grade dysplasia. Third, lyophilized AP modulated the expression of six genes: five upregulated (Akt3, Dlc1, Ffar2, Vegfd, Ppara) and one downregulated (Msh6) involved in different cancer mechanisms of action. Thus, the results indicate that the ingestion of lyophilized AP shows antitumor activity in the colonic carcinogenesis model associated with colitis in rats. In addition, these results confirm, for the first time, the beneficial action of lyophilized açaí pulp in the proposed model based on macroscopic, microscopic and molecular analysis.

Key words: açaí fruit powder, colon carcinogenesis, acute inflammation, prevention.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

<i>FIGURA 1 - AÇAIZEIRO E SEU FRUTO</i>	16
<i>FIGURA 2 - HISTÓRICO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA</i>	18
<i>FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS PRINCIPAIS ANTOCIANINAS PRESENTES NO AÇAÍ</i>	26
<i>FIGURA 4 - INCIDÊNCIA DE CÂNCER DE CÓLON NO BRASIL EM 2016</i>	28
<i>FIGURA 5 - INCIDÊNCIA DE NOVOS CASOS E MORTES NOS ESTADOS UNIDOS ENTRE 1975-2013</i>	29
<i>FIGURA 6 - MODELO PROPOSTO DA SEQUÊNCIA ADENOMA-CARCINOMA NO CRC</i>	30
<i>FIGURA 7 - CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES DE CÓLON DE ACORDO COM O TCGA (2013)</i>	30
<i>FIGURA 8 - VIA WNT CANÔNICA INATIVADA E ATIVADA</i>	33
<i>FIGURA 9 - VIA DO P53 E SEUS GENES ALVOS</i>	35
<i>FIGURA 10 - GANHOS DE FUNÇÃO DO P53 MUTANTE INTERAÇÃO COM OS “HALLMARKS” DO CÂNCER</i>	36
<i>FIGURA 11 – TERAPIA DO CÂNCER</i>	37
<i>FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO DEMONSTRANDO OS PROCESSOS DE HIPERMETILAÇÃO E HIPOMETILAÇÃO</i>	38
<i>FIGURA 13 - ESTRUTURA ATIVA E INATIVA DA CROMATINA</i>	39
<i>FIGURA 14 - DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL</i>	43
<i>FIGURA 15 - PROGRESSÃO DA CARCINOGENESE DE CÓLON ASSOCIADA À COLITE</i>	44
<i>FIGURA 16 - METABOLISMO DO DMH</i>	47
<i>FIGURA 17 – FCA COM 9 CRIPTAS ABERRANTES</i>	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

<i>TABELA 1 - PRINCIPAIS ESTUDOS <i>IN VIVO</i> SOBRE O EFEITO DO AÇAÍ E SEUS COMPOSTOS PRINCIPAIS</i>	<i>20</i>
<i>TABELA 2 - PRINCIPAIS ESTUDOS <i>IN VITRO</i> SOBRE O EFEITO DO AÇAÍ E SEUS COMPOSTOS PRINCIPAIS</i>	<i>22</i>
<i>TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS</i>	<i>24</i>
<i>TABELA 4 – TABELA INDICATIVA DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE CÓLON.....</i>	<i>28</i>

SUMÁRIO

Capítulo 1

Revisão de Literatura	15
1. O açazeiro e o açaí.....	16
2. O açaí e sua composição química	23
2.1 Polifenóis	23
2.2 Quimioprevenção e antocianinas.....	24
3. Câncer de cólon	27
3.1 Epidemiologia e fatores de risco	27
3.2 Carcinogênese de cólon	29
3.3 Regulação genética do CRC.....	31
3.4 Regulação epigenética do CRC.....	37
4. Carcinogênese de cólon associado à colite.....	42
5. Modelos animais da carcinogênese química de cólon	46
6. Hipótese do trabalho	53
7. Referências	54
8. Objetivos	66

Capítulo 2

Artigo científico	68
Figures	89
Tables	95
Supplementary data	100
References.....	108

Anexos	118
---------------------	------------

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Açaizeiro e o açaí

O açaizeiro é uma palmeira de grande importância cultural, econômica e social na Região Norte do Brasil, sendo encontrada ao longo de rios, igarapés e áreas úmidas (Queiróz and Melém Junior, 2001). Essa palmeira, nativa da América do Sul, cresce principalmente no Brasil, Colômbia e Suriname (Schauss et al., 2006) e pode chegar a atingir até 30 metros de altura (Pedrozo et al., 2011). Pertence ao gênero *Euterpe* que tem aproximadamente 28 espécies, sendo as mais comuns *Euterpe oleracea*, *Euterpe edulis* e *Euterpe precatoria* (Yamaguchi et al., 2015).

O açaí, fruto do açaizeiro, é a sua parte mais importante economicamente. Devido a presença de múltiplos caules no açaizeiro, também passou a ser utilizado na indústria de processamento de palmito, em substituição ao palmito (*E. edulis* Mart), espécie de caule solitário que está sob risco de extinção (Oliveira et al., 2002). Esse fruto recebeu bastante atenção nos últimos anos, por ser considerado uma “super fruta” devido a suas potenciais propriedades benéficas para o organismo humano (Yamaguchi et al., 2015). É geralmente cultivado em regiões quentes e úmidas, com pequenas amplitudes térmicas e, quando maduro, apresenta cor violácea, é redondo e pesa em média 1,5 gramas (Schauss, 2010) (Figura 1).



Figura 1. Açaizeiro e seu fruto. **A**, cultivo de açaí; **B**, inflorescência do açaizeiro; **C**, infrutescência do açaizeiro; **D**, açaí. Fotos: Oliveira et al., 2002.

A composição química da porção comestível e da polpa industrializada são bastante discrepantes, devido à grande variabilidade genética entre as variedades de açaizeiro. Seu valor energético é determinado em grande parte pelos lipídios, visto que proteínas e açúcares totais apresentam baixas quantidades (Oliveira et al., 2002).

O aumento do consumo de açaí nas últimas décadas se deu principalmente devido a produção de bebidas enérgicas. Um estudo realizado recentemente avaliou a contribuição relativa de alimentos derivados de plantas consumidos mais comumente no Brasil e sua capacidade oxidante na dieta brasileira. Foi observado que o açaí é o terceiro alimento consumido pelos brasileiros com maior capacidade antioxidante (Torres e Farah, 2016). Outros estudos demonstrando sua capacidade antienvhecimento e presença de compostos bioativos aumentaram o interesse pelo consumo desse fruto. Além disso, o fruto passou a ser utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, devido aos compostos antioxidantes benéficos à saúde (Yamaguchi et al., 2015).

A localização geográfica do Brasil e suas condições climáticas facilitam o cultivo de diversos frutos tropicais com excelente potencial econômico para o agronegócio. Essa produção nacional tem apresentado aumento expressivo na sua importância econômica em toda região do estuário amazônico nos últimos anos (CONAB, 2016). De acordo com o relatório do CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) para o período de 01-30/04/2016, o Pará foi o responsável por 54% da produção de açaí, seguido do Amazonas (33,6%), Maranhão (7%), Acre (2%), Amapá (1%), Rondônia e Roraima (0,9%) (Turini, 2016). Ainda de acordo com dados desse mesmo relatório, é possível observar que, embora a produção de açaí tenha estagnado entre 2012-2014, é possível observar um elevado crescimento do seu lucro médio, como mostra a Figura 2.

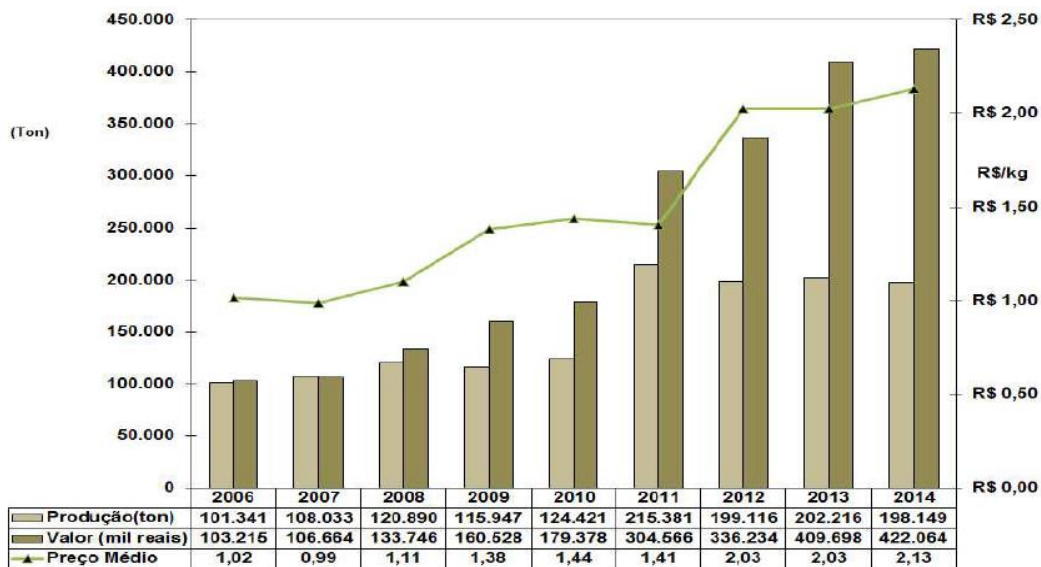


Figura 2. Histórico da Produção Brasileira (Fonte: IBGE. Elaboração: CONAB).

Além dessa grande importância econômica para o Brasil, estudos a respeito das propriedades biológicas desse fruto tem crescido no decorrer dos anos, aumentando o alcance na prospecção de novos alimentos funcionais (Paz et al., 2015). Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm analisado o efeito do açaí e suas porções polifenólicas isoladas em diferentes situações experimentais. As Tabelas 1 e 2 trazem alguns dos estudos já realizados.

O estresse oxidativo refere-se à produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio nas células e em tecidos que não consegue ser neutralizada pelo sistema antioxidante (Hussain et al., 2016). A partir dos resultados obtidos nas Tabelas 1 e 2, pode-se sugerir que a ideia de que os antioxidantes presentes na dieta podem ser uma abordagem promissora para o aumento do sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, passam a agir de forma protetora contra diversas doenças envolvidas com o estresse em questão (Pereira et al., 2016).

Além de todos os benefícios a saúde citados anteriormente, dois estudos em especial demonstraram o benefício do açaí e das antocianinas, polifenóis presentes nesse fruto, para o diagnóstico de doenças e o seu uso na biotecnologia. Em um deles, o açaí foi utilizado como uma alternativa para o contraste oral para ressonância magnética, se apresentando bastante eficiente, devido a seu alto conteúdo de Fe, Mn

e Cu (Córdova-Fraga, 2004). Já no outro estudo, as antocianinas foram utilizadas para aumentar a visualização de microestruturas durante cirurgia vitreoretinal (Peris, 2013).

Tabela 1. Estudos *in vivo* sobre o efeito protetor do açaí e seus compostos principais.

Fonte de açaí	Tratamento	Espécie	Efeito biológico	Referência
Suco de açaí	7 mL/Kg de peso corpóreo de suco de açaí	Humanos	Demonstrou a biodisponibilidade dos polifenóis do açaí (antocianinas) e seu efeito antioxidante no plasma	Mertens-Talcott et al., 2008.
Smoothie de açaí (Sambazon®)	100 g de açaí/dia durante 1 mês para paciente com sobrepeso	Humanos	Proteção contra a diabetes e hipercolesterolemia	Udani et al., 2011
Extrato da semente de açaí	Perfusão de 0,1-100 µg do extrato	Ratos	Efeito vasodilatador	Rocha et al., 2007
Polpa de açaí	Polpa de açaí (40% wt/vol) no tecido homogenado de córtex cerebral, cerebelo e hipocampo e indução de estresse oxidativo por H ₂ O ₂	Ratos	Efeito positivo contra doenças neurodegenerativas	Spada et al., 2009
Polpa de açaí	2% de polpa seca de açaí suplementada na ração	Ratos	Melhora do status antioxidante e efeito hipocolesterômico	De Souza et al., 2010
Flocos liofilizados de açaí	Indução da carcinogênese de esôfago com 3 injeções semanais por 5 semanas de MNBA (0.3 mg/kg p.c.)	Ratos	Redução da carcinogênese de esôfago e dos níveis de algumas citocinas	Stoner et al., 2010
Polpa de açaí (<i>spray dried</i>)	2,5 e 5% de açaí suplementado na ração convencional durante 24 semanas	Ratos	Atenuação do desenvolvimento da carcinogênese química de cólon	Fragoso et al., 2013

Polpa de açaí	2g/dia de açaí via gavagem durante 6 semanas	Ratos	Redução do dano hepático	Pereira et al., 2016
Extrato preparado a partir da fruta	Extrato fresco de açaí (80 mL) por 12 semanas a vontade	Coelhos	Efeito protetor contra o processo de aterosclerose	Feio et al., 2012
Extrato da semente de açaí	Exposição a 100 mg de extrato de açaí em cigarros durante 60 dias	Camundongos	Proteção contra o enfisema pulmonar, sugerindo a adição de açaí aos cigarros para redução dos efeitos maléficos do fumo	De Moura et al., 2011
Extrato de semente de açaí	300 mg/Kg/dia via oral	Camundongos	Proteção do açaí contra a inflamação pulmonar aguda	Moura et al., 2012
Polpa de açaí (<i>spray dried</i>)	2,5 e 5% de açaí suplementado na ração convencional durante 10 semanas	Camundongos	Inibição da carcinogênese química de bexiga	Fragoso et al., 2012
Suco de açaí	Administração 10 µl/g de peso corpóreo via gavagem, uma vez ao dia, durante 4 dias	Camundongos	Proteção contra as convulsões e o estresse oxidativo derivado delas	Souza-Monteiro et al., 2015
Polpa de açaí (<i>spray dried</i>)	2,5 e 5% de açaí suplementado na ração convencional durante 4 semanas	Camundongos	Aumento da GSH total e atenuação do dano ao DNA e desenvolvimento de lesões pré-neoplásica no cólon	Romualdo et al., 2015
Polpa de açaí (<i>spray dried</i>)	2,5 e 5% de açaí suplementado na ração convencional durante 4 semanas	Camundongos	Efeito protetor contra a carcinogênese de cólon associada à colite no modelo de AOM/DSS	Choi et al., 2016

Tabela 2. Estudos *in vitro* sobre o efeito protetor do açaí e seus compostos principais.

Fonte de açaí	Tratamento	Amostra utilizada	Efeito biológico	Referência
Smoothie com diversos frutos ricos em antioxidantes (MonaVie®)	Diluições seriadas do smoothie	PMN e eritrócitos humanos	Proteção contra o estresse oxidativo, redução na produção de ROS e migração celular	Ensen et al., 2008
Frações polifenólicas presentes no açaí	Células tratadas com 0,5-10 µg de cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo	HT-29	Redução da proliferação celular	Pacheco-Palencia et al., 2010
Compostos específicos extraído do açaí	20 µg/mL dos compostos	MCF-7	Efeito citoprotetor contra o estresse induzido por H ₂ O ₂	Chin et al., 2008
Extrato de açaí	25-100 µg/mL do extrato de açaí	RAW 264.7	Inibição da diferenciação de osteoclastos e atividade pela modulação da expressão de citocinas	Brito et al., 2016
Extrato liofilizado de açaí	0,001–1000 µg/mL em diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72h)	SH-SY5Y	Aumento da expressão de proteínas do complexo mitocondrial e redução da produção de EROs (candidato potencial para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da bipolaridade)	De Souza Machado et al., 2016
Extrato de açaí	0,1 µg/mL	Astrócitos	Atenuação do estresse oxidativo induzido pelo Manganês	Santos et al., 2014
Extrato polifenólico de açaí	5–20 mg/L	SW-480	Aumento da atividade pró-apoptótica	Dias et al., 2014
Extrato da casca, semente e fruto total	10, 20 e 40 µg/mL durante 24 e 48h	MCF-7	Efeito antitumoral	Silva et al., 2014

2. O açaí e sua composição química

Como mostrado nas Tabelas 1 e 2, o açaí e seus compostos isolados têm grande importância no seu efeito biológico. Existem diversos estudos disponíveis na literatura que mostram que o açaí é rico em diversos polifenóis, como antocianinas, flavonas e ácidos fenólicos (Lichetenthaler et al., 2005; Pacheco-Palencia, Duncan e Talcott, 2009). Além disso, sua polpa mostrou-se rica em minerais (Ca, Fe, Mg, Zn), apresentando níveis de Cu e Mn mais altos quando comparados a alimentos fontes desses minerais (Santo et al., 2014).

2.1 Polifenóis

Polifenóis constituem o grupo de produtos naturais mais numerosos e amplamente distribuídos do reino vegetal. Diversos alimentos presente em nossa dieta são constituídos de polifenóis, como frutas, vegetais, cereais, chás, chocolate e vinho (Tsao, 2010). Esses compostos são caracterizados por apresentarem importante função antioxidante contra diversas doenças, incluindo o câncer (Kang et al., 2011).

Os polifenóis compreendem uma ampla variedade de moléculas que apresenta uma estrutura polifenólica, ou seja, diversos grupos hidroxila em anéis aromáticos, podendo também estarem ligados a apenas um anel, como os ácidos fenólicos e alcoólicos (Kang et al., 2011). Eles podem ser classificados de acordo com sua fonte de origem, função biológica e estrutura química. Além disso, a maioria dos polifenóis presentes em plantas existem na sua forma glicosídica, com diferentes unidades de açúcar e açúcares acetilados em diferentes posições (Tsao, 2010).

De forma a simplificar sua classificação, muito se utiliza a nomenclatura baseada no número de anéis aromáticos e nos elementos estruturais que ligam esses anéis aos outros (Tsao, 2010; Kang et al., 2011). As principais classes de polifenóis são as seguintes: flavonoides, chalconas, estilbenos, ácidos fenólicos e lignanos/álcoois fenólicos (D'Archivio et al., 2007) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos polifenóis baseada no número de anéis aromáticos.

Subclasse	Exemplos
<i>Flavonóides</i>	Flavonóis Flavonas Isoflavonas Antocianinas Flavanóis
<i>Chalconas</i>	Curcumina
<i>Estilbenos</i>	Resveratrol
<i>Ácidos fenólicos</i>	Ácido hidroxicinâmico Ácido hidroxibenzóico
<i>Ligananos/Alcoóis fenólicos</i>	Tirosol Estegnacina Podofilotoxina

*Antocianinas não glicídios de antocianidinas. Fonte: Adaptado de D'Archivio et al., 2007.

2.2 Quimioprevenção e antocianinas

A quimioprevenção pode ser definida como uso de substâncias naturais ou sintéticas capazes de suprimir, impedir e reverter a carcinogênese nos seus estágios iniciais (Das et al., 2007). Como a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, substâncias com potencial quimiopreventivo bloqueador e supressor podem agir nas etapas de iniciação, promoção/progressão, respectivamente (Johnson, 2007).

Um agente quimiopreventivo ideal deve ter (i) pouca ou nenhuma toxicidade, (ii) alta eficácia em múltiplos locais, (iii) possibilidade de ser consumido oralmente, (iv) mecanismos de ação conhecidos, (v) baixo custo, e (vi) aceitação humana (Rajamanickam e Agarwal, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que um maior consumo de frutas e verduras está associado com a redução do risco de vários tipos de cânceres (Safe et al., 1999; Velmurugan et al., 2010) e, por conta disso, o interesse pelo efeito preventivo e terapêutico antitumoral de compostos químicos oriundos de plantas medicinais e alimentos funcionais tem crescido nos últimos anos.

Os polifenóis são considerados compostos com capacidade quimiopreventiva contra células tumorais e podem agir de acordo com os seguintes mecanismos: 1. Supressão da hiperexpressão de enzimas pró-oxidantes envolvidas no

desenvolvimento do câncer; 2. Inibição da ativação de fatores de transcrição, regulando, dessa forma genes alvos envolvidos na sobrevivência e proliferação celular; 3. Indução de apoptose; 4, inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), reduzindo a angiogênese envolvida no processo de crescimento e metástase tumoral (Aggarwal e Shishodia, 2006; Thomasset et al., 2007).

Um ponto importante a se levar em consideração quando se discute a eficácia quimiopreventiva de um determinado agente é a sua biodisponibilidade (Russo, 2007). Biodisponibilidade pode ser definida como a proporção de nutrientes que é digerida, absorvida e metabolizada pela via oral normal (D'Archivio et al., 2007). No caso dos polifenóis, os mesmos sofrem modificações químicas durante seu metabolismo similares ao metabolismo das drogas comuns, o que dificulta a identificação dos seus metabólitos e a avaliação de sua atividade biológica (Day e Williamson, 2001). Portanto, saber quanto do composto está presente nas plantas medicinais e alimentos ou na dieta é tão importante quanto saber quanto do mesmo está biodisponível para a promoção de atividades quimiopreventivos (D'Archivio et al., 2007).

Na Tabela 1, é possível observar os cinco e únicos estudos que avaliaram o potencial quimiopreventivos do açaí nas diferentes fases do processo de carcinogênese de esôfago, cólon e bexiga em ratos e camundongos (Stoner et al., 2010; Fragoso et al., 2012; Fragoso et al., 2013; Romualdo et al., 2015; Choi et al., 2016). Em todos eles, sugere-se que o efeito protetor observado ocorreu devido a presença dos seus polifenóis, em especial as antocianinas.

Antocianinas são polifenóis que pertencem a subclasse dos flavonoides. Geralmente, ocorrem na natureza na sua forma glicosídica, sendo as mais comuns a frutose, a galactose, arabinose, rutinose, rhaminose e xilose (Fang, 2014). Sua estabilidade varia bastante e pode ser afetada por fatores como pH, temperatura, concentração, luz, solventes, presença de oxigênio, enzimas e outros flavonoides, proteínas e íons metálicos (Fang, 2014).

Como já demonstrado nas Tabelas 1 e 2, o açaí é um composto rico em antocianinas e a grande maioria deles identificou a cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo como as mais abundantemente encontradas (Del-Pozo Insfran et al., 2004; Linchetenthaler et al., 2005; Schauss et al., 2006; Gordon et al., 2012; Romualdo et al., 2015) (Figura 3).

A permeabilidade das antocianinas na mucosa do trato gastrointestinal é alta. Além disso, a concentração de antocianinas nos tecidos intestinais é maior do que na circulação, sugerindo que elas sofrem metabolismo inicial antes de entrarem como metabólitos na circulação sanguínea (Fang, 2014). Isso é de extrema importância para o estudo da quimioprevenção em modelos de carcinogênese intestinal.

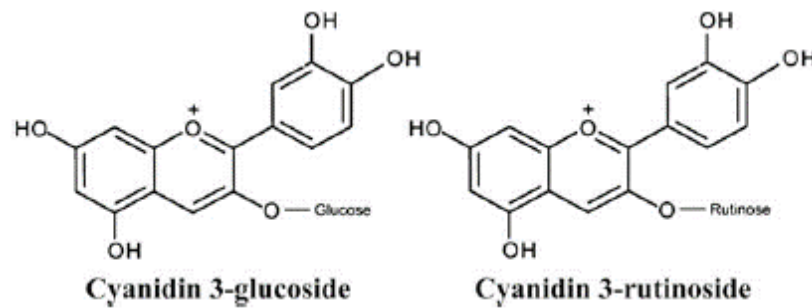


Figura 3. Estrutura química das principais antocianinas presentes no açaí (Adaptado de Butt et al., 2008).

O estudo de Hassimoto e colaboradores (2008) avaliou a absorção da cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo em ratos após administração oral. Eles observaram que as duas antocianinas foram detectadas no plasma e rins na sua forma intacta e em menores quantidades nos seus metabólitos. Apesar da baixa absorção, observou um aumento de glicosídeos de cianidina no plasma, levando ao aumento da capacidade antioxidante (Hassimoto et al., 2008). Estudos como esse mostram que a antocianina pode ser absorvida pelo organismo animal, sendo, portanto, recomendada para estudos de quimioprevenção. Além disso, sua alta capacidade antioxidante

3. Câncer de cólon

3.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer colorretal (CRC) é uma neoplasia de origem epitelial que contribui significativamente para a mortalidade e morbidade pelo câncer no mundo (Muzny et al., 2016). Seu desenvolvimento se dá a partir do acúmulo de alterações no genoma e epigenoma das células epiteliais do intestino grosso/reto, levando a um dano tecidual associado (Kelloff et al., 2004; Voorham et al., 2012). Essa neoplasia é conhecida como uma doença silenciosa, visto que muitos pacientes só apresentam sintomas quando a doença já está em estágio bastante avançado (Vatandoost et al., 2015). Na maior parte dos casos, o CRC se desenvolve a partir de lesões não-cancerosas, chamadas de pólipos, que podem (ou não) progredir para um adenocarcinoma invasivo e metastático (Voorham et al., 2012).


Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer de cólon podem ser classificados em dois tipos principais: modificáveis e não modificáveis. Os fatores de risco modificáveis são aqueles relacionados à alimentação e ao estilo de vida, ou seja, à ingestão de dieta rica em carne vermelha e/ou processada, açúcar refinado e gordura e pobre em fibras e vegetais, ao consumo excessivo de álcool e cigarro, à obesidade e à falta de atividade física. Já os fatores não-modificáveis incluem a predisposição genética, que representa 5% dos casos (Síndrome de Lynch ou Câncer colorretal hereditário não polipóide - HNPCC e Polipose Adenomatosa Familiar – FAP), histórico familiar, diabetes e a inflamação crônica do intestino (Colite Ulcerativa e Doença de Chron) (Williams et al., 2010; Velmurugan et al., 2010; Siegel et al., 2016).

O último relatório com as atualizações a respeito das evidências com relação ao aumento ou redução do risco de CRC foi publicado pela em 2011 pela *World Cancer Reseach Fund International* (WCRFI). Como pode ser visto na Tabela 4, a dieta e estilo de vida influenciam diretamente no aumento/redução do risco desse tipo de neoplasia.

Tabela 4. Tabela indicativa de fatores que podem influenciar no desenvolvimento do câncer de cólon (Adaptado do WCRFI, 2011).

Evidência	Aumenta o risco de CRC	Reduz o risco de CRC
<u>Convincente</u>	Carne vermelha Carne processada Bebidas alcoólicas (homens) Gordura abdominal e corporal Altura atingida na fase adulta	Atividade física e alimentos ricos em fibras
<u>Provável</u>	Bebidas alcoólicas (mulheres)	Alho Leite Cálcio
<u>Sugestiva</u>	Alimentos ricos em Ferro Queijo Alimentos ricos em gorduras Alimentos ricos em açúcares	Vegetais não-amiláceos Frutas Alimentos ricos em Vitamina D
<u>Inconclusiva</u>	Peixe, índice glicêmico, folato, vitamina C, vitamina E, selênio, alimentos com baixa gordura, padrão proteico	

A última estatística publicada com relação a sua incidência global data de 2012 (Globocan, 2012). Nesses dados, aproximadamente 600.000 mortes por câncer colorretal ocorrem todos os anos, o que torna esse tipo de neoplasia a quarta causa de morte no mundo. No Brasil, de acordo com os dados do INCA (2016), o câncer de cólon também é um dos mais incidentes na população, sendo o terceiro e segundo tipo de câncer mais comuns em homens e mulheres, respectivamente (Figura 4).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 4. Incidência de câncer de cólon no Brasil em 2016 (Adaptado de INCA, 2016).

Apesar da incidência desse tipo de câncer estar crescendo em países em desenvolvimento, como o Brasil, foi possível observar uma redução de aproximadamente 3% no número de novos casos e taxa de mortalidade desse tipo de câncer nos últimos dez anos nos Estados Unidos (Figura 5). Essa redução se deu principalmente a uma melhora no *screening* e no tratamento da doença (Howlander et al., 2016).

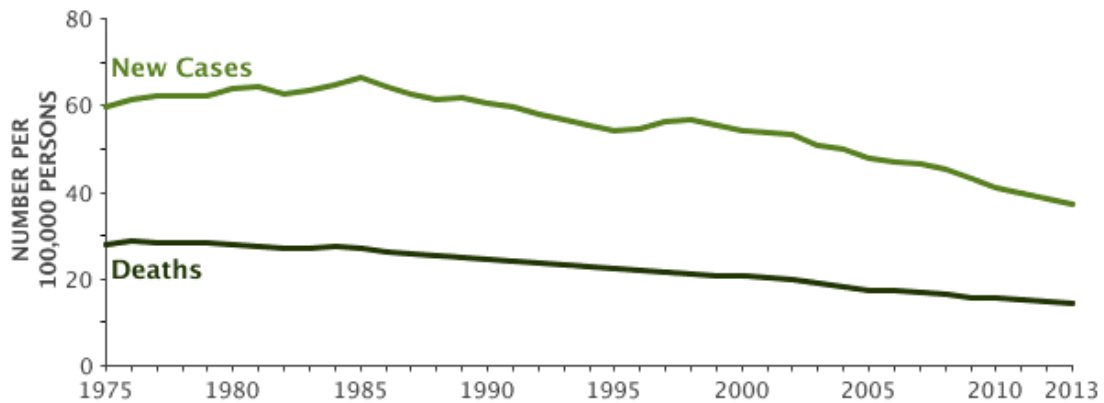


Figura 5. Incidência de novos casos e mortes nos Estados Unidos entre 1975-2013 (Fonte: Howlander et al., 2016).

Mesmo com toda a melhoria para a terapia do CRC, o entendimento do porquê alguns pacientes respondem ou não as terapias e os motivos pelos quais alguns pacientes apresentam recaída ainda é bastante limitado (Walther et al., 2009). Por conta disso, muito esforço envolvendo pesquisa sobre esse tipo de neoplasia tem sido desenvolvido.

3.2 Carcinogênese de cólon

A carcinogênese de cólon é uma doença heterogênea e pode ser classificada em diferentes subtipos, caracterizados por alterações morfológicas e moleculares (Muller et al., 2016) (Figura 6). Dessa forma, o CRC pode se desenvolver de três maneiras a partir do (a): 1. Instabilidade cromossômica (representa aproximadamente 84% dos casos de câncer esporádico); 2. Instabilidade de microssatélite (representa em torno de 13-16% dos casos de CRC); e 3. Fenótipo caracterizado pelas ilhas CpG (CIMP), no qual há uma alta frequência de hipermetilação no DNA de genes específicos (Migliori et al., 2011; Muller et al., 2016).

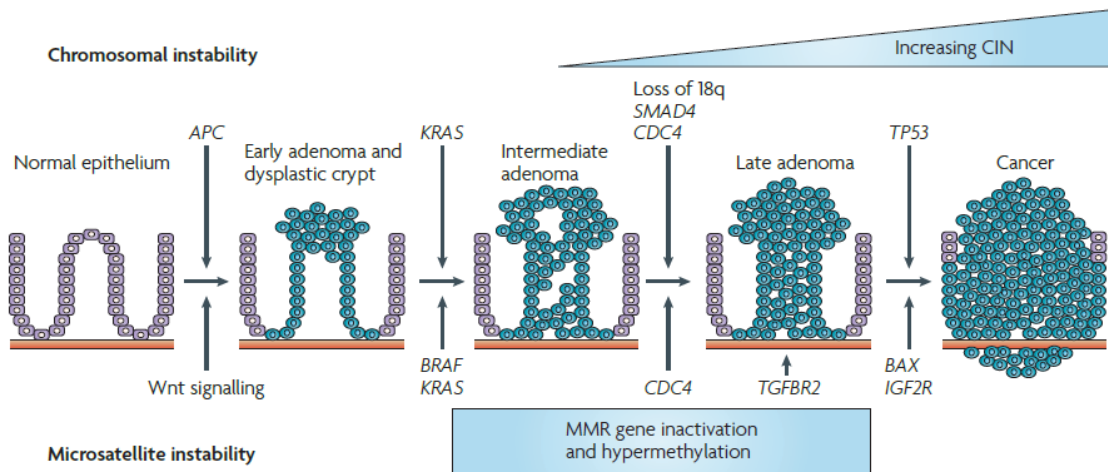


Figura 6. Modelo proposto da sequência adenoma-carcinoma no CRC (Fonte: Walther et al., 2009).

De acordo com o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (2013), o CRC pode ser dividido de acordo com a Figura 7.

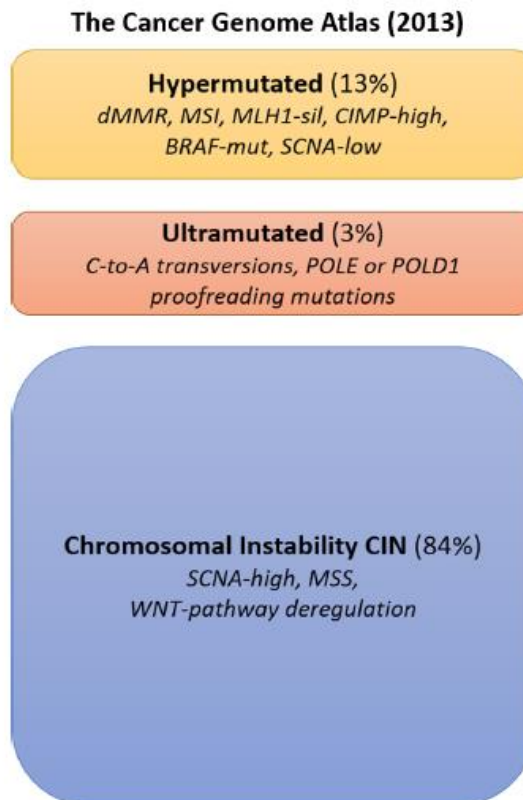


Figura 7. Classificação dos tumores de cólon de acordo com o TCGA (2013). (1) 13% de tumores hipermutados com instabilidade de microssatélite causada por defeito em genes de reparo de DNA; (2) ~3% de tumores ultramutados, que apresentam mau funcionamento de enzimas que introduzem nucleotídeos no DNA durante a replicação;

(3) ~84% de tumores com instabilidade cromossômica com alta frequência de alterações somáticas de cópia de DNA, baixa taxa de mutação, estabilidade de microssatélite e desregulação da via Wnt (Adaptado de Muller et al., 2016).

Os tumores que apresentam instabilidade cromossômica (CIN) geralmente desenvolvem lesões com alterações cromossômicas importantes (aneuploidias), enquanto que aqueles com instabilidade de microssatélites (MSI) geralmente mantêm o estado diplóide normal e tem alto índice de mutações (Bacalod e Barany, 2011).

Os tumores CIN geralmente se desenvolvem a partir da combinação da ativação de oncogenes (*KRAS*, *PIK3CA*) e inativação de genes supressores tumorais (*APC*, *SMAD4* e *TP53*) (Muller et al., 2016). Todas essas ativações/inativações geram alterações nas características teciduais, levando a sequência adenoma-carcinoma, descrita por Fearon e Vogelstein em 1990 (Figura 6).

A MSI ocorre principalmente em CRC hipermutados esporádicos e na síndrome de Lynch. Esse tipo de neoplasia se desenvolve a partir de defeitos no sistema de reparo de DNA, que podem ser hereditários ou adquiridos. No caso da síndrome de Lynch, a herança é do tipo hereditária e é causada por uma herança dominante, na qual genes de reparo, como o *MSH2* e *MLH1*, apresentam mutações. Dessa forma, as células somáticas apresentam apenas um alelo mutado e o outro do tipo selvagem. No decorrer da tumorigênese de cólon, ocorre a inativação do segundo alelo por mutação, deleção ou metilação da região promotora dos genes em questão (Muller et al., 2016).

No caso do CRC hipermutado esporádico, o mecanismo ocorre na maior parte das vezes por hipermetilação do promotor de ambos os alelos (Muller et al., 2016). A maioria dos tumores com essa característica apresentam morfologia em forma de pólipos serrilhados, ocorrendo principalmente no cólon proximal e derivam de um grupo de pólipos hiperplásicos (Matos et al., 2016).

Nos próximos tópicos, os eventos moleculares envolvidos no CRC serão discutidos.

3.3 Regulação genética do CRC

3.3.1 APC e via Wnt

A mutação no gene *APC*, que está localizado no cromossomo 5q21, é um evento que ocorre nos estágios iniciais da carcinogênese em aproximadamente 70% dos casos de CRC (Christie et al., 2013). Além disso, mutações germinativas nesse gene levam a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), caracterizada pelo aparecimento de centenas de adenomas no cólon e com uma chance de 100% para o desenvolvimento de CRC caso não tratado (Grodin, 1991).

O *APC* é um importante regulador negativo da via Wnt, pois faz parte do complexo de degradação Axina-APC, o qual promove a degradação proteossomal da β -catenina (Muller et al., 2016). Ele codifica uma proteína com 312Kda e 2843 aminoácidos; proteína essa que apresenta diversas funções e podem interagir com diversas outras, como a β -catenina, a quinase glicogênio-sintase 3 β (GSK3 β) e a *end binding protein 1* (EB1) (Leslie et al., 2002). No entanto, a principal função do gene *APC* para o CRC é a sua habilidade de controlar os níveis intercelulares da proteína β -catenina. Apesar da caracterização da maioria dos componentes dessa via já ter sido realizada, a função da via Wnt na biologia do câncer é complexa e ainda se encontra parcialmente entendida (Zhan et al., 2016).

A via Wnt pode ser dividida em canônica (dependente de β -catenina) e não-canônica (independente de β -catenina) (Figura 8). Essa via é conservada no processo evolutivo e controla processos celulares, como proliferação, diferenciação, motilidade e manutenção dos tecidos (MacDonald et al., 2009) e especificação do destino celular e manutenção da pluripotência (Tanaka et al., 2011). Daí sua importância para o câncer.

Na via canônica, a ausência de ligantes Wnt ativados leva a fosforilação da β -catenina pelo complexo de destruição, composto pela Axina, APC, GSK3 β quinase e caseína quinase (CK1 α). Nesse estado, a β -catenina é fosforilada pela GSK3 β , ubiquitinada pela β -TrCP200 e, em seguida, sofre degradação proteossomal. Na ausência da β -catenina nuclear, um complexo de repressão contendo TCF/LED e a TLE/Groucho recruta histona desacetilases para repressão de genes alvos.

Esta via é ativada a partir da ligação de ligantes Wnt secretados, como o Wnt3a e Wnt1, a receptores *Frizzled* (Fzd) e co-receptores LRP. Os receptores LRP são fosforilados pela CK1 α e GSK3 α , os quais recrutam proteínas *Dishevelled* (Dvl) para a membrana plasmática, onde se polimerizam e são ativadas. Os polímeros de Dvl inativam o complexo de destruição da β -catenina. Dessa forma, ocorre a estabilização e o acúmulo dessa proteína no citoplasma que, em seguida, é translocada para o

núcleo. No núcleo, a β -catenina forma um complexo ativo com LEF (*lymphoid enhancer fator*) e TCF (*T-cell factor*) a partir do deslocamento do complexo TLE/Groucho e recrutamento de co-ativadores modificadores de histonas. Esse processo leva a transcrição de genes envolvidos nos processos celulares citados anteriormente (Figura 6) (Zhan et al., 2016).

A via não-canônica apresenta um importante papel na migração, polaridade e manutenção celular. Essa via promove a ativação de pequenas GTPases Rac1, RhoA e Cdc42 que promovem o remodelamento do esqueleto celular necessário para processos de invasão e migração celular, assim como a regulação de JNK para regular alvos transcricionais adicionais (Sedgwick e D'Souza-Schorey, 2016).

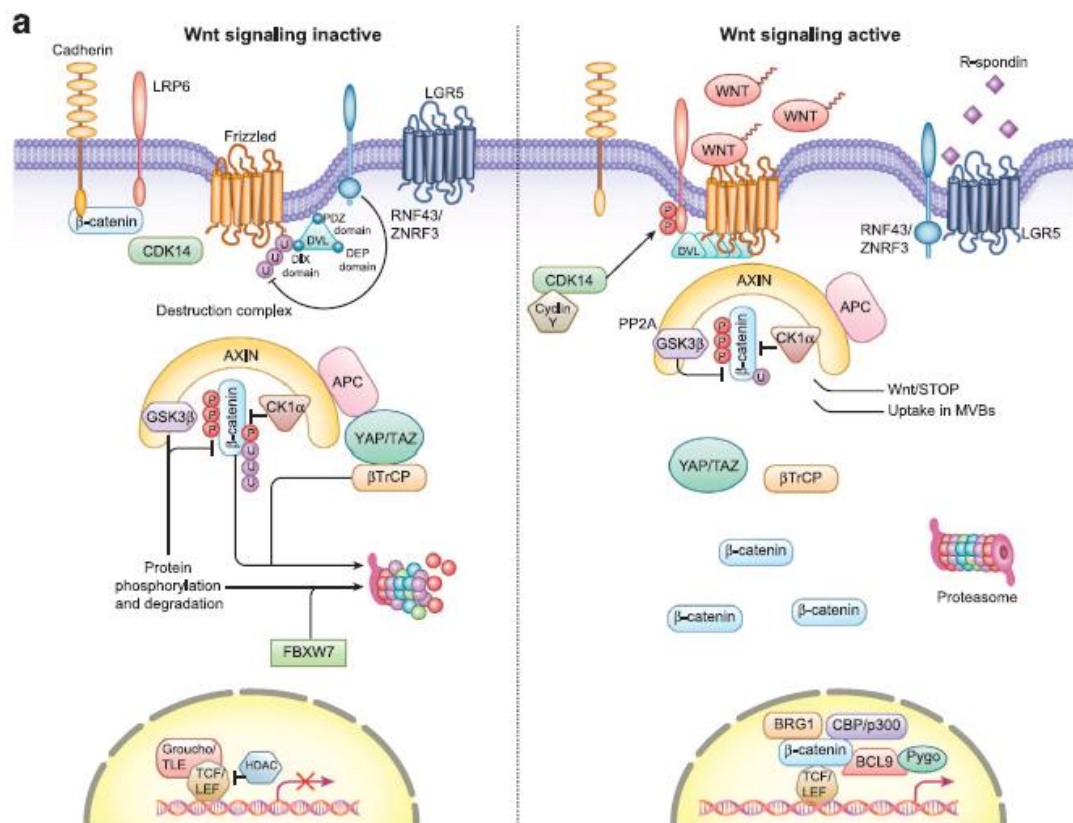


Figura 8. Via Wnt canônica inativada e ativada (Fonte: Zhan et al., 2016).

O impacto da via Wnt na carcinogênese colorretal já foi bastante estudado em diversos artigos publicados. No entanto, a perda de função do gene *APC* é o principal responsável pela sinalização da via Wnt no câncer colorretal (Zhan et al., 2016), como é possível observar nos estudos abaixo:

- A partir da edição genômica de APC utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, a carcinogênese colorretal pode ser mimetizada *ex vivo* em organoides humanos intestinais (Matano et al., 2015; Drost et al., 2015);
- Diferentes mutações em APC resultam em diferentes níveis de atividade da via Wnt. Além disso, essas mutações estão associadas a localização tumoral no intestino grosso (Christie et al., 2013; Buchert et al., 2010);
- Modelo utilizando camundongos *knockdown* reversível via shRNA, demonstrou que adenocarcinomas podem regredir a tecido normal, caso a função de APC seja restaurada (Dow et al., 2015).

3.3.2 TP53

O gene *TP53*, que codifica a proteína p53 com 53Kda, apresenta uma função crucial no ciclo celular e apoptose (Liu et al., 2015). Esse fator de transcrição, quando em condições normais, atua como um gene supressor tumoral (Lane et al., 2010). Sob sinal celular de estresse, como danos ao DNA e estresse oncogênico, o p53 é ativado a partir de uma cascata de eventos de fosforilação e outras modificações transduccionais, resultando na expressão de genes alvos envolvidos na interrupção do ciclo celular, reparo de DNA ou apoptose. Além disso, p53 também apresenta importantes funções no controle da senescência, anti-angiogênese, autofagia e metabolismo antioxidante (Figura 9) (Joerger et al., 2016).

Os níveis celulares de p53 em vertebrados estão estritamente controlados pelos seus reguladores negativos MDM2 e MDMX (também conhecido como MDM4) (Joerger et al., 2016). Essa regulação ocorre a partir do fato de que o MDM2, alvo de p53, funciona como uma ubiquitina ligase E3, a qual, juntamente com seu homólogo MDMX, ubiquitina p53, resulta na sua exportação para fora do núcleo e degradação proteossomal (Wade et al., 2013).

A proteína p53 é um supressor tumoral e está geralmente inativado em quase todos os tumores, devido às mutações no seu gene ou na desregulação de vias associadas a ele (Joerger et al., 2016). Diversas evidências sugerem que a via p53 está frequentemente desregulado na progressão do CRC e sua sinalização aberrante está associada com um prognóstico reservado da doença (Liu et al., 2013).

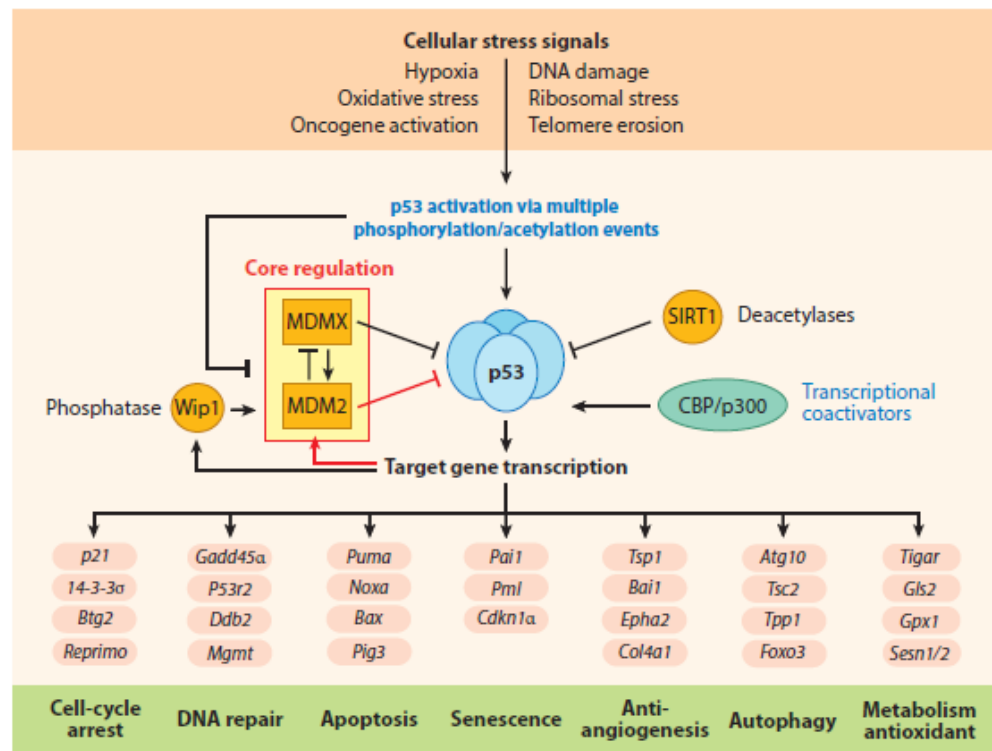


Figura 9. Via do p53 e seus genes alvos. (Fonte: Joerger et al., 2016).

Mutações em TP53 ou alterações conformacionais na proteína p53 leva não apenas a perda de sua função supressora, mas também ao ganho de função facilita a progressão maligna (Solomon et al., 2011). No CRC, mutações em p53 ocorrem em 34% nos tumores do cólon proximal e em 45% dos tumores de cólon distal e reto (Ryan et al., 2001). O comportamento biológico do CRC como, a invasividade, local de metástase e até mesmo o prognóstico do paciente, podem ser determinados pelas diferentes mutações em p53 (Li et al., 2015). Pacientes com p53 mutante apresentam maior quimio-resistência e tem um pior prognóstico quando comparado com aqueles que apresentam o p53 selvagem (Iacopetta et al., 2003).

Diversos estudos demonstraram que o p53 mutante está envolvido em quase todos os eventos da tumorigênese, como revisado por Hannahan e Weinberg (2011). Por conta disso, é um alvo promissor na terapia do câncer (Solomon et al., 2011) (Figura 10).

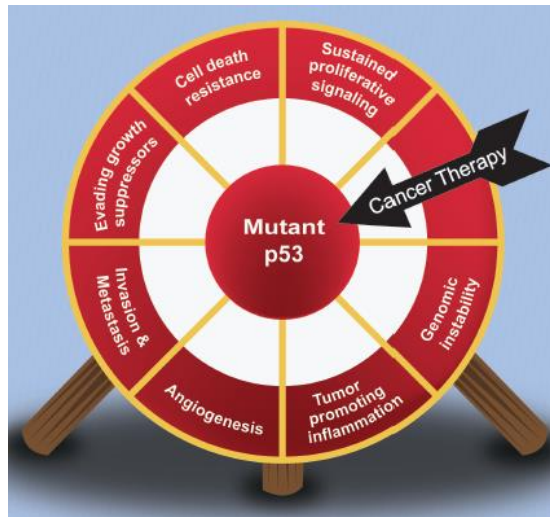


Figura 10. *Ganhos de função do p53 mutante interagem com os “hallmarks” do câncer.* (Fonte: Solomon et al., 2011).

Em 1994, foi demonstrado pela primeira vez a apoptose dependente de p53 em camundongos. Esse estudo mostrou a resposta terapêutica em tumores de camundongos imunossuprimidos expressando ou não o gene p53. Foi visto que tumores expressando o p53 continham uma maior proporção de células apoptóticas e tinham seu desenvolvimento reduzido após o tratamento com radiação gama ou adiamicina. Em contraste, os animais deficientes em p53 e tratados da mesma maneira continuaram a apresentar crescimento tumoral e continham poucas células apoptóticas (Lowe et al., 1994). O resultado desse trabalho sugere que a estimulação prévia da atividade de p53 pode aumentar a eficácia da terapia do câncer relacionada ao dano ao DNA pelo aumento da taxa de apoptose (Vazquez et al., 2008).

Desde então, diversos estudos para a identificação e desenvolvimento de agentes capazes de reativar a via do p53 tem sido realizados. Esses agentes podem introduzir o p53 selvagem, estabilizar o p53 e reativar o p53 mutante em células cancerígenas (Vazquez et al., 2008) (Figura 11).

Quanto aos agentes que agem na atividade do p53, eles podem ser de dois tipos: **1. Restauração da atividade de p53 selvagem**, que pode ser com o uso de adenovírus recombinantes codificando p53 ou a partir da reativação do p53 mutante; **2. Estabilização de p53**, a partir da inibição da interação MDM2-p53 ou por um inibidor da ligase MDM2 E3. A maior parte dos agentes do tipo 1 já estão na fase 1-3 de desenvolvimento de medicamentos (Advexin e SCH 58500), sendo que um deles

já foi aprovado na China (Gendicine). Os do tipo 2, como Nutlins, Benzodiazepines, RITA, Spiro-oxindoles, Quinolinols, HL198C, estão em fase pré-clínica.

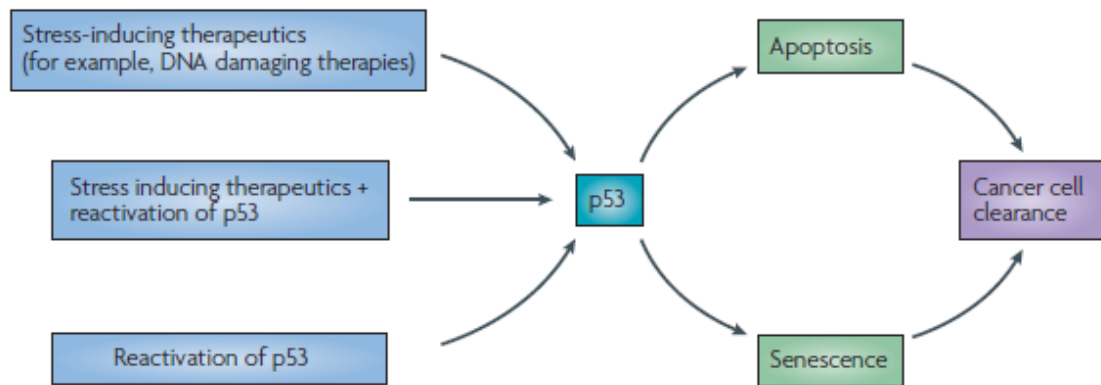


Figura 11. *Terapia do câncer.* Estudos sugerem que o aumento ou reativação da atividade de p53 em células cancerígenas, em combinação ou não com terapias indutoras de estresse, podem aumentar a eficácia dessas terapias (Fonte: Adaptado de Vazquez et al., 2008).

3.4 Regulação epigenética do CRC

Epigenética pode ser definida como alterações hereditárias na expressão gênica que não são acompanhadas de mudanças na sequência do DNA (Migliore et al., 2011; Cóppe, 2014). Essas alterações podem ocorrer de 3 formas: 1. Metilação do DNA; 2. Modificação pós-transcricionais das histonas; e 3. RNA não-codificantes. Nos tópicos abaixo, a influência de cada uma delas no CRC será discutida.

3.4.1 Metilação do DNA

A metilação de DNA refere-se à adição enzimática do grupo metil na posição 5' da citosina pelas DNA metiltransferases (DNMTs) (Bardhan e Liu, 2013). Essa metilação pode ser de duas formas: 1. Hipermetilação e 2. Hipometilação (Figura 12).

Embora diversos estudos tenham demonstrado o perfil hipermetilado do CRC, um grupo específico de CRC, conhecido como CIMP, apresenta um extenso nível de genes metilados. Tumores desse tipo apresentam um fenótipo caracterizado pelas ilhas CpG, no qual há uma alta frequência de hipermetilação no DNA de genes específicos (Migheli e Migliore, 2012; Muller et al., 2016). Geralmente, tumores CIMP

estão relacionados com a metilação de cinco genes principais: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* e *SOCS1* (Weisenber et al., 2006).

A principal característica da hipermetilação para o CRC e diversos outros tipos de câncer é o fato de que a alta densidade de citosina metilada nas ilhas CpG de genes supressores de tumor promove o completo bloqueio da transcrição, inativando esse grupo de genes (Migheli e Migliore, 2012).

Ainda sobre o processo de carcinogênese de cólon, os tumores do tipo MSI resultam da inativação de genes de reparo de DNA (MMR) a partir da hipermetilação ou mutação nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Essa hipermetilação leva ao acúmulo de erros da replicação em sequências repetidas de microssatélites; sequências essas que podem estar localizadas em exons de importantes genes supressores tumorais (Okugawa et al., 2015).

Além da hipermetilação de genes supressores tumores, pode ocorrer também a hipometilação global de genes que pode contribuir para a progressão do processo de carcinogênese (Okugawa et al., 2015). A hipometilação global geralmente ocorre dentro de elementos de DNA transponíveis repetitivos, como LINE-1 (Okugawa et al., 2015). A hipometilação de LINE-1 está associada com um pior prognóstico do paciente (Ogino et al., 2008), pois pode estar envolvida na expressão descontrolada de proto-oncogenes (Wolf et al., 2010). Isso implica que a hipometilação apresenta um papel crucial na formação do CRC (Stachler et al., 2015).

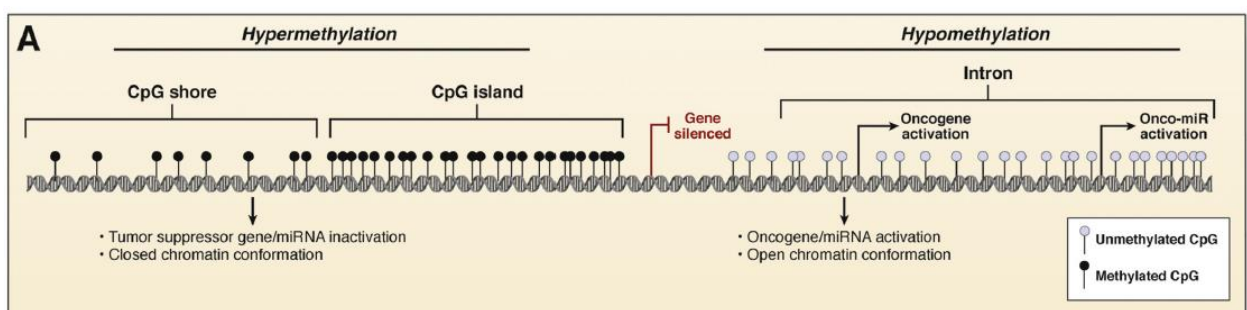


Figura 12. Ilustração demonstrando os processos de hipermetilação e hipometilação. (Fonte: Okugawa et al., 2015).

3.4.2 Modificações pós-transcricionais das histonas

O DNA das células eucarióticas é encontrado na cromatina, um complexo de macromoléculas consistindo de DNA, RNA e proteínas histônicas e não histônicas. As

funções da cromatina são: 1. Facilitar a compactação do DNA; 2. Reforçar a macromolécula do DNA durante a mitose; 3. Proteger contra o dano ao DNA; e 4. Controlar a expressão gênica e replicação do DNA (Okugawa et al., 2015). A cromatina pode existir em dois estados: 1. Inativo, conhecida como heterocromatina; e 2. Ativo, não-condensado e transcricionalmente ativo (eucromatina) (Figura 13). O nucleossomo representa a unidade estrutural e funcional da cromatina e consiste de aproximadamente 147 bases de DNA envoltas por octâmeros de histonas, consistindo em duas cópias de cada tipo: H2A, H2B, H3, H4. Os nucleossomos são conectados por trechos de DNA pelas histonas ligadoras (H1), envolvidas na compactação do DNA (Migheli e Migliore, 2012). Portanto, alterações pós transcricionais das histonas podem regular a acessibilidade da cromatina (Gezer e Holdenrieder, 2014) e, dentre essas modificações epigenéticas das histonas, pode-se citar: a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação (Migheli e Migliore, 2012).

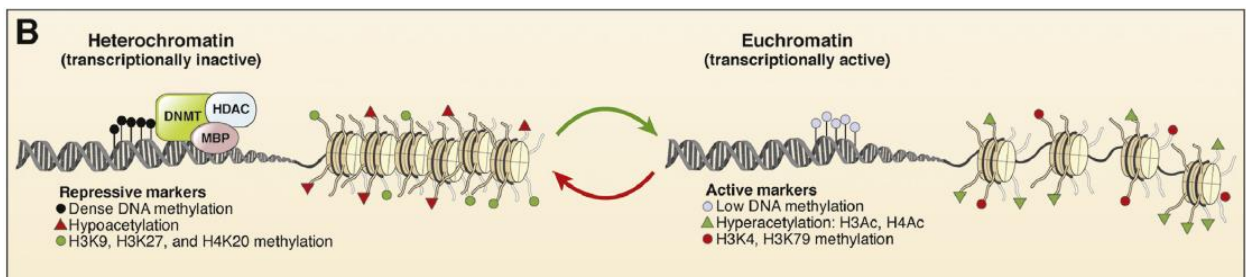


Figura 13. Estrutura ativa e inativa da cromatina. (Fonte: Akugawa et al., 2015)

Com relação ao CRC, diversos estudos já revelaram que a desregulação da modificação de histonas provavelmente altera os padrões de expressão gênica em CRC e são de grande importância para sua progressão (Okugawa et al., 2015). Por exemplo, a trimetilação da histona 3 no resíduo de lisina 9 (H3K9m3) apresentou-se maior em regiões invasivas de tumores de CRC e foi relacionada com metástase para linfonodos (Yokogawa et al., 2013). Já os baixos níveis da dimetilação da histona 3 no resíduo de lisina 9 (H3K9m2) estão relacionados com a baixa taxa de sobrevivência e pode ser utilizado como um fator prognóstico para pacientes com CRC (Tamagawa et al., 2013).

3.4.3 RNA não-codificantes (ncRNAs)

De acordo com o ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements Consortium), aproximadamente 80% do genoma é transcrito em RNA não codificantes (ncRNA)

(ENCODE, 2012). Apesar de terem sido considerado “lixo genômico” por muitos anos, recentemente foi demonstrado sua participação em diversos eventos biológicos, incluindo o silenciamento de genes a partir da remodelação da cromatina, reorganização nuclear e formação de um domínio de silenciamento (Saxena et al., 2011). Além disso, os ncRNA podem ser classificados de duas formas de acordo com o tamanho: 1. Pequenos ncRNAs, com <200 nt, representado pelos microRNAs (miRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNA) e pequenos RNAs nucleares (snoRNA); e 2. Longos ncRNA (lncRNAs), com >200nt (Okugawa et al., 2015).

Embora o modelo de Volgestein seja bastante aceito na explicação do processo de desenvolvimento de CRC e apesar de ter ocorrido um considerado progresso na pesquisa médica e clínica, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo de ação dos ncRNAs na patogênese do CRC (Kita et al, 2016).

A principal classe de ncRNA estudada é a dos miRNAs. Os micro-RNAs (miRNAs), pequenos RNAs não-codificantes, atuam na regulação da expressão gênica de maneira pós-transcricional, possuindo, assim, papéis fundamentais na coordenação de importantes processos biológicos nos seres vivos, incluindo, diferenciação, proliferação e crescimento celular, apoptose, entre outros (Esteller, 2011). Estima-se que a expressão de mais de um terço dos genes humanos seja regulada por miRNAs (Zhang et al., 2015). Em contraste, processos patológicos no cólon, incluindo a inflamação crônica e a carcinogênese, estão relacionados com a expressão alterada de diversos miRNAs (Esteller, 2011).

Já os lncRNAs e suas funções ainda não foram bem identificadas, devido à grande heterogeneidade dessas moléculas. Apesar de serem reconhecidas como RNAs maiores que 200 nt, essa definição é arbitrária e não foi baseada na sua funcionalidade (Kita et al., 2016).

3.4.3.1 miRNAS no CRC

- **Ativação da via Wnt**

Como descrito anteriormente, a via WNT é de extrema importância para o desenvolvimento do CRC. Diversos miRNAs se mostraram importantes para a ativação dessa via. O miR-135 a/b, por exemplo, atua como um regulador negativo do gene APC, levando a redução da expressão desse gene e consequente ativação da via WNT (Clevers et al., 2014). Além disso, esse miRNA também já foi descrito no

câncer de cólon associado com a doença inflamatória intestinal e está associado ao estágio tumoral e evolução clínica comprometida (Attard et al., 2004).

- **Ativação da via EGFR**

Estudo *in vitro* realizou a transfecção do anti-miR-143 em células LoVo (células humanas de cólon) e observou que houve uma hiper-regulação da proteína KRAS e redução da proliferação celular (Chen et al., 2003). Esse miR, juntamente com o miR-145, ambos localizados no cromossomo 5, foram considerados como miRNAs supressores tumorais, por se apresentarem hiporregulados no CRC (Akao et al., 2006). Além desses, o let-7a preveniu a tradução de KRAS, levando a inibição do crescimento celular (Chen et al., 2003).

- **Via do p53**

Estudo da análise de sequência utilizando ferramentas de bioinformática propõe que mais de 46% dos miRNAs apresentam locais de ligação para o p53 (Ragusa et al., 2012). Uma das famílias de miRNAs mais estudadas que apresenta associação com o p53 é a família miR-34. Essa família é conhecida por ser indutora de p53 em diversos tipos de câncer, incluindo o CRC (Biegging et al., 2014). O miR-34a ativa p53 a partir de sua ação sobre o gene SIRT1, o principal regulador de p53, propondo, dessa forma, um feedback positivo entre miR-24a e TP53 (Tarasov et al., 2012; Mansoori et al., 2015).

4. Carcinogênese de cólon associado à colite

A doença inflamatória intestinal (DII), representada pela doença de Chron (CD) e a Colite Ulcerativa (CU), é caracterizada por uma inflamação crônica no trato gastrointestinal, sendo esta responsável pelo aumento do risco do câncer de cólon associado à colite (CAC) (Kanneganti et al., 2011). A incidência desse tipo de câncer representa cerca de 1% dos casos de câncer de cólon (Prior et al., 1982) e, embora a etiologia da DII seja desconhecida, a resposta imune da mucosa pode surgir devido à interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais (Herszényi et al., 2015). Essa resposta imune faz com que ocorra uma produção exacerbada de mediadores inflamatórios, como enzimas proteolíticas, citocinas, espécies reativas de oxigênio e fatores de crescimento envolvidos no processo de injúria tecidual e regeneração (Herszényi et al., 2015) (Figura 14).

Cólicas abdominais, diarreia, sangramento retal e perda de peso são alguns dos sintomas causados pela DII. Apesar de apresentarem sintomas semelhantes, a CU e DC apresentam algumas diferenças quanto ao padrão de inflamação e histopatologia da doença. Enquanto que a CU é uma inflamação restrita ao cólon, a DC pode ocorrer em qualquer região do trato gastrointestinal (TGI). Quanto a histologia, a DC é uma inflamação transmural e muitas vezes granulomatosa; já a CU afeta apenas as camadas da mucosa e submucosa do intestino. Com relação a histopatologia, em ambas é observado edema, perda de células caliciformes, hiperplasia da criptas e ulcerações (Neurath, 2012).

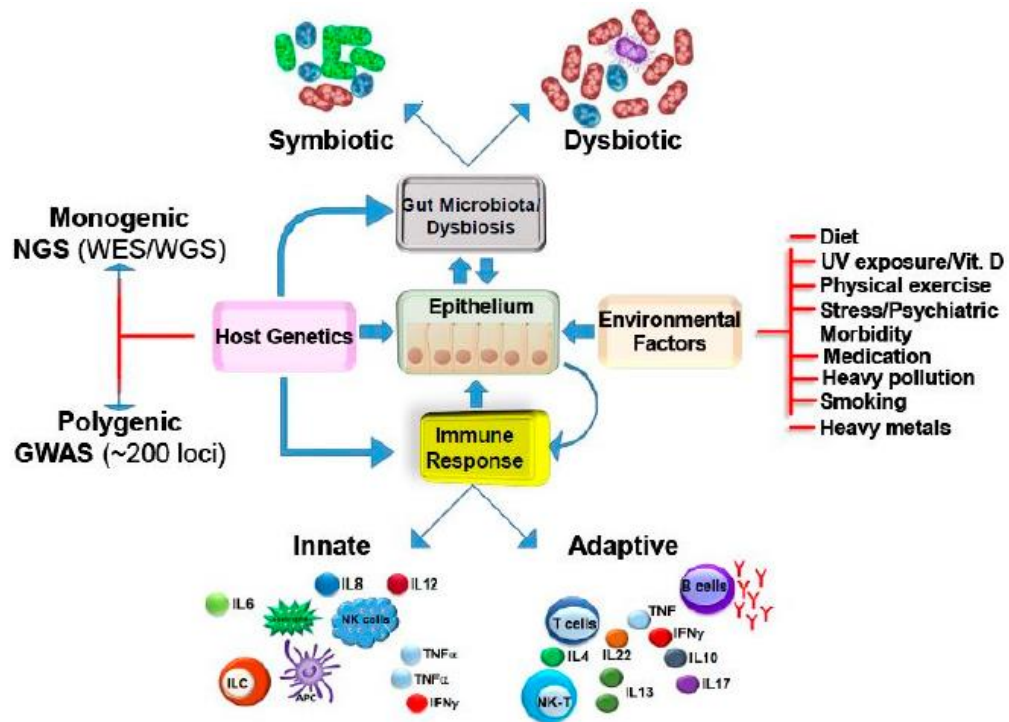


Figura 14. *Doença Inflamatória Intestinal.* Microbiota intestinal, fatores ambientais e resposta imune, juntamente com a predisposição genética do paciente ditam a patogênese da DII. O epitélio intestinal interage diretamente com os fatores causadores da patogênese da DII, como fatores ambientais, genéticos e imunes e composição da microbiota. Ambas as respostas imune inata e adaptativa apresentam uma perturbação da homeostase intestinal. Surtos das doenças têm sido associados a fatores ambientais, como o uso de antibióticos e NSAIDs, estresse e tabagismo. Estes fatores ou infecções alteram a função da barreira epitelial, levando à perda de tolerância imune aos antígenos intestinais. A genética do paciente pode influenciar a composição microbiana do intestino ou a resposta imunitária de afetar a patogênese da doença (Adaptado de Ahmed et al., 2016).

A inflamação não tem um papel decisivo no desenvolvimento do câncer de cólon esporádico (CRC). No entanto, em pacientes com CAC, a DII é detectável muitas décadas antes do desenvolvimento de tumores, demonstrando sua relação direta com a tumorigênese. Ademais, o risco de CAC está diretamente relacionado com a severidade e longevidade da doença (Grivennikov, 2013). Estudos clínicos já demonstraram essa relação de risco, podendo este chegar a ser 2-8 vezes maior para pacientes com DII quando comparados a pacientes saudáveis (Clapper et al., 2007). A CU, por exemplo, aumenta o risco de desenvolver câncer de cólon associado à

colite em 18-20%, enquanto que a DC aumenta o risco em 8% após 30 anos de doença ativa (Rubin et al., 2012; Eaden et al, 2001).

A CAC apresenta uma sequência de eventos moleculares que a diferencia da CRC e, dessa forma, pode afetar a busca de alvos moleculares quimiopreventivos específico para cada doença. Embora existam similaridades entre as duas, uma das principais diferenças moleculares entre os dois tipos de neoplasias está relacionado ao momento em que as mutações em determinados genes ocorrem (Clapper et al., 2007). A mutação no gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) ocorre principalmente no início da CRC, ao contrário do que é visto na CAC, na qual a mutação desse gene só é vista em momentos tardios do processo (em displasias de alto grau e cânceres) (Fogt et al., 1998). Já a mutação ou perda de heterozigossidade de *p53* e mutação em *K-Ras*, por exemplo, são vistas frequentemente na mucosa inflamada e displásica, ou seja, em etapas iniciais do processo, ao contrário do visto em CRC (adenomas e adenocarcinoma) (Hussain et al., 2000; Foersh et al., 2012) (Figura 15).

Além das alterações genômicas e do estresse oxidativo causado pela inflamação, citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de transcrição inflamatórios também têm grande influência no processo de CAC, principalmente em modelos animais que utilizam AOM/DSS (azoximetano/ sulfato de sódio dextran) (Foersch et al., 2012).

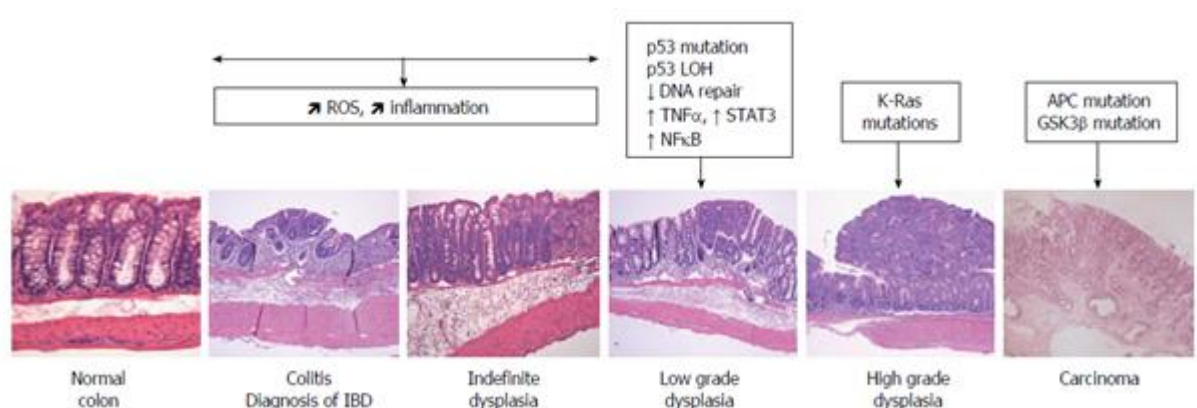


Figura 15. Progressão da carcinogênese de cólon associada à colite (CAC). A CAC se desenvolve a partir da sequência colite-displasia-carcinoma associado com o desenvolvimento da inflamação, displasia de baixo e alto grau e, eventualmente, carcinoma, devido a alterações moleculares. IBD, doença inflamatória intestinal; ROS, espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Van Der Kraak et al., 2015).

Outro fator relevante para o desenvolvimento de CAC é a microbiota intestinal, visto que podem apresentar funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (Grivennikov, 2013). As conclusões preliminares que existem foram tiradas a partir de estudos com animais infectados experimentalmente, os quais tem mostrado que componentes patogênicos e/ou comensais da microbiota intestinal tem um papel decisivo na patofisiologia da DII podendo, em certos casos, serem promovidos pela predisposição genética do paciente devido a deficiência imunológica (Nell et al., 2010).

Apesar da incidência dessa doença ser maior em regiões mais desenvolvidas do mundo (América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia), a partir do início do século 21, observou-se um aumento na incidência em países em desenvolvimento (países da Ásia, América do Sul e Oriente Médio) (Kaplan, 2015). A epidemiologia da DII no Brasil é muito pouco conhecida, porém, um estudo realizado no Centro-Oeste Paulista, demonstrou que a incidência de DII foi de 1 em cada 100.000 habitantes entre 1986 e 1990. Enquanto que entre 2001 e 2005, a incidência da colite ulcerativa e doença de Chron aumentou para 4,5 e 3,5 em cada 100.000 habitantes, respectivamente (Victoria et al., 2009). Devido ao risco eminente de desenvolvimento do câncer de cólon nesses pacientes, diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm sido utilizados para elucidar essa relação e buscar formas de reduzir o risco de desenvolvimento de CAC.

5. Modelos animais de carcinogênese química de cólon

5.1 Modelo de câncer de cólon esporádico (CRC)

Diversos modelos de carcinogênese de cólon foram desenvolvidos com o objetivo de se estudar a influência de fatores ambientais e da dieta, as opções terapêuticas e a quimioprevenção com substâncias naturais ou sintéticas. Por exemplo, o uso de animais geneticamente modificados é uma opção promissora para se estudar casos de câncer hereditário, como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Síndrome Hereditária Não-Poliposa Familiar (HNPCC), as quais apresentam mutações em genes específicos. Diversas linhagens de camundongos com mutações em diferentes códons de *APC* e em genes de reparo de DNA, como o *Mlh1*, já foram desenvolvidas (Femia e Caderni, 2008; Perse e Cerar, 2011).

Além do modelo que se utiliza de animais geneticamente modificados, existe também o modelo de indução química, o qual se utiliza de carcinógenos específicos para a indução de lesões pré-neoplásicas que levam ao câncer. Na indução da carcinogênese química de cólon, pode-se usar: 1. metilazoximetanaol (MAM), 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e azoximetano (AOM); 2. aminas heterocíclicas (HCAs), como o [4,5,b] piridina 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol (PhIP); 3. aminas aromáticas, 3,2'-dimetil-4-aminofenil (DMAB); e os 4. alquinitrosamidas, como a metilnitrosourea (MNU) (Tong et al., 2011). Dentre todas essas, as mais comumente utilizadas são a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o seu metabólito, o azoximetano (AOM), devido ao baixo custo, maior eficácia e uso mais conveniente (Perse e Cerar, 2011).

A DMH e o AOM são carcinógenos indiretos, pois precisam de ativação metabólica para se formar o íon metildiazônio ativo, uma espécie alquilante altamente reativa às bases do DNA. (Sohn et al., 2001; Perse e Cerar, 2011). O metabolismo desses compostos envolve a ação de múltiplas enzimas metabolizadoras de xenobióticos (Rosenberg et al., 2009) (Figura 16).

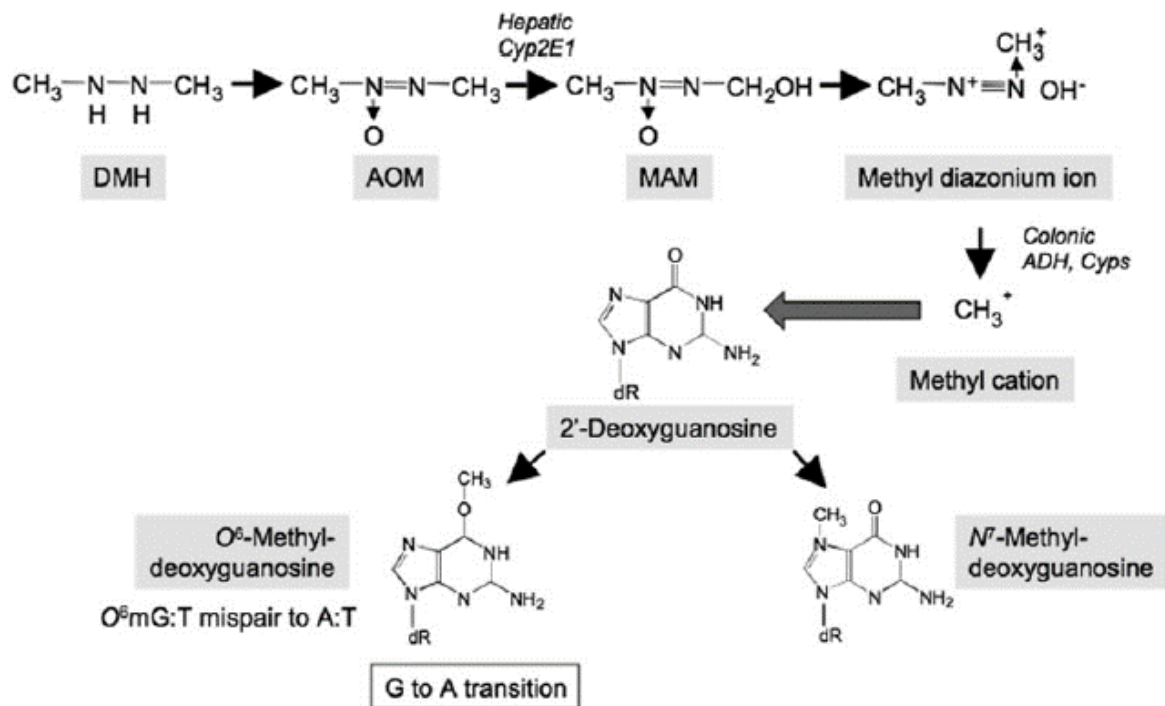


Figura 16. Metabolismo do DMH. Esse metabolismo envolve a ação de múltiplas enzimas metabolizadoras de xenobióticos reguladas transcricionalmente (Rosenberg et al., 2009)

No fígado, a DMH passa pelo processo de N-oxidação e forma o AOM, o qual, após hiroxilação, leva a formação do metilazoximetanol (MAM). MAM é um composto instável e com meia vida de aproximadamente 12h. No cólon, ele se decompõe e forma o formaldeído e o íon metildiazônio, altamente reativo, capaz de alquilar bases de DNA, resultando na formação de adutos de DNA, como a O₆-metilguanina e N₇-metilguanina. Dentre essas, O₆-metilguanina é a que mais contribui para a carcinogênese de cólon, a partir da indução a mutações em oncogenes e iniciação da tumorigênese (Rosenber et al., 2009; Megaraj et al., 2014).

Apesar de a maioria dos estudos colocar o fígado como o metabolizador central nesse processo, a ideia de que a metabolização do DMH e seus metabólitos ocorrem também no cólon data da década de 80 a partir de estudos *in vitro* (Auturp et al., 1980; Newaz et al., 1983; Oravec et al., 1986). O estudo de Megaraj e colaboradores (2014) conseguiu demonstrar que a carcinogênese de cólon induzida pelo AOM é resultado da metabolização dessa droga por enzimas tanto do fígado quanto do cólon (Megaraj et al., 2014).

De forma geral, esses modelos (DMH e AOM) permitem a observação de diversas características importantes para o CRC esporádico tais como: a resposta a agentes promotores e preventivos (Femia e Caderni, 2008; Perse e Cerar, 2011), a ativação da via Wnt, as mutações nos genes *APC* e *K-RAS* e, principalmente, o desenvolvimento de lesões especificamente no cólon (Femia et al., 2010). Além disso, os padrões histológicos de tumores e a síntese de mucina no cólon são semelhantes, tanto em roedores quanto em humanos (Tanaka, 2009).

No entanto, algumas diferenças também são observadas na comparação entre os modelos murinos e as ocorrências observáveis em seres humanos. Como exemplo, pode-se citar o desenvolvimento da sequência adenoma-adenocarcinoma a partir de pólipos benignos em humanos. No caso de roedores, essa sequência não é observada, visto que os tumores se desenvolvem a partir da mucosa lisa (Maskens, 1981). Porém, eventualmente, há também o desenvolvimento de adenomas (Sunter et al; 1978), o que faz com que esse modelo sustente a ideia da progressão adenoma-adenocarcinoma (Tanaka, 2009). Outro ponto que diferencia a carcinogênese de cólon humana da carcinogênese de roedores é o fato de as metástases humanas serem linfáticas (50%) e hematogênicas (33%). Já em roedores, a ocorrência de metástase é baixa, sendo observada na região linfática e peritoneal (Tanaka, 2009).

A utilização desses dois carcinógenos permite o desenvolvimento de modelos tumorais de forma similar ao CRC esporádico em humanos (Femia e Caderni, 2008). Por conta desse fato, esses modelos tornam-se ferramentas importantes para identificação e avaliação do potencial quimiopreventivo de diversos compostos naturais e sintéticos (Sohn et al., 2001).

5.1.2 Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Biomarcadores relacionados ao câncer podem ser definidos como aqueles que apresentam características fenotípicas ou genotípicas que se alteram durante a carcinogênese e/ou durante a resposta a algum agente quimiopreventivo ou intervenção terapêutica (Das et al., 2007). Dessa forma, lesões pré-neoplásicas podem ser utilizadas como biomarcadores para avaliar o desenvolvimento do câncer de cólon ou identificar moduladores da carcinogênese em estudo de curto ou médio prazo (Bird, 1987).

Os focos de criptas aberrantes (FCAs) foram inicialmente descritos por Bird (1987) e sua presença está principalmente associada com o câncer de cólon. Os focos de criptas aberrantes (FCA) são lesões precoces, caracterizadas por agrupamentos de células epiteliais alteradas da mucosa que representam criptas intestinais com paredes mais amplas e espessas (hiperplasia) do que as criptas intestinais normais e que podem progredir para pólipos, seguidos de adenomas e adenocarcinomas (Cappell, 2008).

Essas lesões foram inicialmente observadas no cólon de roedores tratado com agentes químicos para a carcinogênese de cólon e, posteriormente, em pacientes de alto risco para câncer esporádico e hereditário (Renahan et al., 2002). Por conta dessa característica, muitos estudos têm considerado os FCA como sendo lesões pré-neoplásicas precursoras do desenvolvimento da neoplasia de cólon em roedores e humanos (Bird, 1987; Pretlow et al., 1991; Worthley et al., 2007) (Figura 17).

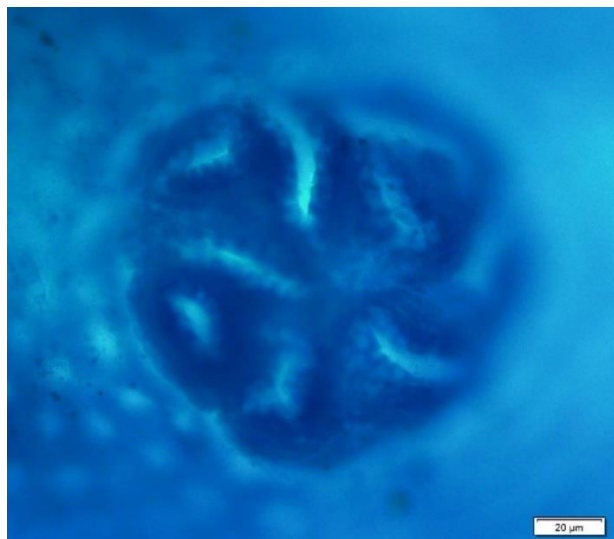


Figura 17. *Foco de Cripta Aberrante (FCA) com nove criptas aberrantes.*

Os FCA podem ser identificados microscopicamente na superfície da mucosa do cólon após a coloração com azul de metileno (Bird, 1987; Aroc et al., 2010; Perse e Serar, 2011). Em humanos, elas podem ser identificadas pela colonoscopia de alta resolução (Alwari et al., 2006). São utilizadas como biomarcadores potenciais para detecção de fatores de risco e de proteção que influenciam a carcinogênese de cólon em ratos e camundongos iniciados com carcinógenos químicos específicos (Colpert e Pierre, 2005). Portanto, a análise de FCA e de tumores colônicos se tornaram

ferramentas importantes em estudos de quimioprevenção, tendo sido utilizados em diferentes estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Dias et al., 2006, 2010; de Moura et al., 2012; da Silva et al., 2013; Fragoso et al., 2013; Romualdo et al., 2015).

5.2 Carcinogênese química de cólon associado à colite

Mesmo com todos os esforços para a melhora no monitoramento e tratamento da doença inflamatória intestinal (DII), a eficácia dos mesmos ainda é bastante controversa (Rutter et al., 2006). Limitações na prática clínica demonstram a importância da necessidade de intervenções quimiopreventivas em pacientes com Doença de Chron (DC) e Colite Ulcerativa (CU) (Clapper et al., 2007). Dessa forma, a busca por modelos experimentais confiáveis, reproduzíveis e clinicamente relevantes aos humanos e que mimetizem a DII são de extrema importância para o entendimento da progressão da doença e para a busca de novas estratégias de inibição tumoral (Clapper et al., 2007). Atualmente existem diversos modelos experimentais disponíveis para DII, sendo classificados de acordo com a maneira de indução da doença (Clapper et al., 2007; Neurath, 2012).

O modelo classificado como espontâneo apresenta mutações em genes específicos que causam a inflamação crônica do intestino, como no usado no sagui cabeça de algodão (*cotton-top tamarin*). O modelo de transferência de células T (CD4+ ou CD8+), altamente reproduzível, é feito em animais imunocomprometidos e é ideal para entender a inflamação intestinal crônica dependente de células T. Há também os modelos genéticos que utilizam animais transgênicos ou *knockout* e são usados para avaliar o desenvolvimento da inflamação intestinal e estudar intervenções terapêuticas (camundongos IL-7 e STAT4 transgênicos e IL-10 *knockout*) (Neurath, 2012).

Já o modelo de indução química da colite utiliza substâncias como o DSS (sulfato de sódio dextran), TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) e oxazolona (Neurath 2012, Thaker et al, 2012; Clapper et al., 2007). O TNBS exhibe resposta imunológica Th1; a oxazolona, Th2; e o DSS, induz mudanças no perfil de citocinas Th1/Th2 (Randhawa et al., 2014). O uso desses compostos isoladamente necessita de um tempo maior para se observar a formação de tumores (Clapper et al., 2007).

Dessa forma, são geralmente utilizados em associação com carcinógenos químicos, como o azoximetano (AOM) e 1,2-dimetilhidrazina (DMH) para reduzir o tempo e o custo dos experimentos.

Dentre esses compostos, um dos mais utilizados é o modelo com DSS (Suzuki et al., 2006; Neufert et al., 2007; Tanaka et al., 2008), devido ao fato de induzir o aparecimento de diversas características fenotípicas relevantes para a colite ulcerativa (Clapper et al., 2007). Esse modelo foi inicialmente descrito por Okusa e colaboradores (1985) e adaptado por Okayasu e colaboradores (1990) e Clapper e colaboradores (2007). Okayasu e colaboradores (1990) observaram que o tratamento com DSS causa mudanças inflamatórias na mucosa do cólon, resultado da disfunção de macrófagos, alteração na microbiota e efeitos tóxicos no epitélio.

Geralmente, a CAC é induzida por uma injeção peritoneal ou subcutâneas de AOM (7,4-10 mg/kg) seguido de ciclos de DSS (Clapper et al., 2007; Tanaka et al., 2003). O DSS é diluído em água em concentrações que variam de 1-5% e seu tratamento é seguido por intervalos de tratamento com água não tratada (1 ciclo = 3-7 dias de DSS seguidos de água de beber não tratada, totalizando 21 dias) (Tanaka et al., 2003; Clapper et al., 2007).

Um estudo realizado por Suzuki e colaboradores (2006) analisou as diferenças entre as diferentes linhagens de camundongos submetidos ao modelo de CAC utilizando o modelo de AOM/DSS. Eles observaram que algumas linhagens se apresentaram mais resistentes (C3H/HeN e DBA/2N) ao modelo que outras (Balb/c e C57BL/6N).

Como todos os CRC, incluindo CAC, desenvolvem-se partir da exposição crônica a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, uma dose única e baixa do carcinógeno AOM é necessária para a iniciação seguido dos ciclos de DSS para a obtenção de neoplasias ao final de 20 semanas (Tanaka et al, 2003). O motivo pelo qual não se usa uma alta dose de AOM é porque no modelo de AOM/DSS, a intenção é se obter tumores provenientes apenas da inflamação. O AOM é usado para acelerar o processo, iniciando o dano ao DNA. Como as linhagens de animais também podem influenciar na resistência ou susceptibilidade ao modelo (Suzuki et al.,2006), sugere-se o desenvolvimento de um experimento piloto para adequar a dose de AOM e a

concentração e número de ciclos de DSS para a linhagem escolhida (Clapper et al., 2007).

6. Hipótese do Trabalho

Considerando o crescente consumo da população brasileira de produtos alimentares contendo açaí e mediante os resultados promissores obtidos em estudos anteriores do grupo de pesquisa (Fragoso et al., 2013; Romualdo et al., 2015), decidiu-se analisar o efeito da ingestão da polpa de açaí liofilizada sobre o processo de carcinogênese de cólon acelerada pela colite química e o efeito da cianidida 3-rutinosídeo, porção polifenólica mais abundante na polpa em questão, em um estudo de motilidade celular com células de adenocarcinoma de cólon humano RKO. Diferentemente dos estudos anteriores, que utilizou a polpa de açaí *spray dried* (seca por aspersão), a polpa de açaí liofilizada foi utilizada por apresentar alto grau de pureza, ausência de compostos aditivos e por apresentar alto teor de antocianinas e maior teor catorenóides quando comparada com a polpa utilizada anteriormente.

Dessa forma, a hipótese desse trabalho é de que a ingestão da polpa de açaí, alimento funcional com propriedades antioxidantes, atuaria no controle do estresse oxidativo, levando a redução do desenvolvimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e de tumores no cólon no modelo de carcinogênese de cólon associado à colite. Além disso, a partir da restauração do equilíbrio oxidativo, genes envolvidos em proliferação, morte e diferenciação celular, angiogênese e capacidade de invasão seriam modulados quanto a sua expressão.

7. Referências

1. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(10):1397–421.
2. Ahmed I, Roy B, Khan S, Septer S, Umar S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms.* 2016;4(2):20.
3. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells, *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29(5):903– 906.
4. Aroch I, Kraus S, Naumov I, Ron E, Shapira S, Kazanov D, et al. Chemopreventive effects of Coltect, a novel dietary supplement, alone and in combination with 5-aminosalicylic acid in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Therap Adv Gastroenterol.* 2010;3(5):281–289.
5. Attard TM, Cuffari C, Tajouri T, Stoner JA, Eisenberg MT, Yardley JH, et al., Multicenter experience with upper gastrointestinal polyps in pediatric patients with familial adenomatous polyposis, *Am. J. Gastroenterol.* 2004;99:681–686.
6. Autrup, H., Harris, C. C., Schwartz, R. D., Trump, B. F., and Smith, L. Metabolism of 1, 2-dimethylhydrazine by cultured human colon. *Carcinogenesis.* 1980;1,375–380.
7. Bacolod MD, Barany F. Molecular profiling of colon tumors: the search for clinically relevant biomarkers of progression, prognosis, therapeutics, and predisposition. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(13):3694–700.
8. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers.* 2013;5(2):676–713.
9. Bieging KT, Melo SS, Attardi LD, Unravelling mechanisms of p53- mediated tumour suppression, *Nat. Rev. Cancer.* 2014;14(5):359–370.
10. Bird, RP. Observation and quantification of aberrant crypt foci in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Let.* 1987; 37:147-151.
11. Brito C, Stavroullakis AT, Ferreira AC, Li K, Oliveira T, Crasto GJ, et al. Extract of acai-berry inhibits osteoclast differentiation and activity. *Arch Oral Biol.* 2016;68:29–34.
12. Buchert M, Athineos D, Abud HE, Burke ZD, Faux MC, Samuel MS, et al. Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/beta-catenin pathway in vivo. *PLoS Genet.* 2010;6(1).
13. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008;37(1):1–24.
14. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, et al., Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis, *Oncogene.* 2009;28:1385– 1392.

15. Chin Y-W, Chai H-B, Keller WJ, Kinghorn a D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. *J Agric Food Chem*. 2008;56(17):7759–7764.
16. Choi YJ, Choi YJ, Kim N, Nam RH, Lee S, Lee HS, et al. Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane / Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. 2016;1–11.
17. Christie M, Jorissen RN, Mouradov D, Sakthianandeswaren a, Li S, Day F, et al. Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/ β -catenin signalling thresholds for tumourigenesis. *Oncogene*. 2013;32(39):4675–4682.
18. Clapper ML, Cooper HS, Chang W-CL. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(9):1450–1459.
19. Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*. 2014;346(6205):1248012.
20. CONAB: Açai (fruto) Período: 01 a 30/04/2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_09_11_55_19_conjuntura_de_acai_abr_-16-1.pdf>. Ano: 2016.
21. Coppedè F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation. *Cancer Lett*. 2014;342(2):238–247.
22. Córdova-Fraga T, De Araujo DB, Sanchez TA, Elias J, Carneiro AAO, Brandt-Oliveira R, et al. *Euterpe Oleracea* (Açai) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: Preliminary results. *Magn Reson Imaging*. 2004;22(3):389–393.
23. Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1911–1922.
24. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348–361.
25. da Silva FRM, Dias MC, Barbisan LF, Rodrigues MAM. Lack of protective effects of zinc gluconate against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 2013;65(4):571–577.
26. Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*. 2007;76(1):51–67.

27. Day A. J, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr.* 2007;86(S1):S105.
28. de Moura NA, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues M a M, et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(8):2902–2910.
29. de Moura RS, Pires KMP, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, et al. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):855–863.
30. Machado FS, Kuo J, Wohlenberg MF, da Rocha Fruscianta M, Freitas M, Oliveira AS, et al. Subchronic treatment with acai frozen pulp prevents the brain oxidative damage in rats with acute liver failure. *Metabolic Brain Disease*; 2016.
31. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira RDP, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2010;26(7–8):804–810.
32. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem.* 2004;52(6):1539–1545.
33. Dias MC, Spinardi-Barbisan a LT, Rodrigues M a M, de Camargo JL V, Terán E, Barbisan LF. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(6):877–884.
34. Dias MC, Vieiralves NFL, Gomes MIF V, Salvadori DMF, Rodrigues M a M, Barbisan LF. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(3):772–780.
35. Dias MM dos S, Noratto G, Martino HSD, Arbizu S, Peluzio M do CG, Talcott S, et al. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutr Cancer.* 2014;66(8):1394–1405.
36. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. 2015;161(7):1539–1552.
37. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature.* 2015;521(7550):43–47.
38. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001;48: 526–535.
39. Ensen GISJ, Ianli XWU, Atterson KEMP, Arnes JAB, Arter STGC, Cherwitz LAS, et al. In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich

- Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Crossover Study. 2008;(8):8326–8333.
40. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):861–874.
 41. Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Review.* 2014;2532(4):508–520.
 42. Fearon EF, Vogelstein B. for Colorectal Tumorigenesis. 1990;61:759–767.
 43. Feio C a, Izar MC, Ihara SS, Kasmah SH, Martins CM, Feio MN, et al. Euterpe oleracea (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(3):237–245.
 44. Femia A Pietro, Caderni G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med.* 2008;74(13):1602–1607.
 45. Femia A Pietro, Luceri C, Toti S, Giannini A, Dolara P, Caderni G. Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC Cancer.* 2010;10:194.
 46. Foersch S, Waldner MJ, Neurath MF. Colitis and colorectal cancer. *Dig Dis.* 2012;30(5):469–476.
 47. Fogt F, Vortmeyer AO, Goldman H, Giordano TJ, Merino MJ, Zhuang Z. Comparison of genetic alterations in colonic adenoma and ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol.* 1998;29(2):131–136.
 48. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) Intake. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012;67(3):235–241.
 49. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:68–76.
 50. Gezer U, Holdenrieder S. Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer. *In Vivo.* 2014;28(3):287–292.
 51. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
 52. Gordon A, Paula A, Cruz G, Maria L, Cabral C, Cordeiro S, et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chemistry.* 2012;133:256–263.
 53. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol.* 2013;35(2):229–244.

54. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991;66(3):589–600.
55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
56. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem*. 2005;53(8):2928–2935.
57. Herszényi L, Barabás L, Miheller P, Tulassay Z. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: the true impact of the risk. *Dig Dis*. 2015;33(1):52–57.
58. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
59. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, et al. Increased p53 Mutation Load in Noncancerous Colon Tissue from Ulcerative Colitis: A Cancer-prone Chronic Inflammatory Disease. *Cancer Res*. 2000;60:3333–3337.
60. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.
61. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):271–276.
62. INCA - Instituto Nacional do Câncer - Estatística sobre a incidência de câncer colorretal na população brasileira. Brasil, 2016 (http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5). Acessado em Outubro 2, 2016.
63. Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem*. 2016;375-404.
64. Johnson IT. Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(2):207–215.
65. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):310–324.
66. Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2011:342637.
67. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720–727.

68. Kelloff GJ, Schilsky RL, Alberts DS, Day RW, Guyton KZ, Pearce HL, et al. Colorectal adenomas: a prototype for the use of surrogate end points in the development of cancer prevention drugs. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3908–3918.
69. Kita Y, Yonemori K, Osako Y, Baba K, Mori S, Maemura K, et al. Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. *J Hum Genet [Internet].* Nature Publishing Group; 2016;1–7.
70. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(12):1–10.
71. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg.* 2002;89(7):845–860.
72. Lichtenthäler R, Rodrigues RB, Maia JGS, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutr.* 2005;56:53–64.
73. Liu X, Wilcken R, Joerger AC, Chuckowree IS, Amin J, et al. 2013. Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 41:6034–6044.
74. Lowe SW, Bodis S, Mcclatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. P53 Status and the Efficacy of Cancer-Therapy in-Vivo. *Science.* 1994;266(5186):807–810.
75. MacDonald BT, Tamai K and He X. NIH Public Access. *Dev Biol.* 2010;17(1):9–26.
76. Maskens AP, Dujardin-Loits RM. Kinetics of Tissue Proliferation in Colorectal Mucosa During Post-Natal Growth. *Cell Prolif.* 1981;14(5):467–477.
77. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.* 2015;21(3):256–262.
78. Matos P, Gonçalves V, Jordan P. Targeting the serrated pathway of colorectal cancer with mutation in BRAF. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2016;1866(1):51–63.
79. Megaraj V, Ding X, Fang C, Kovalchuk N, Zhu Y, Zhang Q-Y. Role of Hepatic and Intestinal P450 Enzymes in the Metabolic Activation of the Colon Carcinogen Azoxymethane in Mice. *Chem Res Toxicol.* 2014; 27(4):656-662.
80. Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia L a, Meibohm B, Talcott ST, et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 10;56(17):7796–802.
81. Migheli F, Migliore L. Epigenetics of colorectal cancer. *Clin Genet.* 2012;81(4):312–318.
82. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011:792362.

83. Moura RS De, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KMP, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012;19(3–4):262–269.
84. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469(2):125–134.
85. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond J a., Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330–337.
86. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(8):564–577.
87. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1998–2004.
88. Neurath MF. Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. *Dig Dis*. 2012:91–94.
89. Newaz, S., Fang, W. F., and Strobel, H. W. Metabolism of the carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine by isolated human colon microsomes and human colon tumor cells in culture. *Cancer*. 1983;52, 794–798.
90. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and change in intestinal microflora. *microflora*. *Jpn J Gastroenterol*. 1985;62:1327-1336.
91. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694–702.
92. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1204–1225e12.
93. Oliveira M do SP de, Carvalho JEU de, Nascimento WMO do, Müller CH. Cultivo do açazeiro para produção de frutos. *Circ Técnica, Embrapa Amaz Orient*. 2002;26(1):1.
94. Oravec, C. T., Jones, C. A., and Huberman, E. Activation of the colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine in a rat colon cell- mediated mutagenesis assay. *Cancer Res*. 1986;46, 5068–5071.
95. Pacheco-Palencia L a., Mertens-Talcott SU, Talcott ST. In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem*. 2010;119(3):1071–1078.

96. Pacheco-Palencia, L., Duncan, C. E., & Talcott, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry*. 2009;115, 1199–1205.
97. Paz M, Gúllon P, Barroso MF, Carvalho AP, Domingues VF, Gomes AM, et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chem*. 2015;172:462–468.
98. Pedrozo EÁ, Silva TN da, Sato SA da S, Oliveira NDA de. Produtos Florestais Não Madeiráveis (PFNMS): as Filières do Açai e da Castanha da Amazônia. *Rev Adm e Negócios da Amaz*. 2011;3(2):88–112.
99. Pereira RR, Cristina I, Emerich M, Ferreira J, Lage NN, Márcia J, et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart) Upregulates Paraoxonase-1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats. 2016;2016.
100. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AAS, Ferreira EL, Maia A, et al. Color Variation Assay of the Anthocyanins from Açai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential New Dye for Vitreoretinal Surgery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013 Oct;29(8):746-753.
101. Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2011:473964.
102. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, Ashton VVS, Riordan MAO, Pretlow TG, et al. Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic. *Cancer Research*. 1991;1564–1567.
103. Prior P, Gyde S, Allan RN. Mortality in ulcerative colitis: methods of analysis. *Gastroenterology*. 1982;83(1):36-43.
104. Queiroz JAL, Júnior NJM. Efeito do tamanho do recipiente sobre o desenvolvimento de mudas de açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Rev Bras Frutic*. 2001;23:460–462.
105. Ragusa M, Statello L, Maugeri M, Majorana A, Barbagallo D, Salito L, et al., Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors, *J. Mol. Med*. 2012;90:1421–1438.
106. Rajamanickam, S., and Agarwal, R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Dev. Res*. 2008;69,460–471.
107. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(4):279–288.
108. Renehan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, Potten CS. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis*. 2002;4(2):76–89.

109. Research WCRF. AI for C, Pekmezi D, Demark-Wahnefried W. Updated evidence in support of diet and exercise interventions in cancer survivors. *Acta Oncol (Madr)*. 2011;50(2):167–178.
110. Rocha a PM, Carvalho LCRM, Sousa M a V, Madeira SVF, Sousa PJC, Tano T, et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(2):97–104.
111. Romualdo GR, Fragoso MF, Borguini RG, de Araújo Santiago MCP, Fernandes AAH, Barbisan LF. Protective effects of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. *Food Res Int*. 2015;77:432–440.
112. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009;30(2):183–196.
113. Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol*. 2012;3(May):107.
114. Russo GL. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(4):533–544.
115. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, et al. Thirty-Year Analysis of a Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1030–1038.
116. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(3):332–337.
117. Safe S, Wargovich MJ, Lamartiniere C a, Mukhtar H. Symposium on mechanisms of action of naturally occurring anticarcinogens. *Toxicol Sci*. 1999;52(1):1–8.
118. Santos VS, Bisen-Hersh E, Yu Y, Cabral ISR, Nardini V, Culbreth M, et al. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(7):390–404.
119. Saxena A, Carninci P. Long non-coding RNA modifies chromatin: Epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *BioEssays*. 2011;33(11):830–839.
120. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (açaí). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8598–603.
121. Schauss AG. Ac and Nutrient Rich Palm Fruit from the Amazon Rain Forest with Demonstrated Bioactivities In Vitro and In Vivo. 2010;479–90.
122. Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Wnt Signaling in Cell Motility and Invasion: Drawing Parallels between Development and Cancer. *Cancers*. 2016;8:80.
123. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7–30.

124. Silva DF, Castello F, Vidal B, Santos D, Célia M, Costa P, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart . in malignant cell lines. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2014;1–9.
125. Sohn OS, Fiala ES, Requeijo SP, Azoxymethane C. Differential Effects of CYP2E1 Status on the Metabolic Activation of the Colon Carcinogens Azoxymethane and Methylazoxymethanol Differential Effects of CYP2E1 Status on the Metabolic Activation of the Colon. Cancer Research. 2001;8435–8440.
126. Solomon H, Madar S, Rotter V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. J Pathol. 2011;225(4):475–478.
127. Souza-Monteiro JR, Hamoy M, Santana-Coelho D, Arrifano GPF, Paraense RSO, Costa-Malaquias A, et al. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. Neurochem Int. 2015;90:20–27.
128. Spada PDS, Dani C, Bortolini G V, Funchal C, Henriques J a P, Salvador M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. J Med Food. 2009;12(5):1084–1088.
129. Stachler MD, Rinehart E, Lindeman N, Odze R, Srivastava A. Novel molecular insights from routine genotyping. 2015;507–513.
130. Stoner GD, Wang L-S, Seguin C, Rocha C, Stoner K, Chiu S, et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. Pharm Res. 2010;27(6):1138–45.
131. Sunter JP, Appleton DR, Wright NA, and Watson AJ, “Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine,” Virchows Archiv B Cell Pathology. 1978;29(1):211–223.
132. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. Cancer Cell. 2006;9(3):199–207.
133. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. Carcinogenesis. 2006;27(1):162–169.
134. Tanaka SS, Kojima Y, Yamaguchi YL, Nishinakamura R, Tam PPL. Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. Dev Growth Differ. 2011;53(7):843–856.
135. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. 2003;94(11):965–973.

136. Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KMW. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem Biol Interact.* 2009;177(2):128–136.
137. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog.* 2009;8(1):5.
138. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al., Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 2007;13:1586–1593.
139. Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA. Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp.* 2012;(67):1–7.
140. The Cancer Genome Atlas Network (326 collaborators). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330–337.
141. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals - Promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer.* 2007;120(3):451–458.
142. Tong Y, Yang W, Koeffler HP. Mouse Models of colorectal cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30(7):450–462.
143. Torres T, Farah A. Coffee, mate, açai and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilian's diet. *Eur J Nutr.* 2016;1–11.
144. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231–1246.
145. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J. BioMed Central Ltd.* 2011;10(1):45.
146. Van Der Kraak L, Gros P, Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11688–11699.
147. Vatandoost N, Ghanbari J. Early detection of colorectal cancer: from conventional methods to novel biomarkers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015.
148. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):979–987.
149. Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R, Agarwal C. Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats. *Mol Carcinog.* 2010;49(7):641–652.

150. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HRDC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2009;46(1):20–5.
151. Voorham QJM, Carvalho B, Spiertz AJ, Van Grieken NCT, Mongera S, Rondagh EJA, et al. Chromosome 5q loss in colorectal flat adenomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4560–4569.
152. Wade M, Li Y-C, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2013;13(2):83–96.
153. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(7):489–499.
154. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse M a, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787–793.
155. Williams CD, Satia JA, Adair LS, Stevens J, Keku TO, Sandler RS. NIH Public Access. 2010;18(5):1552–1561.
156. Worthley D-L, Whitehall V-L, Spring K-J, Leggett B-A. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(28):3784–3791.
157. Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamaro CV, Lima ES, Da Veiga-Junior VF. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem.* 2015;179:137–151.
158. Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, et al. Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Sci.* 2013;104(7):889–895.
159. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2016; 1-13.
160. Zhang L, Fan X-M. The pathological role of microRNAs and inflammation in colon carcinogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39(2):174–179.

Objetivos

1. Objetivo

Estudar o efeito protetor da ingestão polpa liofilizada de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) na carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar.

1.1 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o efeito preventivo da ingestão da polpa liofilizada de açaí sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e tumores de cólon na carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar;
- ❖ Avaliar o efeito da fração polifenólica do açaí (cianidina-3-rutinosídeo) em células de adenocarcinoma de cólon humano (RKO) quanto a redução da motilidade celular;
- ❖ Avaliar o efeito quimiopreventivo da ingestão da polpa de açaí sobre a expressão gênica em tumores de cólon.

Capítulo II

Artigo científico

O artigo será formatado posteriormente de acordo com as normas da revista **Food Chemistry (Impact Factor: 4.05)*

Protective effect of lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) intake against colitis-associated carcinogenesis model in male Wistar rats.

Mariana F. Fragoso^{1*}, Guilherme R. Romualdo¹, Lisa A. Vanderveer², Janusz Franco-Barraza², Edna Cukierman², Margie L. Clapper², Robson F. Carvalho³, Luis F. Barbisan³.

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

²Fox Chase Cancer Center, Philadelphia/Pennsylvania – USA,

³Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, Botucatu-SP, Brazil

* To whom correspondence should be addressed (marifragoso@gmail.com)

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) is a native fruit of the Amazon region, widely consumed in Brazil and worldwide. The beneficial effects of its consumption have already been demonstrated in several *in vivo* and *in vitro* studies. The objectives of this study was to evaluate the protective mechanisms of lyophilized açaí pulp (AP) intake in a colon carcinogenesis model associated with colitis in rats and to analyze the effect of cyanidin 3-rutinoside in the motility of colon adenocarcinoma cells using the wound healing assay. Male Wistar rats were randomly assigned to four groups that received: (G1) basal diet (n=20); (G2) basal diet containing 0.2% NAC (N-acetylcysteine, a chemopreventive control) (n=15); (G3 and G4), basal diet containing 5.0% or 7.5% of lyophilized AP, respectively (n=20). At weeks 1 and 2, rats received 4 doses of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, twice a week). Two weeks after the administrations of DMH, acute inflammation was induced using 2,4,6-trinitrobenzene acid (TNBS). At week 3, dietary interventions were introduced. The cyanidin 3-rutinoside modifying effects (C3R, 25 and 50 μM) were investigated in cell motility in human RKO adenocarcinoma cells. This cyanidin was chosen based on the data for the anthocyanin profile analysis performed by high performance liquid chromatography (HPLC). First, the results showed that C3R (25 μM), the main anthocyanin identified in lyophilized AP, tended to reduce the motility of RKO cells, as analyzed by the cell motility assay. Second, ingestion of lyophilized AP reduced the total number of aberrant crypt foci (ACF) and the ACF multiplicity (ACF with 1-4 crypts and ACF > 10 crypts), tumor cell proliferation and incidence of tumors with high grade dysplasia. Third, lyophilized AP modulated the expression of six genes: five upregulated (Akt3, Dlc1, Ffar2, Vegfd, Ppara α) and one downregulated (Msh6) involved in different cancer mechanisms of action. Thus, the results indicate that the ingestion of lyophilized AP shows antitumor activity in the colonic carcinogenesis model associated with colitis in rats. In addition, these results confirm, for the first time, the beneficial action of lyophilized açaí pulp in the proposed model based on macroscopic, microscopic and molecular analysis.

Key words: açaí fruit powder, colon carcinogenesis, acute inflammation, prevention.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common neoplasia in the industrialized world (GLOBOCAN, 2012). In Brazil, the estimative of news cases for 2016 is approximately of 16,660 for men and 17,620 for women (INCA, 2016). Risk factors for this type of cancer are mainly related to life style and dietary habits as indicated by epidemiological and experimental evidences (Bingam et al., 2013; Lofano et al., 2012). This malignance can arise sporadically, hereditarily or on the background of inflammatory bowel disease (IBD) (Das et al., 2007).

Due to its high incidence in human population, a lot of public effort has been made towards a way to reduce or reverse the CRC development using preventive strategies, especially the use of naturally occurring compounds (Das et al., 2007; Moshkowitz, 2011; Paz et al, 2015). Thus, to better analyze the CRC development and the biological effects of pharmacological or natural products, rodent models of CRC with or without an IBD background are a suitable and useful option for cancer prevention studies (Clapper et al., 2007; Das et al., 2007; Femia et al., 2008; Brenna et al., 2013).

Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) is a dark purple, berry-like fruit that grows in a large palm tree indigenous to South America, including the Brazilian Amazon floodplains (Rodrigues et al., 2006; Schauss et al., 2006). It is consumed all over Brazil, but especially in the Northern region, where its consumption can reach up to 2L/d (Kahyat, 2005). A recent study showed that açaí is one of the major dietary contributors for the antioxidant capacity in the Brazilian dietary regimen (Torres e Farah, 2016). Thus, this fruit has received a lot of public attention due to its antioxidant and anti-inflammatory properties and it is usually known as “super fruit” (Schauss et al., 2006a, b; Mertens-Talcott et al., 2008; Spada et al., 2009; Udani et al., 2011; Pereira et al., 2016; Machado et al., 2016).

Several studies have already identified the phytochemical composition of this berry-like fruit (Schauss et al., 2006; Pacheco-Palencia et al., 2008; Silva et al., 2013; Cardoso et al., 2015; Romualdo, et al., 2015) which suggested that its biological properties are due to the presence of anthocyanins, especially cyanidin 3-glucoside (C3G), cyaniding 3-rutinoside (C3R), and carotenoids (Spada et al., 2008; Gôuvea et al., 2012; Zielinski et al., 2014; Romualdo, et al., 2015). Anthocyanins are glycosides of anthocyanidins

responsible for the dark purple color of açai fruit as well as by its antioxidant activity (Yamaguchi et al., 2015). Also, the potential anti-tumor activity of açai fruit intake and its main anthocyanins have been evaluated in different *in vivo* and *in vitro* bioassays (Chen et al., 2006; Stoner et al., 2010; Pacheco-Palencia et al., 2010; Fragoso et al., 2012; Fragoso et al., 2013; Silva et al., 2014; Romualdo et al., 2015).

Besides anthocyanins, açai fruit also possess high amounts of carotenoids (Romualdo et al., 2015). Together with anthocyanins, carotenoids are one of the major classes of plant pigments (Silva et al., 2013). They are liposoluble pigments, classified as carotens, xantophils or lycopene and known to have potential antioxidant property (Tapiero et al., 2004; Milani et al., 2016).

Considering the increased consumption of açai fruit pulp in Brazil and worldwide and the lack of mechanistic studies on its anti-tumor property in chemically induced rodent cancer models, the present study was carried out to determine as the lyophilized açai fruit (AP) intake is efficacious in reversing the chemically-induced colon carcinogenesis associated with acute inflammation insult.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Compounds

1,2-Dimethylhydrazine hydrochloride (DMH), N-Acetyl-L-cysteine (NAC) and 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cyanidin 3-rutinoside chloride (C3R) (purity: $\geq 98\%$; Molecular weight: 630.98; Molecular formula: $C_{27}H_{31}ClO_{15}$) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (CAS 18719-76-1), diluted in 1.6 mL of nuclease-free water to give a final concentration of 1 mM and stored at -20°C prior to use. Açai pulp was harvested from Belém- PA (Brazil) and samples were lyophilized by Liotécnica Food Technology (Embu das Artes-SP, Brazil).

Experimental Design

All experiments were conducted in accordance with the Ethical Principles for Animals Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

The experimental protocols were approved by the local University Ethics Committee for Animal Research (protocol number CEEA 1041-2013). Eighty male Wistar rats, 6-week old were randomly allocated into 4 groups (Figure 1): G1: DMH + TNBS [2,4,6-trinitrobenzene acid] + basal diet; G2: DMH + TNBS + basal diet containing 0.2% NAC [N-acetylcysteine, a positive control]; G3: DMH + TNBS + basal diet containing 5% lyophilized açai pulp (AP); G4: DMH + TNBS + basal diet containing 7.5% AP. Two weeks after the last DMH administration, experimental diets were introduced. Acute colitis was carried out by administering 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v / v) in the middle colon (Luchini et al., 2008) as a model for Crohn's disease and to accelerate the colon carcinogenesis process (Santiago et al., 2007). Forty-eight hours after colitis induction, some 5 animals (n=5 each group) were euthanized for the confirmation of the inflammatory process (macroscopy and histology) (Table 2S). At the end of 25 weeks, the remaining animals were euthanized and macroscopically identified colon tumors were measured and sampled (histology, immunohistochemical and gene expression).

Experimental Diets

Different experimental diets were used: (1) a cereal-based commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital-PR) (2 and 3) commercial diet containing 5.0% (50 g/kg chow) or 7.5 % (75 g/kg chow) of lyophilized açai pulp (AP) (Liotécnica - Food Technology) or (4) 0.2 % (0.2g/kg chow) of N-acetylcysteine (NAC - Sigma-Aldrich, USA), an antioxidant and anticarcinogenic agent (Seril et al., 2002; Amrouche-Mekkioui and Djerdjouri, 2012). After complete homogenization and humidification performed in industrial mixer (CAF model M60), experimental diets were pelleted in feed pelleting machine (Chavantes– PR, Brazil), for dry ventilation and packed in plastic bags previously identified and kept under refrigeration. Food cups were replenished with fresh diet twice a week. The animals received filtered water and food *ad libitum*.

Chemical analysis of lyophilized açai pulp (AP)

AP analysis was performed in triplicate. The moisture content (AOAC Official Method 934.01), ash (AOAC Official Method 942.05) and protein content (AOAC Official Method 984.13 thousand) were determined by multiplying the nitrogen content by the

conversion factor 6.25 (AOAC, 2006). The lipids were determined by the method proposed by Bligh and Dyer (1959) and total dietary fiber was determined according to AOAC Official Method 985.29 (AOAC, 2006). Available carbohydrates were calculated by the difference [100 - (% protein + % fat + % humidity + % ash + % of dietary fiber)]. The amount of anthocyanin in the experimental AP was determined according to Hendry and Houghton (1992) and Francis (1982) protocols. The absorbance was measured by spectrophotometer type UV/vis GBC911A (450 and 600 nm); the reference used was an ethanol-HCl 1.5N solution (85:15); and the extinction factor was $98.2 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$. Using this analytical method, it was determined that 100g of dehydrated lyophilized açai pulp and contained 1.23 mg of anthocyanins.

Anthocyanin extraction was performed using 10 mg of sample and 10 ml of acidified methanol solution with formic acid (1:9 v/v) in an ultrasonic bath, followed by centrifugation until solution discoloration (Brito et al., 2007). An aliquot of 400 μL was dried and 100 μL of extract was diluted in a solution of 5% formic acid in water:methanol (90:10). The analyzes were performed in triplicate in Waters Alliance 2695™ system with a Waters™ 2996 diode array detector, column Thermo Scientific™ BDSC18 (100 mm x 4.6 mm, 2.4 μm), flow rate of 1.0 mL min^{-1} , temperature of 40°C column, injection volume of 20 μL and gradient of elution with acetonitrile and formic acid (Gouvea et al., 2015). The quantification of anthocyanins was performed by external standardization.

The quantification and characterization of carotenoids was performed according to Rodrigues-Amaya (2001). About 2-5g of the matrix was weighed and then macerated in porcelain crucibles with 3 g of celite and 50 mL of acetone. The sample was vacuum filtered on a sintered glass funnel plate. The acetone extract was transferred to a funnel containing 50 mL of petroleum ether and washed with 300 mL of ultrapure water. The ether extract was filtered with anhydrous sodium sulfate and 100 mL was collected in a flask and filled with petroleum ether. The total carotenoid level in the sample was determined by spectrophotometry at 450 nm (Shimadzu UV-1900, Shimadzu, Japan). The carotenoid profile was determined in an aliquot of 1 mL. The sample was dried under a stream of nitrogen and dissolved in 100 mL of acetone. The solution was homogenized for 10s and then taken to HPLC analysis. Water/HPLC system controlled by Empower software and Waters™ diodes 996 array detector was used. The separation of

carotenoids was performed using a C30 column (S -2 carotenoid, 4.6 mm x 250 mm, YCM), with the gradient elution of methanol and methyl tert-butyl ether. The flow rate was 0.8 mL min⁻¹ and run 28 min. The sample injection volume was 15 µL. Carotenoids were identified based on their retention time and UV absorption spectrum/Vis compared with the patterns of carotenoids retention time.

Histological processing and immunohistochemistry protocol

At the end of the experiment, colons were removed, washed with saline solution to remove fecal residues. Colon tumors were sampled for molecular analysis and the remaining colon was and immersed in 10% buffered formalin for 24 h at room temperature. After fixation, swiss-rolled colons were paraffin embedded and sectioned for histological evaluation in hematoxylin-eosin (HE) staining and for immunohistochemical reactions for Ki-67, β -catenin and Connexin43 (Cx43), as previously described (Fragoso et al., 2013).

Aberrant Crypt Foci (ACF) analysis

Stereoscopic analysis of classical ACF was realized in colon whole mounts stained with 1.0% methylene blue dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) (Dias et al., 2010; Moura et al., 2012). ACF were identified according to Bird's criteria (Bird and Good, 2000). The number of ACF with 1–3, 4-10 and >10 aberrant crypts (ACs), as well as the number of total ACs and total ACF were analyzed.

Apoptosis, Ki-67, β -catenin and Connexin43 analysis

The apoptosis index (AI%) was evaluated in colon tumor sections HE-stained (5 tumors/group), calculated as followed: AI% = number of apoptotic cells divided by total cells counted and multiplied by 100. Cell proliferation index was calculated using Ki67 labeling index (Ki-67 LI%), by the percentage of marked cells divided by total cells counted and multiplied by 100. Tumor cells were scored as positive or negative for membranous, cytoplasmatic and nuclear immunostaining of β -catenin and Cx43 and compared with adjacent non-altered colonic crypts (Buhmeida et al., 2008; Kanczuga-Koda et al., 2010).

Histopathology analysis and tumor volume

The tumor volume was calculated based on the following equation L (length) \times W (width) \times H (height) \times C (constant), where $C = \pi/6$ ($\pi = 3$). This formula was chosen for representing the actual mass (and volume) of a wide spectrum of tumor shapes and sizes, after a comparison with 19 other formulas (Tomayko and Reynolds, 1989). Macroscopic tumors and Swiss-rolled (2 to 3.2-mm width segments) colon sections stained with hematoxylin-eosin (H&E) were used to determine the morphological type of tumors by histopathological examination. Tumors were evaluated based on the histotype, grading, pattern of growth and dysplasia (high and low) in a blinded manner as described previously (Hamilton and Aaltonen, 2000).

Tumor RNA extraction

Approximately 30 mg of each tumor sample was homogenized in 1 mL QIAzol (QIAGEN, Crawley, UK) using a homogenizer (Biospec Products, INC., Bartlesville, OK 74005). RNA fractions were isolated separately using a commercial column-based system following the manufacturer's instructions (QIAGEN RNeasy® Mini Kit, QIAGEN Inc. USA Valencia, CA - USA). Quantitative and qualitative analysis was realized using NanoVue spectrophotometry (GE Healthcare UK Limited, UK) ($Abs_{260/280}$ value of 1.95 ± 0.19) and the Agilent 2100 Bioanalyzer (RIN value of 8.89 ± 1.0), respectively. The remaining RNA was stored at -80°C until further use.

cDNA synthesis and TLDA Array

Up to two micrograms of total RNA was used for cDNA synthesis with MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, USA). RNA expression profiles were compiled using a 96-well TaqMan® Array Cards (TAC)-based real-time polymerase chain reaction (PCR). The custom TAC consisted of a colon plates assessing 96 (91 targets and 5 endogenous) genes involved in regulation of cell proliferation and differentiation, self-sufficiency in growth signals, insensitivity to inhibitory growth signals, avoidance of apoptosis, unlimited replicative potential, sustained angiogenesis and invasiveness (metastasis). Five samples from each group were analyzed. Target genes were amplified using the TaqMan® Universal Mastermix II (Life Technologies, USA) by a cycling protocol of heat activation at 50°C for 1 min and denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Fluorescence detection was performed on

QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Relative quantitation was calculated based on the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method, using Expression Suite Software v1.1 and normalization was performed using three endogenous genes *18S*, *Actb* and *Gusb*.

Cell culture and Cell Viability

RKO human colon adenocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and grown in Eagle's Minimum Essential Medium (2,2 g/L NaHCO₂, pH 7.2) (Fox Chase Cancer Center Cell Facility, USA) complemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were cultured in T-75 plastic flasks (Corning Life Sciences, Asia Pacific) and grown at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. Once cells reached ~85% confluence, they were harvested by trypsinization (0.25% trypsin, in Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free PBS, pH 7.4) and seeded at 0.3x10⁶ cells/well in 6-well plates, until a 95% confluent monolayer was obtained.

Tumor cells were cultured in triplicate for 24h (2x10³ cells/well) in a 96-well plate to analyze the cell viability using alamarBlue®. Protocol was developed according to the manufacturer (alamarBlue® Cell Viability Reagent, Invitrogen, UK). Plates were scanned using a microplate reader (Tecan) and Magellan software version 6.6. Cell viability was determined by plotting normalized absorbance at 570 nm versus compound concentration. Larger absorbance values correlate to an increase in total metabolic activity from cells in the well.

Wound healing assay

Confluent tumor cells monolayers were scratched with a plastic tip across each well. Debris and floating cells were removed and serum-free media was used to reduce the chances of cell proliferation. Cells were treated with 25, 50 or 100 µM of C3R. Wound closure was evaluated at 24 and 48h using a phase contrast Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope, with a 20X objective, equipped with a Photometrics cool snap HQ CCD camera. Images were acquired using MetaMorph version 6.2r6 software. A total of eight pictures were assessed using Image J version 1.50b (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

Cell motility data was subjected to statistical analysis, using a normality test to verify data distribution (Shapiro-Wilk, $p < 0.07$) that showed a symmetrical distribution. ANOVA analysis was used for repeated measures in time, followed by a Tukey's post hoc test (SAS program, version 9.2). ANOVA was used for all the other parameters, except for tumor incidence and tumor volume, when Chi-square/Fisher's exact test was used. $P < 0.05$ was selected as the criterion of significance.

RESULTS

Chemical composition of the lyophilized açai pulp (AP)

The chemical composition of lyophilized AP used here showed high levels of lipids (47.36 ± 0.76 g/100) and total pectins (25.97 ± 1.15 g/100g). Moisture, ash and protein content was also analyzed (Table 1S). Furthermore, lyophilized AP proved to be a caloric food (509.4 kcal/100g).

Characterization of anthocyanins presented in AP indicated that the most abundant anthocyanin was cyanidin 3-rutinoside (C3R) (214.09 ± 17.32 g/100g) (Figure 2A). Thus, the C3R was chosen for further *in vitro* assays. Besides, characterization of carotenoids in lyophilized AP was realized as well (Figure 2B). As seen in Table 1, β -carotene was found in greater amount (1908.5 ± 24.4 mg/100g).

Low concentration of C3R interfere with tumor cell motility in vitro

To assess cell motility in RKO tumor cells treated with C3R, two time-points in the same treatment were set (intragroup analysis): 0h to 24h, and 24h to 48h. Cell motility was observed in all treatments ($p < 0.001$) during both time-points, although a reduction in cell motility that approached statistical significance was observed in the RKO tumor cells treated with 25 μ M C3R after 24h of treatment ($p = 0.0579$). To check if cell motility differed among the treatments, comparisons were done between treatments and time-points (intertreatment analysis). After 48h, RKO tumor cells treated with 25 μ M C3R exhibited a modest reduction in cell motility when compared to the untreated RKO cells ($p = 0.0584$) and the RKO cells treated with 100 μ M C3R ($p = 0.0138$). This result suggests that the C3R at lowest concentration modestly delayed cell motility and was more efficient than the highest concentration (100 μ M) (Figure 3A).

There are no significant changes in AlamarBlue® analysis in all treatment, suggesting that C3R exposure exerted no influence on RKO cell viability (Figure 3B). This finding indicated that the C3R present in lyophilized AP compound (at the tested concentrations) did not exert cytotoxicity on RKO tumor cells.

AP at 7.5% improved weight loss after induction of acute inflammation

No animals died despite the extensive loss of body weight and severe diarrhea observed in the animals during the first days after induction of acute inflammation by a single intrarectal TNBS administration. There was no statistical difference in the mean values of body weight among the experimental groups (Table 2). Lower loss of body weight was observed in group fed with lyophilized AP 7.5 % (G4) ($p = 0.020$) when compared to control group (G1). Regarding the water and food intake, there was no statistical difference among the experimental groups, indicating that the animals had adequate acceptance of initial dietary interventions with 5.0 and 7.5 % lyophilized AP and 0.2%N- acetylcysteine (NAC, positive control) (Table 2). Acute inflammation generated a lesion macroscopically characterized by an evident crust of necrotic tissue and microscopically characterized by a coagulative necrosis process into site where TNBS was instilled (Table 2S). No statistical difference among groups was seen for the macro and microscopic evaluation of acute inflammation observed at 48 hours after TNBS instillation (Table 2S).

AP feeding altered food and water consumption after colitis

There is no difference in body weight evolution among groups after colitis induction (Table 3). Food and water intake after acute colitis induction was lower in the groups treated with lyophilized AP (G3 and G4) compared to control group (G1) ($p < 0.001$). Among the groups fed with lyophilized AP, food intake was lower in the group receiving 7.5% AP (G4) ($p < 0.001$) (Table 3). The average AP consumption in groups fed with 5.0 % and 7.5 % lyophilized AP was 0.994 ± 0.18 and 1.44 ± 0.25 g/rat/day, respectively (Table 3).

AP intake reduced ACF development

The groups fed with lyophilized 5.0 and 7.5% AP and 0.2% NAC (G2-G4) presented a lower number of AC total compared to the control group (G1) ($p < 0.001$). Total number of ACF ($p < 0.001$) was reduced in the group fed with 5.0% AP (G3) when compared to the untreated one (G1). For ACF multiplicity, groups treated with AP 5.0 % (G3) and 0.2% NAC (G4) demonstrated a reduction for ACF with 4-10 AC when compared to control group (G1) ($p < 0.001$). In addition, a reduction in the number of ACF with >10 AC was observed in groups fed with AP 5.0 and 7.5% and NAC 0.2% (G2-G4) when compared to control group G1 ($p < 0.001$) (Table 4). Taking into consideration ACF location, the mean number/group indicate a higher incidence of ACF in the middle colon (Table 4). Data also indicate a reduction in ACF development in the middle colon, the TNBS instillation area, in the groups fed with AP 7.5% (G4) when compared to control group (G1) (Data not shown).

Tumor cell proliferation was modulated by AP intake

Both groups fed with 7.5% AP (G4: 59.88 ± 14.84) and 0.2% NAC (G2: 57.34 ± 15.39) presented a reduction in cell proliferation (Ki-67 LI%) in the colon tumors when compared to control (G1: 71.24 ± 10.27) ($p < 0.001$) (Figure 5). No difference was observed for apoptosis index, connexin 43 or β -catenin immunoexpression (Figura 4).

AP influenced tumor incidence

Histopathology of colon tumors showed no difference for mean number of tumors, tumor multiplicity (Table 5) or tumor volume (Figure 2S). However, it was observed a reduction in tumor incidence the group fed with AP 5.0% (G3) when compared to control (G1) ($p = 0.019$). This reduction was observed in the incidence of colon tumors with high grade dysplasia (13,16%) and consequently, an increase in colon tumors with low grade dysplasia (86,84%) was observed in comparison to control group (G1) (Table 5).

Tumor gene expression was altered by AP feeding

From 91 gene in TLDA used here, six genes were differently expressed in colon tumors from the groups fed 5.0 and 7.5% lyophilized AP and 0.2% NAC (G2-G4) in comparison to the untreated group (G1) (Table 3S). The only downregulated gene was mutS homolog 6 (Msh6), differently expressed in colon tumors from the group fed with

5.0% AP ($p=0.04$). All the other altered gene were upregulated in the colon tumors from the group fed with 7.5% AP. The genes upregulate in the 7.5% AP group are: peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara), AKT serine/threonine kinase 3 (Akt3), DLC1 Rho GTPase activating protein (Dlc1) and vascular endothelial growth factor D (Vegfd) whereas the genes upregulated for 0.2% NAC are free fatty acid receptor 2 (Ffar2) and Ppara (Figure 6).

DISCUSSION

The findings of the present study provide mechanistic evidence that lyophilized açai fruit and its main phytochemical compound can reduce colon carcinogenesis associated with acute inflammation in rats and cell motility on human RKO colorectal tumor cells. First, our results show that the lowest concentration of cyanidin 3-rutinoside (25 μ M), the main anthocyanin identified in lyophilized AP, had a tendency in reducing cell motility analyzed by the wound healing assay; Second, lyophilized AP intake reduced total ACF and ACF multiplicity (ACF 1-4 crypts and ACF>10 crypts), tumor cell proliferation and tumor incidence with high grade dysplasia; Third, lyophilized AP modulated the expression of six genes involved in different hallmarks of cancer.

Several studies have already identified the main components in Brazilian açai fruit, including anthocyanins (Del-Pozo Insfran et al., 2004; Linchetenthaler et al., 2005; Schauss et al., 2006; Gordon et al., 2012; Romualdo et al., 2015) and carotenoids (Souza et al., 2009; Ribeiro et al., 2010; Romualdo et al., 2015). The chemical analysis demonstrate that the lyophilized AP used in the *in vivo* experiment had high levels of cyanidin 3-rutinoside (C3R) and cyanidin 3-glucoside (C3G). This finding is in agreement to several others that report the same anthocyanins in açai pulp (Schauss et al., 2006b; Pacheco-Palencia et al., 2008 and 2010; De Rosso et al., 2009; Gordon et al., 2012; Romualdo et al., 2015). In addition, the amount of anthocyanins may vary among açai samples used in different studies. Whereas lyophilized AP presented 324.19 mg/100g of total anthocyanin, other groups obtained different values: 108.9 mg/100g (Souza et al., 2009); 252.9 mg/100g (Ribeiro et al., 2010); and 358.85 mg/100g (Romualdo et al., 2015). In contrast, the lyophilized AP used here also presented higher levels of carotenoids (4.23

mg/100g) when compared to other studies using different açai samples: 1.02 mg/100g (Spada et al., 2009), 0.52 mg/100g (Ribeiro et al., 2010), 1.12 mg/100g (Romualdo et al., 2015).

The physicochemical analyses of lyophilized AP showed results that resemble those obtained by Carvalho et al. (2016) for moisture, ash, lipid content and titratable acidity (TA) (Table 1S). However, the lyophilized AP used here had higher protein content (9.30 ± 0.94) compared to the average of the three different açai genotypes previously tested (Carvalho et al., 2016). In general, three reasons can explain this variability in phytochemical composition of different açai samples: the first is related to the type of product used in the studies (lyophilized, frozen, spray-dried pulp, *in natura* samples, etc.); the other is due to genetic variability of *Euterpe oleracea*; the last one is related to the ripening stage, climate, geographical location, growing conditions and post-harvest handling (Yamaguchi et al., 2015; Carvalho et al., 2016).

In our previous study, we investigated the potential protective effect of a commercial product formulated as a spray-dried açai pulp against sporadic cancer colon development (Fragoso et al., 2013). This spray dried açai powder is rich in anthocyanins but with varying amounts of maldextrin, used as a carrier agent in the industrial processing (Tonon et al. 2010; Romualdo et al., 2015). However, lyophilized AP used here is a rich source of anthocyanins as well but without food additives (Table 1). In fact, the high concentration of anthocyanins in a lyophilized AP turns this product an excellent natural source to obtain isolated standards of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside (Gouvêa et al., 2012). Besides being rich in anthocyanins, lyophilized AP also present higher levels of carotenoids when compared to the spray-dried açai pulp previously tested by us (Romualdo et al., 2015). Besides, one of the characteristics of lyophilized products is the low moisture content, which prevents enzyme deterioration and growing of bacteria and mold, providing a long shelf-life, better taste, texture and appearance (Oetjen and Haseley, 2004).

Anthocyanins and carotenoids are compounds that belong to different classes of phytochemicals: the first two are polyphenols that belong to the flavonoid subclass and represent the anthocyanin group; the latest is a carotenoid, a liposoluble pigment found

in plants, fungi, bacteria and algae and present in fruits, vegetables and fish (El-Agamey et al., 2004; Tapiero et al., 2004). The presence of anthocyanin and carotenoids in the lyophilized açai pulp may be responsible for the its high antioxidant capacity (Schauss et al., 2006a, b; Mertens-Talcott et al., 2008; Spada et al., 2009; Udani et al., 2011; Pereira et al., 2016; Machado et al., 2016) and anti-tumor activity of açai (Chen et al., 2006; Stoner et al., 2010; Pacheco-Palencia et al., 2010; Fragoso et al., 2012; Fragoso et al., 2013; Santos et al., 2014; Romualdo et al., 2015).

The scratch assay is an easy and inexpensive test to analyze cell motility (Liang et al., 2007). Its observation is based on a creation of an artificial gap (“scratch”), on a confluent cell monolayer. This scratch will make the cells on the edge of the scratch to move towards the scratch, closing it and reestablishing cell-cell contact again (Liang et al., 2007). It can be used to analyze tumor cell motility, one of the main steps in the metastatic process (Gupta and Massagué, 2006). Thus, the scratch assay was performed to investigate if RKO cell motility can be modulated by the most abundant anthocyanin present in the lyophilized AP used in the *in vivo* experiment: cyanidin 3-rutinoside (C3R). A slightly reduction in cell motility was observed in the RKO cells treated with 25 µM C3R after 24h of exposure. Even though without a significant difference, the lowest concentration on C3R was more efficient in reducing RKO cell motility, indicating a potential anti-metastatic feature of this anthocyanin.

Anthocyanins crude extract has showed efficiency at reducing CAL 27 oral cancer cells motility (Fan et al., 2015). In this study, the authors tested different concentrations of anthocyanin crude extract from black rice (*Oryza sativa* L.) whereas the lowest concentration (100 µg/ml) reduced cell motility 6h after treatment. In our experiment, a pure C3R was used at a lower concentration (~15.7 µg/ml), but it presented a tendency in reducing cell motility of RKO human colorectal cancer cells. This suggests that C3R is a compound with strong capacity of reducing cell motility, but its association with other phytochemicals, like other polyphenols and carotenoids, for example, may increase this antitumor activity.

Aberrant Crypt Foci (ACF) are preneoplastic lesions that can be easily identified in whole-mount colon stained with methylene blue (Bird, 1987). AFC present genetic and

epigenetic alterations that can also be observed in dysplastic lesions and CRC (Lopez-Ceron and Pellise, 2012). Thus, they are usually used in study for screening effective preventive agents in different models of colon carcinogenesis (Mori et al., 2005).

ACF with high AC number and multiplicity are more likely to progress to advanced lesions in colorectal carcinogenesis (Takayama et al., 2005; Alrawi et al., 2006). The findings of stereological analysis of ACF showed that the lyophilized AP reduced total number of AC and ACF multiplicity as well as tumor incidence by reducing those with high grade dysplasia. This results suggests that lyophilized AP intake attenuates the promotion/progression of colon carcinogenesis associated to acute colitis, as previously demonstrated (Choi et al., 2016). Besides açai, anthocyanins from different fruits have been investigated for their chemopreventive potential against ACF development and tumor progression (Hagiwara et al., 2002; Lala et al., 2006; Fragoso et al., 2013; Banerjee et al., 2013).

One of the most fundamental traits of cancer cells involves their ability to sustain cell proliferation (Hanahan and Weinberg, 2011). Our data has shown that intake of lyophilized AP 7.5% decreased tumor cell proliferation when compared to the control groups (G1). In our previous study, we also observed a reduction in tumor cell proliferation in the group treated with 5.0% spray-dried AP (Fragoso et al., 2013). In contrast, we did not observe any difference for the tumor apoptotic index for the groups treated with lyophilized AP.

APC is an important negative regulator of the Wnt pathway and its main function is related to its ability to control the intercellular levels of β -catenin protein (Zhan et al., 2016). The increased levels of intercellular β -catenin augment the chance of its translocation to the nucleus. In the nucleus, β -catenin forms an active complex with LEF (lymphoid enhancer factor) and TCF (T-cell factor) from the displacement of the TLE/Groucho complex and recruitment of histone modifying co-activators. This process leads to the transcription of genes involved in cellular processes as cell proliferation, differentiation, tissue homeostasis (MacDonald et al., 2009) and specification of cell fate and maintenance of pluripotency (Tanaka et al., 2011). A high number of colon tumors presented altered expression of β -catenin immunexpression but without a clear difference among groups. β -catenin pathway is involved in the colon carcinogenesis but neither gene

expression (Ctnbb1, Gsk3b, Apc, Wnt) nor protein expressions were modified by AP and NAC interventions.

Dlc1 is a gene that encodes for a Rho GTPase-activating protein (RhoGAP), responsible to control the Rho family members by catalyzing the conversion of RhoGTPases to their inactive state (Denholm et al., 2005; Lahoz and Hall, 2008; Wu et al., 2009). The Rho family members can act on different aspects of cell biology, including cell cycle, cell adhesion, morphogenesis, polarity and migration (Lahoz and Hall, 2008). Lately, a lot of attention has been given to this gene, due to its tumor suppressor role in several cancer types (Vigil et al., 2010). Three different studies had provided evidence of this role in cancer: 1. a study using HT29 cell lines showed that transfection of *Dlc1* cDNA into the cells causes significant inhibition of cell growth and cell migration (Wu et al., 2009); 2. another study using *Drosophila* demonstrated that this gene controls Rho activity, by acting on cell morphogenesis (Denholm et al., 2005). Once the morphogenesis pathway is disrupted, tissue disorganization is observed and inappropriate cell proliferation starts (Lahoz and Hall, 2008); and 3. the latter study shows that *Dlc1* inactivation in mouse embryo fibroblasts contributes to neoplastic transformation and poor prognosis in human cancers (Qian et al., 2012). Taken together, our result shows that *Dlc1* expression was increased by 7.5% AP intake and its upregulation was involved in reducing cell proliferation, acting in a protective way (Figure 6).

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of nuclear receptors that comprise three isoforms: PPAR α , PPAR β and PPAR γ (Panigrahy et al., 2008). They are expressed in different organs in the body and have different functions as well (Roberts-Thomson, 2000). For instance, PPAR α is involved in lipid metabolism, inflammation, cell cycle progression and angiogenesis (Semple et al., 2006; Gurnel et al., 2007). Its role in inflammation was investigated in C57BL/6 mice that showed that PPAR α , their ligands and the respective activated genes are responsible for downregulating activated nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and its target genes (*IL-6*, *IL-12* and *COX-2*) (Poynter and Daynes, 1998). They observed that the administration of agents capable of activating PPAR α to aged mice restored the cellular redox balance, by lowering of tissue lipid peroxidation, elimination of activate NF- κ B and loss of spontaneous inflammatory cytokine production (Poynter and Daynes, 1998).

NF- κ B is an interesting target for anticancer drug development for many reasons, including mediation of tumor promotion (Garg and Aggarwal, 2002). The suppression of its expression limits cancer cell proliferation and reduce the damaged caused by inflammation (Luqman and Pezzuto, 2010). In our data, we observed an upregulation of *PPAR α* gene for the groups treated with NAC and 7.5% AP (Figure 6). Since there is evidence that *PPAR α* can reduce the protein expression of NF- κ B, we can infer that both treatments were efficient in reducing the oxidative stress, contributing to a reduction in cell proliferation ($p < 0.001$), tumor development and the inflammatory process in these animals. Analyzing NF- κ B protein expression would be interesting to confirm this thought.

Apoptosis inhibition, cell proliferation, metastasis, drug resistance, metabolism and radiation resistance are some of the functions of *AKT* (Roy et al., 2002; Sahlberg et al., 2016). There are three isoforms of this protein: *AKT1*, *AKT2* and *AKT3*. They present high homology, are expressed from different genes and have different physiological functions and expression patterns (Santi and Lee, 2010; Sahlberg et al., 2014). *AKT* is usually activated in tumors and, for this reason, inhibitors of this protein may have therapeutic value (Hollander et al., 2011).

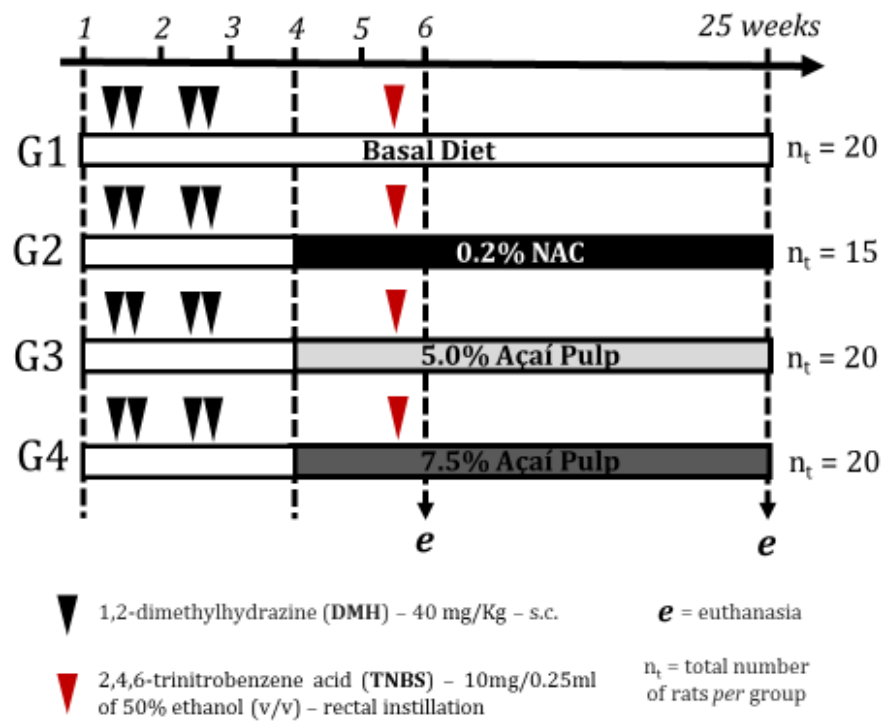
An imunohistochemical analysis showed that *AKT* is overexpressed in the pre-malignant stages of colorectal carcinogenesis, suggesting its role in the early inhibition of apoptosis (Roy et al., 2002). In contrast, Hollander and collaborators (2011) analyzed the three isoforms to check their individual role in *K-ras* mediated lung tumorigenesis, using genetically engineered deficient mice. They observed that *AKT1* prevented the development of tumors, whereas *AKT3* deletion increased tumor initiation and progression. Like *Dlc1*, *AKT3* seems to present a protective role in the colon carcinogenesis model proposed in this study. Since we did not find any relevant result regarding apoptosis index, it is more likely that *AKT3* acts as a tumor suppressor, by reducing cell proliferation.

In summary, our findings suggest that lyophilized açai pulp powder presented a protective effect on the colitis-associated colon carcinogenesis model in rats. In addition, these results confirm, for the first time, the beneficial action of lyophilized açai pulp in the proposed model based on macroscopic, microscopic and molecular analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

Mariana F. Fragoso was recipient of a fellowship from the FAPESP (2013/17600-0) and CAPES (PDSE 008192/2014-06). Luis F. Barbisan was recipient of a research grant from PROAP/CAPES.

FIGURES

**Figure 1.** Experimental design.

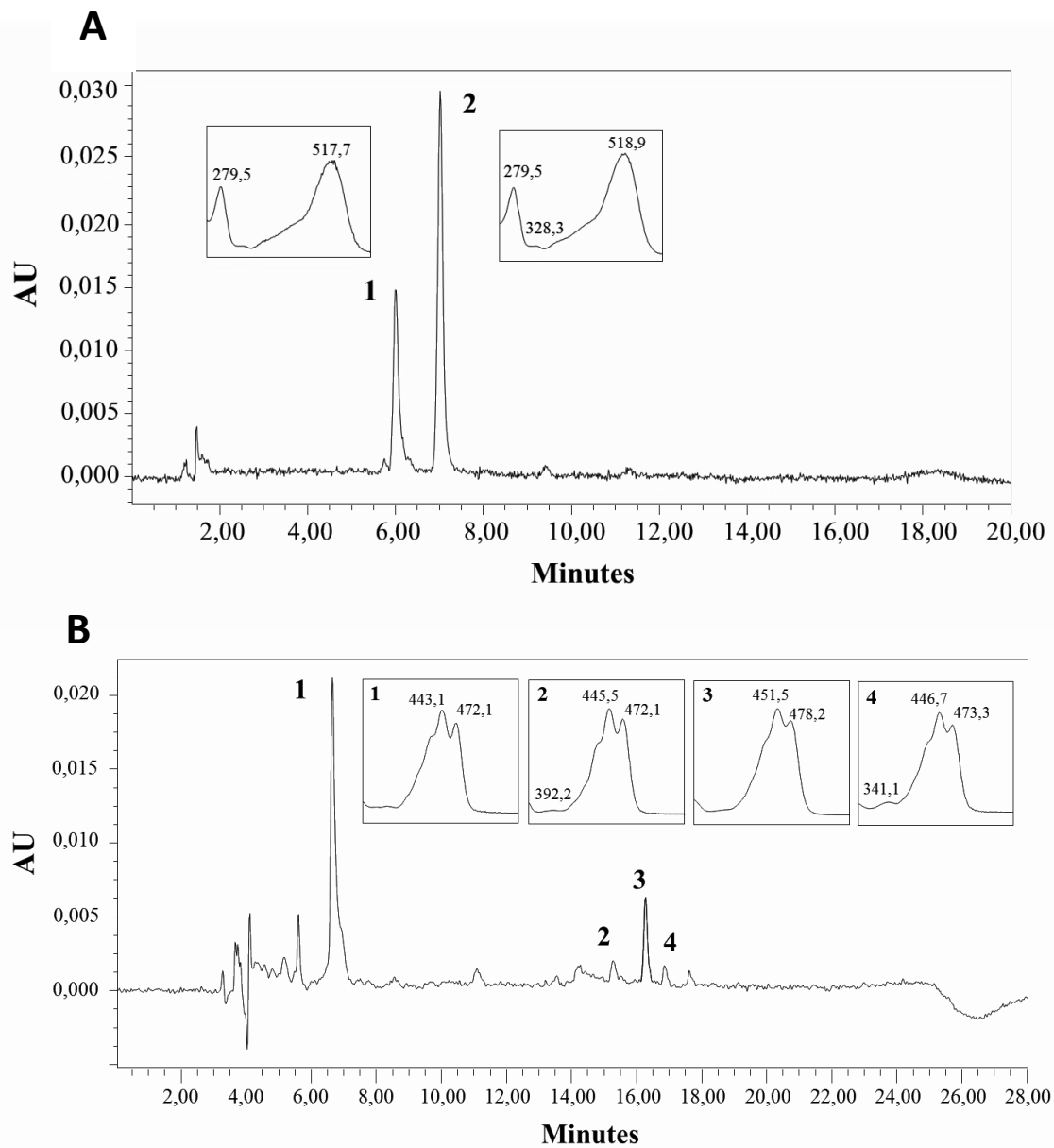


Figure 2. Chromatograms and UV-Vis spectra of **(A)** anthocyanins [peak identification: (1) cyanidin 3-glucoside and (2) cyanidin 3-rutinoside] and **(B)** carotenoids [peak identification: (1) lutein, (2) α -carotene, (3) β -carotene e (4) 9-cis β -carotene].

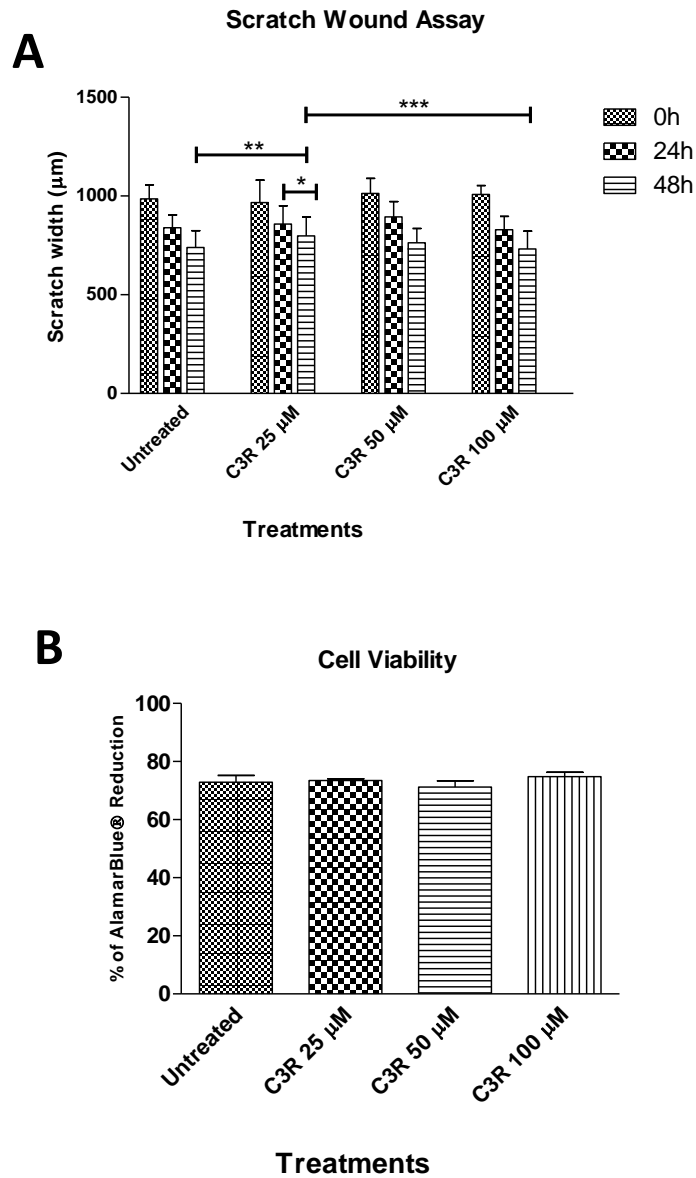


Figure 3. Motility assay data. **(A)** Bars represent mean \pm SD. Asterisks are used to show statistical differences ($*p=0.0579$ comparison between the 24h to 48h in the same group; $**p=0.0584$ compared to control group; $***p=0.0138$ compared to the C3R 100 mM). **(B)** Cell viability is represented by mean \pm SD.

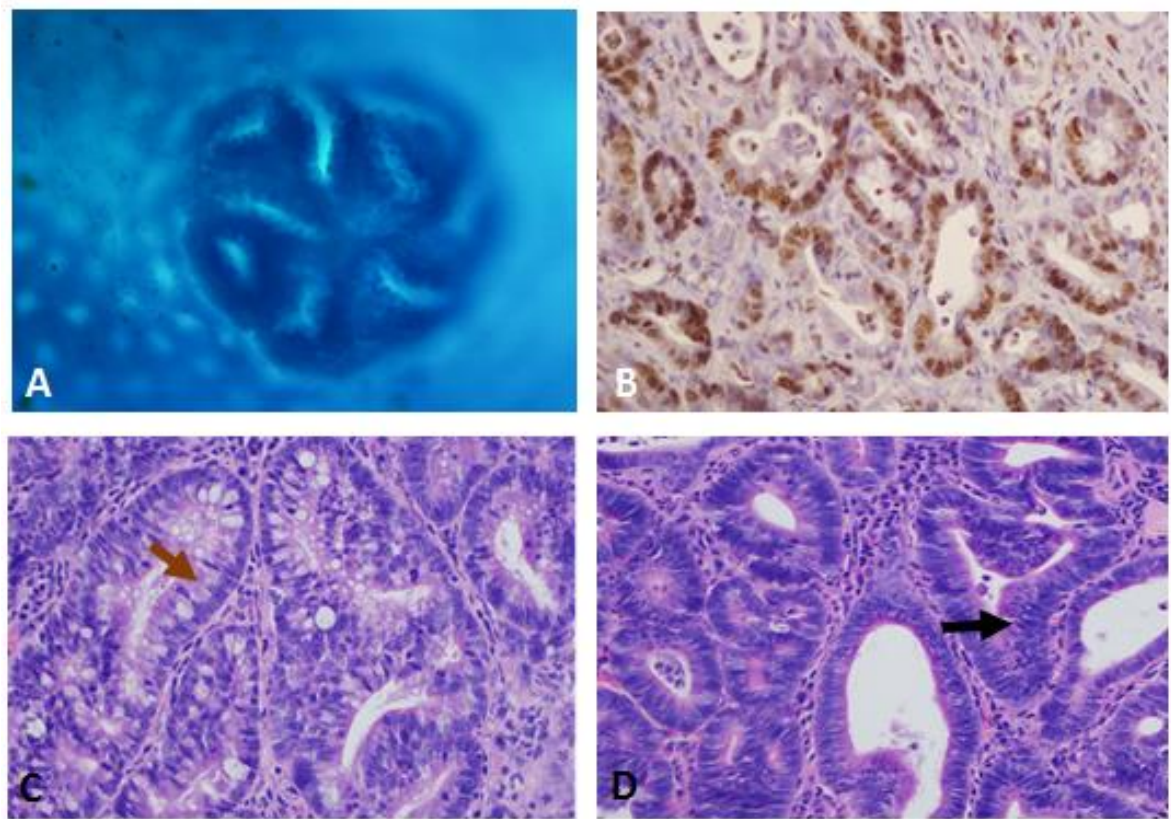


Figure 4. (A) Representative topographic view of classic ACF in a methylene blue-stained colon whole-mount containing five aberrant crypts (40X); (B) Representative Ki-67 immunostaining (brown nuclei) in a colon tumor (20X); (C) Representative microscopic view of one tumor with low grade dysplasia. Brown arrow indicates the crypt epithelium containing uniform, crowded and basally located nuclei and sparse goblet cells (40X); (D) Representative microscopic view of one tumor with high grade dysplasia. Black arrow shows the nuclear pseudostratification. (40X).

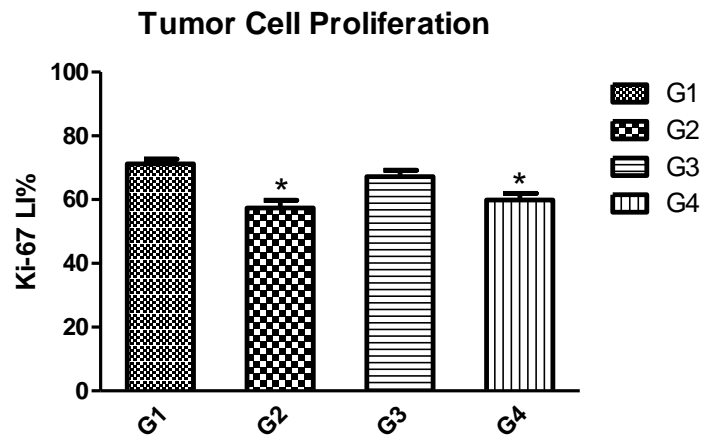


Figure 5. Ki-67 labeling index (LI%). *Different from G1 ($p < 0.001$). G1: DMH + TNBS [2,4,6-trinitrobenzene acid] + basal diet; G2: DMH + TNBS + basal diet with 0.2% NAC [N-acetylcysteine]; G3: DMH + TNBS + basal diet with 5% lyophilized açai pulp (AP); G4: DMH + TNBS + basal diet with 7.5% AP.

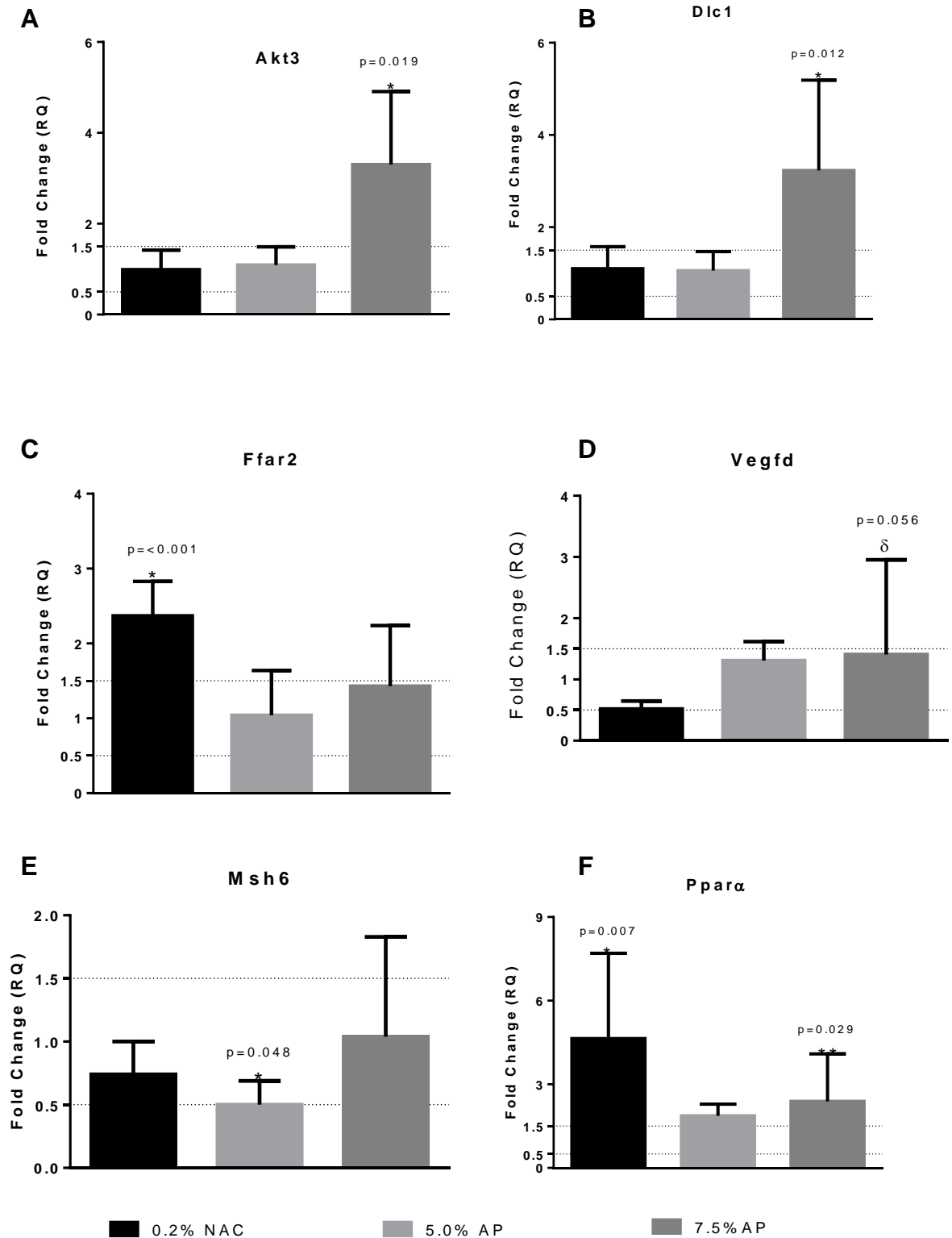


Figure 6. Relative quantitation of genes differently expressed in tumors treated with 5.0 and 7.5% AP and 0.2% NAC. All comparisons were realized against the untreated group (t-test). δ represents a tendency for the gene overexpression ($p=0.056$).

TABLES

Table 1. Phytochemical composition of the lyophilized açai pulp (AP)*.

Phytochemical composition	Amount
<i>Anthocyanins</i> <i>mg/100 g AP</i>	
Cyanidin 3-glucoside (C3G)	110.10 ± 4.39
Cyanidin 3-rutinoside (C3G)	214.09 ± 17.32
Total	324.19 ± 21.71
<i>Carotenoids</i> <i>µg/100 g AP</i>	
Lutein	367 ± 142.12
α-caroteno	458 ± 2.82
β-caroteno	1908.5 ± 4.24
13-cis β-caroteno	55.5 ± 37.47
9-cis β-caroteno	365 ± 2.12
Total	4234.5 ± 7.07

*AP analysis was performed in triplicate. Data are expressed as the Mean ± Standard Deviation (SD).

Table 2. Effects of lyophilized açai pulp (AP) intake on body weight, food and water consumption after 48 hours of TNBS instillation.

Parameters	Groups			
	Untreated	NAC	5% AP	7.5% AP
	G1	G2	G3	G4
<i>N</i>	20	15	20	20
Mean body weight (g) ¹	280.40 ± 15.13	258.66 ± 62.63	265.83 ± 27.38	264.50 ± 21.77
Body weight loss (g)	18.90 ± 17.82	13.08 ± 21.61	11.60 ± 11.0	0.85 ± 21.01*
Food consumption (g/rat/day)	20.56 ± 6.95	21.37 ± 7.54	20.19 ± 3.96	19.39 ± 5.02
Water consumption (mL/rat/day)	36.73 ± 19.22	37.12 ± 19.13	31.87 ± 17.60	35.35 ± 14.68
AP consumption (g/rat/day)	-	-	1.01 ± 0.19	1.45 ± 0.37
NAC consumption (g/rat/day)	-	0.04 ± 0.01	-	-

Data are expressed as Mean ± Standard Deviation (SD) and analyzed by ANOVA followed by Tukey post hoc test. *Different from G1 (p = 0.020). ¹Mean body weight was calculated one week before and one week after TNBS instillation.

Table 3. Effects of lyophilized açai pulp (AP) intake on body weight, food and water consumption after 25 weeks of DMH/TNBS treatment.

Parameters	Groups			
	Untreated	NAC	5% AP	7.5% AP
	G1	G2	G3	G4
<i>N</i>	14	10	15	15
Mean body weight (g)	353.39 ± 69.36	344.50 ± 63.02	348.06 ± 66.03	334.97 ± 61.59
Final body weight (g)	430.00 ± 43.76	419.50 ± 36.59	422.00 ± 50.65	410.4 ± 39.72
Body weight gain (g)	234.00 ± 42.42	206.00 ± 34.45	211.00 ± 50.25	203.00 ± 13.33
Food consumption (g/rat/day)	20.16 ± 5.06	20.64 ± 4.89	19.87 ± 3.65*	19.21 ± 3.43*
Water consumption (mL/rat/day)	30.23 ± 9.60	30.71 ± 9.95	26.96 ± 6.86*	28.08 ± 7.51*
AP consumption (g/rat/day)	-	-	0.994 ± 0.18	1.44 ± 0.25
NAC consumption (g/rat/day)	-	40 ± 10	-	-

Data are expressed as Mean ± Standard Deviation (SD) and analyzed by ANOVA followed by Dunn's post hoc test.

*Different from G1, $p < 0.001$

Table 4. Effects of lyophilized açai pulp (AP) intake on colonic aberrant crypt foci development at week 25.

Groups	N	ACF/colon total	AC total	Multiplicity		
				ACF 1-3	ACF 4-10	ACF>10
Untreated	14	222.4 ± 48.5	1366.8 ± 328.2	80.1 ± 31.5	100.57 ± 23.53	41.71 ± 13.24
NAC	10	166.4 ± 47.8	914.4 ± 290.7*	74.9 ± 23.36	62.9 ± 16.9 *	25.70 ± 11.38*
5.0% AP	15	138.0 ± 49.7*	790.5 ± 337.7*	53.5 ± 18.0§	62.07 ± 26.45*	21.47 ± 12.26*
7.5% AP	15	173.7 ± 59.2	1004.3 ± 354.3*	66.0 ± 30.78	79.4 ± 28.0	27.60 ± 11.21*

Data is expressed as Mean ± Standard Deviation (SD) and analyzed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

*Different from G1, $p < 0.001$; §Trend when compared to G1, $p = 0.056$.

Table 5. Effects of lyophilized açai pulp (AP) intake on colon tumor development at week 25.

<u>Total colon</u>	Untreated	NAC	5.0% AP	7.5% AP
Number of rats	10/15	5/10	12/15	12/15
Mean number of tumors	2.33 ± 2.19	1.50 ± 1.90	2.53 ± 2.45	1.67 ± 1.50
Tumor multiplicity	3.50 ± 1.72	3.0 ± 1.58	2.58 ± 2.15	2.08 ± 1.38
<u>Tumor Incidence</u>				
Low Grade Dysplasia (%)	60	80	87*	76
High Grade Dysplasia (%)	40	20	14*	24

Data are expressed as Mean ± Standard Deviation (SD) and analyzed by Chi-square's exact test. *G3 is different from G1 (p=0.019).

SUPPLEMENTARY DATA

Table 1S. Physicochemical composition of lyophilized açai pulp (AP).

Physicochemical composition	Concentration (g/100g)
Moisture	2.46 ± 0.007
Ash	3.41 ± 0.159
Lipid	47.36 ± 0.767
Protein	9.30 ± 0.941
Pectin soluble	3.92 ± 0.3977
Pectin total	25.97 ± 1.150
Total phenolic	0.832 ± 0.210
TA (g citric acid/100g)	0.13 ± 0.04
Available carbohydrate ^a	11.49
Kcal/100g ^b	509.4

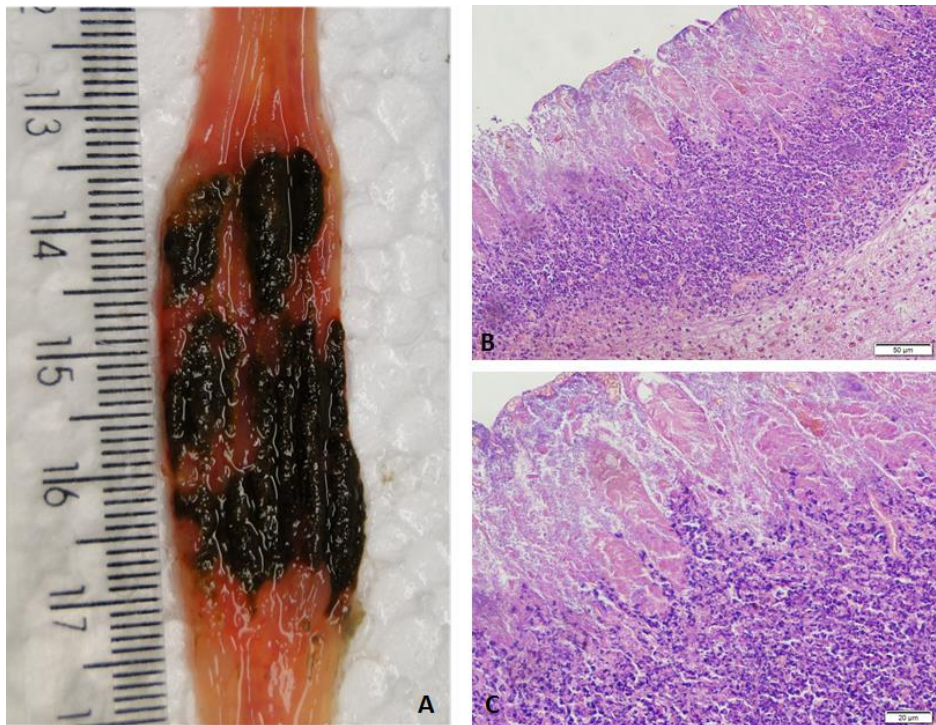


Figure 1S. Representative image of macroscopic and microscopic lesions obtained after TNBS intrarectal instillation. **(A)** Macroscopic view of the colonic lesion showing an evident crust of necrotic tissue and microscopically characterized by a coagulative necrosis process into site where TNBS was instilled; **(B)** H-E stained section of the necrotic tissue showing the infiltration of inflammatory cells (20X); **(C)** detailed microscopic view of the necrotic lesion (40X).

Table 2S. Effects of different treatments in the macroscopic and microscopic analysis of induced acute colitis.

Groups (n=5)	G1	G2	G3	G4
<u>Macroscopic evaluation</u>				
Inflammation score (0-10) ^a	5 (5,0)	4 (4,0)	4 (3,75)	5 (4,75)
Lesion extension (cm) ^b	3.12 ± 0.97	2.5 ± 1.06	3.0 ± 1.46	3.44 ± 0.38
Colon weigh (mg/cm) ^b	260.17 ± 73.31	253.17 ± 68.02	235.83 ± 50.95	299.10 ± 89.50
Adherence (%) ^c	60%	60%	60%	40%
Colon extension (cm) ^b	17.10 ± 2.074	15.80 ± 1.643	16.0 ± 1.0	16.60 ± 1.851
<u>Microscopic evaluation</u>				
Severity (0-3) ^{a,d}	2 (1)	1 (1) *	1 (1)	2 (2)
Thickness (0-3) ^{a,d}	2 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)
Damage (0-3) ^{a,d}	1 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)
Extent (0-3) ^{a,d}	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)

^aData are expressed as the median (range) and analyzed by Kruskal-Wallis test; ^bLesion extension, colon weight and colon extension are expressed as Mean ± SD and analyzed by ANOVA test; ^cAdherence was expressed in percentage and was analyzed by Chi-square/Fisher's exact tests; ^dThe severity of inflammation was graded on a scale from 0 to 3 (0 = no inflammation, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe), and the thickness of inflammatory involvement was ranged from 0 to 3 (0 = no inflammation, 1 = mucosa, 2 = mucosa plus submucosa and 3 = transmural). Additionally, the severity of epithelial damage was evaluated from 0 to 3 (0 = intact epithelium, 1 = disruption of architectural structure, 2 = erosion and 3 = ulceration) and extent of lesions was also calculated (0 = no lesions, 1 = punctuate, 2 = multifocal and 3 = diffuse) (Tian *et al.* 2013).

*Reduction in the severity for G2 (p=0.041).

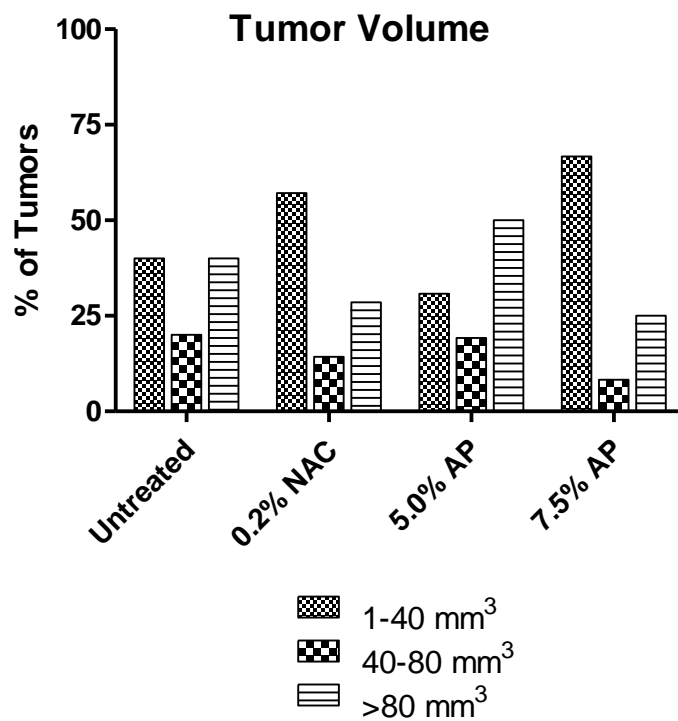


Figure 2S. Tumor volume. G1: DMH + TNBS [2,4,6-trinitrobenzene acid] + basal diet; G2: DMH + TNBS + basal diet with 0.2% NAC [N-acetylcysteine]; G3: DMH + TNBS + basal diet with 5% lyophilized açai pulp (AP); G4: DMH + TNBS + basal diet with 7.5% AP.

Table 3S. List of Genes used in the TaqMan Low Density Array analysis.

EntrezGene ID	Gene Symbol	Description
312382	<i>Abcg2</i>	Functions as a xenobiotic transporter which may play a role in multi-drug resistance to chemotherapeutic agents including mitoxantrone and camptothecin analogues.
81822	<i>Actb</i>	mRNA expression increases following axon injury; may play a role in acceleration of axonal outgrowth
24185	<i>Akt1</i>	Inhibits JUN kinase activation and mediates inhibition of apoptosis
25233	<i>Akt2</i>	May be involved in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) mediated signaling
29414	Akt3	Kinase that associates with both protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins
24205	<i>Apc</i>	Binds microtubules; may play a role in the regulation of cell polarity
299611	<i>Apc2</i>	Adenomatosis polyposis coli 2
290537	<i>App1</i>	The protein encoded by this gene has been shown to be involved in the regulation of cell proliferation, and in the crosstalk between the adiponectin signalling and insulin signalling pathways
64363	<i>Araf</i>	Proto-oncogene, serine/threonine kinase
79257	<i>Axin1</i>	Interacts with adenomatosis polyposis coli, catenin (cadherin-associated protein) beta 1, glycogen synthase kinase 3 beta, protein phosphatase 2, and itself
29134	<i>Axin2</i>	Inhibits axis formation; acts as a negative regulator of the Wnt signaling pathway by inducing GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin
64639	<i>Bad</i>	May be involved in induction of programmed cell death
24887	<i>Bax</i>	Bcl2-related gene; involved in the regulation of apoptotic cell death
24224	<i>Bcl2</i>	An anti-apoptotic protein; involved in inhibiting cell death in many different cell types
29373	<i>Bmp2</i>	Involved in cellular signaling during limb development; induces bone formation
114486	<i>Braf</i>	Human homolog is a serine/threonine kinase; mutation of gene is associated with human cancers
25402	<i>Casp3</i>	Apoptotic protease that may play a role in cell death regulation and other apoptotic processes
58918	<i>Casp9</i>	Plays a role in initiation and progression of apoptosis
114494	<i>Ccna2</i>	Human homolog plays a role in regulation of DNA synthesis and of mitosis
363088	<i>Ccnb2</i>	Cyclin B2 also binds to transforming growth factor beta RII and thus cyclin B2/cdc2 may play a key role in transforming growth factor beta-mediated cell cycle control
58919	<i>Ccnd1</i>	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6; regulation of the G1/S transition of the cell cycle
25729	<i>Ccne1</i>	A cyclin-like protein; may be involved in growth stimulation
83502	<i>Cdh1</i>	Cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation
314322	<i>c-Fos</i>	An immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction

29527	Cox 2	It is involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H2, an important precursor of prostacyclin and thromboxane A2
314638	Creb3l3	Positive regulation of acute inflammatory response; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
84353	Ctnnb1	Involved in mediating the interaction between cadherins and the actin cytoskeleton
25309	Cyts	A component of the electron transport chain in mitochondria, may function in apoptosis
25310	Cyct	Specific cytochrome c
50549	Cyp4a1	Arachidonic acid monooxygenase; catalyzes the hydroxylation of omega-terminal carbon of the arachidonic acid
25311	Dcc	Deleted in colorectal cancer; play dual roles as receptor e other signaling pathways
58834	Dlc1	It is suggested that this gene is a candidate tumor suppressor gene for human liver cancer, as well as for prostate, lung, colorectal, and breast cancers
292794	Ffar2	May be involved in the inflammatory response and in regulating lipid plasma levels
314322	Fos	An immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction
317674	Fzd5	Forms a receptor complex with Lpr6 that binds Wnt7A proteins
24383	<i>Gapdh</i>	Encodes a member of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein family
24392	Gja1	Gap junction component; plays a role in cell-cell communication
84027	Gsk3b	Gsk3b mediates Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex regulation; may induce apoptosis
24423	Gstm1	Enzyme with scavenger function; able to neutralize harmful metabolites
25260	Gstt1	Subunit of the glutathione S-transferase
24434	<i>Gusb</i>	Catalyzes the conversion of a beta-D-glucuronoside and H2O to an alcohol and Dglucuronate
363287	Hdac4	Human homolog is a component of the DNA damage response pathway and is also involved in repression of muscle differentiation
24451	Hmox 1	Catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin
24465	<i>Hprt1</i>	Catalyzes the conversion of IMP and diphosphate to hypoxanthine and 5-phospho-alphaD-ribose 1-diphosphate
25670	IL-15	Human homolog is a cytokine involved in the regulation of T and natural killer cell activation and proliferation
24599	iNoS	Cytokine-inducible enzyme involved in nitric oxide (NO) production
24516	Jun	Transcription factor; acts as a protooncogene
24525	Kras	Oncogene and member of the small GTPase superfamily
161452	Lef1	Enhancer binding factor has 98% amino acid homology with mouse Lef-1
294235	ler3	Mouse homolog plays a role in regulation of T cell proliferation

100363502	LOC100363502	cytochrome c, somatic-like
170851	Map2k1	Kinase that activates Mapk3 (Erk1) and Mapk1 (Erk2) kinases
116590	Mapk1	Kinase involved in intracellular signaling; component of Mapk signaling pathway
25272	Mapk10	Involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development
50689	Mapk3	Kinase involved in intracellular signalling; component of Mapk signalling pathway
116554	Mapk8	Involved in a wide variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, transcription regulation and development.
50658	Mapk9	Involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development.
291234	Mki67	Marker of cell proliferation Ki-67
81685	Mlh1	May be involved in DNA mismatch repair
81709	Msh2	Mismatch repair protein
499505	Msh3	DNA mismatch repair protein
100360342	Msh6	May be involved in DNA mismatch repair
24577	Myc	The protein encoded by this gene is a multifunctional, nuclear phosphoprotein that plays a role in cell cycle progression, apoptosis and cellular transformation.
309295	Nemo	Regulatory subunit of the I kappa B kinase complex, which phosphorylates and activates NF kappa B
170911	Pik3ca	Expression of the human homolog is associated with increased cell proliferation and decreased apoptosis and may play a role in ovarian cancer progression
85243	Pik3cb	May play a role in hepatocyte proliferation and DNA replication
366508	Pik3cd	Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) phosphorylate inositol lipids and are involved in the immune response
25513	Pik3r1	Phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylates the inositol ring of phosphatidylinositol at the 3-prime position
29741	Pik3r2	Regulatory subunit of the enzyme phosphatidylinositol 3-kinase; involved in cellular signaling mechanisms
60664	Pik3r3	Regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, a mediator of various cellular signaling mechanisms
497931	Pik3r5	Play important roles in cell growth, proliferation, differentiation, motility, survival and intracellular trafficking
25747	Ppara	Nuclear steroid receptor; heterodimerizes with retinoid-X receptor (RXR), and binds to peroxisome proliferator response elements (PPREs) to initiate the transcriptional regulation of target genes
363875	Rac1	Regulator of many cellular processes, including the cell cycle, cell-cell adhesion, motility (through the actin network), and of epithelial differentiation
366957	Rac2	Regulate a diverse array of cellular events, including the control of cell growth, cytoskeletal reorganization, and the activation of protein kinases
24703	Raf1	Acts as a mitogenic protein kinase; mutant forms may play a role in transformation

29622	Ralgds	Facilitates conversion of Ras-related GTPase
117273	Rhoa	Regarded as a prominent regulatory factor in other functions such as the regulation of cytoskeletal dynamics, transcription, cell cycle progression and cell transformation
10086153S	<i>Rn18S</i>	This gene represents the portion of one rDNA repeat which encodes the 18S RNA
297173	RSA-14-44	A member of the rho/ras family of small GTPases
29357	Smad2	Transcriptional mediator for both activin and TGF-beta
25631	Smad3	Transcription factor; important component of the TGF-beta signaling pathway
50554	Smad4	Transduces signal from TGF-beta; deletion of is associated with pancreatic carcinomas
24786	Sod1	Conversion of superoxide to molecular oxygen; involved in response to oxidative stress
363595	Tcf7	The encoded protein can bind an enhancer element and activate the CD3E gene, and it also may repress the CTNNB1 and TCF7L2 genes through a feedback mechanism
679869	Tcf7l2	Transcription factor influencing the transcription of several genes thereby exerting a large variety of functions within the cell
59086	Tgfb1	Binds the TGFbeta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation
81809	Tgfb2	Binds the transforming growth factor-beta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation; may be involved in mesenchymal-epithelial cell interactions during development
25717	Tgfb3	Involved in epithelial and endothelial cell proliferation and differentiation during development
29591	Tgfbr1	Oncogene and member of the small GTPase superfamily
81810	Tgfbr2	Receptor for TGF-beta; may play a role in lung maturation and response to hypoxia
24835	Tnf	Acts as a cytokine; binds TNF receptors; plays a role in regulation of cell proliferation, induction of apoptosis, and inflammatory response
24842	Tp53	Regulates cell cycle arrest, apoptosis, senescence and DNA repair
360457	Vegfd	Binds to and activates the tyrosine kinase receptor VEGFR-3 and VEGFR-2; involved in positive regulation of lymphatic blood vessel growth
114557	Wif1	Human homolog has decreased mRNA expression in some prostate cancers and other cancers; may act as a secreted inhibitor of the Wnt signaling pathway
114487	Wnt	Member of a family of secreted glycoproteins that play a role in regulation of cell growth, differentiation, and tumorigenesis
63879	Xiap	Involved in directly inhibiting key apoptotic proteases, caspase 3 and 7

All genes were inventoried. Genes in **bold** were found differently expressed among groups. Genes in *italic* were the endogenous controls available in the assay.

REFERENCES

1. Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlat M, et al. Aberrant Crypt Foci. *Anticancer research*. 2006;120:107–19.
2. AOAC (2006). *Official methods of analysis* (18th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists (Methods 934.01; 942.05; 984.12; 985.29).
3. Banerjee N, Kim H, Talcott S, Mertens-Talcott S. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: Possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/ AKT/mTOR. *Carcinogenesis*. 2013;34(12):2814–22.
4. Bingham S, Day N, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003;361:1496–501.
5. Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett*. 2000;395–402.
6. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer letters*. 1987;37:147-151.
7. Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959; 37(8), 911–917.
8. Brenna Ø, Furnes MW, Drozdov I, van Beelen Granlund A, Flatberg A, Sandvik AK, et al. Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histological and transcriptomic characterization and correlation to IBD. *PLoS One*. 2013;8(1):e54543.
9. Brito, E.S., Araujo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., & Novotny, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55:9389–9394.
10. Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Biol*. 2009;17(1):9–26.

11. Cardoso LM, Novaes RD, de Castro CA, Novello AA, Goncalves RV, Ricci-Silva ME, et al. Chemical Composition, Characterization of Anthocyanins and Antioxidant Potential of *Euterpe edulis* Fruits: Applicability on Genetic Dyslipidemia and Hepatic Steatosis in Mice. *Nutr Hosp*. 2015;32:702–9.
12. Carvalho AV, Ferreira Ferreira da Silveira T, Mattietto R de A, Padilha de Oliveira M do S, Godoy HT. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. *J Sci Food Agric*. 2016; DOI 10.1002/jsfa.7886.
13. Chen P, Chu S, Chiou H, Kuo W. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer letters*. 2006;235:248–59.
14. Choi YJ, Choi YJ, Kim N, Nam RH, Lee S, Lee HS, et al. Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane / Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. 2016;1–11.
15. Clapper ML, Cooper HS, Chang W-CL. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(9):1450–9.
16. Das D, Arber N, Jankowski J a. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*. 2001;76(1):51–67.
17. de Moura N a, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues M a M, et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(8):2902–10.
18. De Rosso V, Hillebrand S, Cuevas Montilla E, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *J Food Compos Anal*. 2008;21(4):291–9.
19. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2004;52(6):1539–45.

20. Denholm B, Brown S, Ray RP, Ruiz-Gómez M, Skaer H, Castelli-Gair Hombría J. crossveinless-c is a RhoGAP required for actin reorganisation during morphogenesis. *Development*. 2005;132(10):2389–400.
21. Dias MC, Vieiralves NFL, Gomes MIF V, Salvadori DMF, Rodrigues M a M, Barbisan LF. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(3):772–80.
22. El-agamey A, Lowe GM, Mcgarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004;430:37–48.
23. Fan M-J, Wang I-C, Hsiao Y-T, Lin H-Y, Tang N-Y, Hung T-C, et al. Anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* L.) demonstrate antimetastatic properties by reducing MMPs and NF- κ B expressions in human oral cancer CAL 27 cells. *Nutr Cancer*. 2015;67(2):327–38.
24. Femia A Pietro, Giannini A, Fazi M, Tarquini E, Salvadori M, Roncucci L, et al. Identification of mucin depleted foci in the human colon. *Cancer Prev Res*. 2008;1(7):562–7.
25. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) Intake. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012;67(3):235–41.
26. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro D a, Barbisan LF. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:68–76.
27. Francis FJ. Food colorants: anthocyanins. *Food Science and Nutrition*. 1982;28:273-314.
28. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor- kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002;16(6):1053–68.
29. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
30. Gordon A, Paula A, Cruz G, Maria L, Cabral C, Cordeiro S, et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. 2012;133:256–63.

31. Gouvêa, A. C. M. S., Araujo, M. C. P., Schulz, D. F., Pacheco, S., Godoy, R. L. O., & Cabral, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyaniding-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2012;32, 43–46.
32. Gouvêa, A.C.M.S., Melo, A., Santiago, M.C.P.A., Peixoto, F.M., Freitas, V., Godoy, R.L.O., & Ferreira, I.M.P.L.V.O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. *Food Chemistry*. 2015;185, 277–283.
33. Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*. 2006;127(4):679–95.
34. Gurnell M. Striking the right balance in targeting PPAR γ in the metabolic syndrome: novel insights from human genetic studies, *PPAR Res*. 2007;1–14.
35. Hagiwara A, Yoshino H, Ichihara T, Kawabe M, Tamano S, Aoki H, et al. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J Toxicol Sci*. 2002;27(1):57–68.
36. Hamilton, SR, Aaltonen, LA. World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics, vol. 6. IARC Press. 220;p. 103.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
38. Hendry GAF and Houghton JD. Natural Food Colorants. London: Blackie Academic. 1992; p.183-241.
39. Hollander MC, Maier CR, Hobbs EA, Ashmore AR, Linnoila RI and Dennis PA: Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras. *Oncogene*. 2011;30:1812-1821.
40. INCA - Instituto Nacional do Câncer - Estatística sobre a incidência de câncer colorretal na população brasileira. Brasil, 2016. (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>). Acessado em Outubro 2, 2016.

41. Kahyat, T. Comportamento de risco para doença aterosclerótica coronariana na população de Inhangapí cuja base alimentar é o fruto do açaí (*Euterpe oleracea*), Belém do Pará: Universidade Federal do Pará. Curso de Medicina, Departamento de Clínica Médica, 2005.
42. Lahoz A, Hall A. DLC1: A significant GAP in the cancer genome. *Genes Dev.* 2008;22(13):1724–30.
43. Lala G, Malik M, Zhao C, He J, Kwon Y, Giusti MM, Magnuson BA. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutrition and cancer.* 2006;54:84-93.
44. Liang C, Park AY, Guan J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols.* 2007;2(2):329–33.
45. Lichtenthäler R, Rodrigues RB, Maia JGS, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutr.* 2005;56:53–64.
46. Lofano K, Principi M, Scavo MP, Pricci M, Ierardi E, Di Leo A. Dietary Lifestyle and Colorectal Cancer Onset, Recurrence, and Survival: Myth or Reality? *J Gastrointest Cancer.* DOI 10.1007/s12029-012-9425-y, 2012.
47. Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Color Dis.* 2012;14(4):157–64.
48. Luqman S, Pezzuto JM. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* 2010;24(7):949–63.
49. Machado FS de, Kuo J, Wohlenberg MF, da Rocha Frusciantes M, Freitas M, Oliveira AS, et al. Subchronic treatment with acai frozen pulp prevents the brain oxidative damage in rats with acute liver failure. *Metabolic Brain Disease;* 2016; DOI 10.1007/s11011-016-9873-3.
50. Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia L a, Meibohm B, Talcott ST, et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2008;56(17):7796–802.

51. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: Biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol. British Journal of Pharmacology*. 2016; DOI:10.1111/bph.13625.
52. Mori H, Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hara A. Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact*. 2005;155(1–2):1–9.
53. Moshkowitz M, Shapira S, Arber N. Chemoprevention for advanced CR neoplasia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(4–5):623–30.
54. Oetjen GW, Haseley P. *Freeze-drying*, 2nd edition, Weinhen: Wiley-VCH, 2004.
55. Pacheco-Palencia L a, Talcott ST, Safe S, Mertens-Talcott S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. *J Agric Food Chem*. 2008;56(10):3593–600.
56. Pacheco-Palencia L a., Mertens-Talcott SU, Talcott ST. In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem*. 2010; 119(3):1071–8.
57. Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnés CM, Fannon M, et al. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(3):985–90.
58. Paz M, Gúllon P, Barroso MF, Carvalho AP, Domingues VF, Gomes AM, et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chem*. 2015;172:462–8.
59. Pereira RR, Cristina I, Emerich M, Ferreira J, Lage NN, Márcia J, et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Upregulates Paraoxonase 1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2016, Article ID 8379105, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8379105>.
60. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappa B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32833–41.
61. Qian X, Durkin ME, Wang D, Tripathi BK, Olson L, Yang X-Y, et al. Inactivation of the Dlc1 gene cooperates with downregulation of p15INK4b and p16Ink4a, leading

- to neoplastic transformation and poor prognosis in human cancer. *Cancer Res.* 2012;72(22):5900–11.
62. Ribeiro JC, Antunes LMG, Aissa AF, Darin JDC, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res.* 2010;695(1–2):22–8.
63. Roberts-Thomson SJ. Peroxisome proliferator-activated receptors in tumorigenesis: Targets of tumour promotion and treatment. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(4):436–41.
64. Rodrigues RB, Lichtenthäler R, Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2006;54(12):4162–7.
65. Rodriguez-Amaya, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods (1st edition). Washington: ILSI Press. 2001.
66. Romualdo GR, Fragoso MF, Borguini RG, de Araújo Santiago MCP, Fernandes AAH, Barbisan LF. Protective effects of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. *Food Res Int.* 2015;77:432–40.
67. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL et al., “AKT proto- oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis,” *Carcinogenesis.* 2002;23:201– 205.
68. Sahlberg SH, Gustafsson AS, Pendekanti PN, Glimelius B, Stenerlöw B. The influence of AKT isoforms on radiation sensitivity and DNA repair in colon cancer cell lines. *Tumor Biol.* 2014;35(4):3525–34.
69. Sahlberg SH, Mortensen A, Haglof J, Engskog M, Arvidsson T, Pettersson C, et al. Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2016;1–10.
70. Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(3):C580–91.

71. Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(3):C580–91.
72. Santos VS, de Almeida Teixeira GH, Barbosa F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): A Tropical Fruit with High Levels of Essential Minerals-Especially Manganese-and its Contribution as a Source of Natural Mineral Supplementation. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(1–3):80–9.
73. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006a;54(22):8604–10.
74. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006b;54(22):8598–603.
75. Semple RK, Chatterjee RKK, Rahilly SO. PPAR γ and human metabolic disease, *J. Clin. Investig*. 2006;116:581–589.
76. Silva DF, Castello F, Vidal B, Santos D, Célia M, Costa P, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;1–9.
77. Silva PPM, Carmo LF, Silva GM, Silveira-Diniz MF, Casemiro RC, Spoto MH. Physical, Chemical, and Lipid Composition of Juçara (*Euterpe Edulis* Mart.) Pulp. *Braz J Food Nutr*. 2013;24:7–13.
78. Souza MC De, Figueiredo RW. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity on Fruits from Different Açai (*Euterpe oleracea* Mart) Progenies. *Acta Hort*. 2009;455–8.
79. Spada PDS, Dani C, Bortolini G V, Funchal C, Henriques J a P, Salvador M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *J Med Food*. 2009;12(5):1084–8.
80. Spada PDS, Gianna G, Souza N De, Bortolini GV, Henriques JAP, Salvador M. Antioxidant, Mutagenic, and Antimutagenic Activity of Frozen Fruits. 2008;11(1):144–51.

81. Stoner GD, Wang L-S, Seguin C, Rocha C, Stoner K, Chiu S, et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. *Pharm Res.* 2010;27(6):1138–45.
82. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Kukitsu T, Takanashi K, Ishiwatari H, et al. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;S42-5.
83. Tanaka SS, Kojima Y, Yamaguchi YL, Nishinakamura R, Tam PPL. Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. *Dev Growth Differ.* 2011;53(7):843–56.
84. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004;58:100–10.
85. Tomayko MM, Reynolds CP. Cancer chemotherapy and pharmacology Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer, Chemotherapy and Pharmacology.* 1989;148–54.
86. Tonon R V., Brabet C, Hubinger MD. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Res Int.* 2010;43(3):907–14.
87. Torres T, Farah A. Coffee, maté, açai and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilian's diet. *Eur J Nutr.* 2016;1–11.
88. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J.* 2011;10(1):45.
89. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2010;10(12):842–57.
90. Wu P, Jin Y, Shang Y, Jin Z, Wu P, Huang P. Restoration of DLC1 gene inhibits proliferation and migration of human colon cancer HT29 cells. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(3):263–9.
91. Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, Da Veiga-Junior VF. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem.* 2015;179:137–51.

92. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2016; 1-13.
93. Zielinski AAF, Ávila S, Ito V, Nogueira A, Wosiacki G, Haminiuk CWI. The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. *J Food Sci*. 2014;

Anexo A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA</p>		 Comissão de Ética no Uso de Animais
			 Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
<h1>Certificado</h1>			
<p>CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1041-2013) "Efeitos da ingestão da polpa de açaí liofilizada (<i>Euterpe oleracea</i> Mart) no processo de carcinogênese de cólon associada à colite em ratos Wistar", a ser conduzido por Mariana Franco Fragoso, orientada pelo Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>			
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 29/08/2013</p>			
 Prof ^a Adjunta Noeme Sousa Rocha Presidente no exercício da CEUA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEUA		
<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>			

Anexo B - Análise das amostras de RNA dos diferentes grupos experimentais.

<i>ID</i> ¹	<i>Concentração</i> (ng/μL)	<i>260/280</i>	<i>RIN</i> ²
<u>G1</u>			
1	1372,0	1.294	7,6
2	326,4	2.076	8,5
3	650	2.025	9,2
4	3118	1.608	7,1
5	1014	1.884	7,1
<u>G2</u>			
6	591,6	2.010	6,7
7	586	2.010	10
8	600	2.033	8,3
9	423	2.066	10
10	2590	1.918	9,1
<u>G3</u>			
11	122,8	2.020	7,4
12	331,2	2.010	7,4
13	619	1.985	8,3
14	350,8	2.035	7,9
15	424,4	2.033	8,3
<u>G4</u>			
16	23,6	2.161	6,8
17	1238	1.829	7,6
18	359,2	1.966	8,9
19	456,0	2.004	10
20	333,2	1.998	9

¹ID = identificação da amostra; ²RIN = RNA Integrity Number.

Anexo C – Publicações exigidas para a defesa.



Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis



Mariana F. Fragoso^a, Guilherme R. Romualdo^b, Daniel A. Ribeiro^c, Luis F. Barbisan^{b,*}

^a UNESP – Univ. Estadual Paulista, School of Medicine, Program of Post-Graduation in Pathology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil

^b UNESP – Univ. Estadual Paulista, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil

^c UNIFESP, Federal University of Sao Paulo, Department of Biosciences, 11060-001 Santos, SP, Brazil



Protective effects of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis

Guilherme Ribeiro Romualdo^a, Mariana Franco Fragoso^a, Renata Galhardo Borguini^b,
Manuela Cristina Pessanha de Araújo Santiago^b, Ana Angélica Henrique Fernandes^c, Luis Fernando Barbisan^{d,*}

^a UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil

^b Embrapa Food Technology, Guaratiba 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c UNESP – Univ. Estadual Paulista, Biosciences Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, Botucatu 18618-970, SP, Brazil

^d UNESP – Univ. Estadual Paulista, Biosciences Institute, Department of Morphology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil

A. Publicação do trabalho de mestrado; **B.** Publicação realizada com tema similar ao tema da tese publicado durante o Doutorado.

Anexo D – Atividades complementares realizadas durante o Doutorado.

Atividades	
2013	
Eventos	<ul style="list-style-type: none"> Participou como expositora, representando o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu no evento: "Venha Conhecer o IB", realizado no dia 22 de agosto de 2013; A Faculdade de Medicina de Botucatu e a Pesquisa nos próximos 50 anos (8 a 9 de novembro de 2013);
Resumos	<ul style="list-style-type: none"> FRAGOSO, MARIANA F.; BARBISAN, L.F. Açai (Euterpe olecareae Martius) intake and its protective effect against 1,2-DMH-induced rat colon carcinogenesis. In: Advanced School of Comparative Oncology - ESPCA, 2013, Águas de São Pedro. BMC Proceedings, 2013. v. 7. p. 48-48 (Trabalho publicado com dados do Mestrado).
Artigos	<ul style="list-style-type: none"> FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G.R.; RIBEIRO, D. A.; BARBISAN, L.F. Açai (Euterpe oleracea Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Food and Chemical Toxicology, v. 58, p. 68-76, 2013. (Trabalho publicado com dados do Mestrado).
Outros	<ul style="list-style-type: none"> Mini-curso ministrado: Quimioprevenção do câncer com produtos naturais (2013), no evento Workshop da Pós-Graduação da IBB/Unesp Botucatu (4 a 8 de junho de 2013); Estágio em docência na disciplina de Histologia para o curso de Medicina.
2014	
Eventos	<ul style="list-style-type: none"> International Fall School - System Biology in Cancer Research* (AC Camargo, FMB-UNESP e Universidade de Montreal) – em São Paulo-SP e Botucatu-SP – 22 a 29 de abril de 2014. FeSBE Regional – em João Pessoa, PB, Brasil. International Summer School – Molecular Biology (AC Camargo, FMB-UNESP e Universidade de Montreal) – em Montreal, Quebec, Canadá – 14 de julho a 01 de agosto de 2014.
Resumos	<ul style="list-style-type: none"> ROMUALDO, G. R.; FRAGOSO, M. F.; FERNANDES, A. A.; BARBISAN, L.F. INHIBITORY EFFECTS OF DIETARY AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA) PULP POWDER ON COLON CARCINOGENESIS INDUCED BY AZOXYMETHANE IN MICE. In: VIII Encontro de Pós-Graduação da FMB/UNESP, 2014, Botucatu. VIII Encontro de Pós-Graduação da FMB/UNESP, 2014. v. 8. ROMUALDO, G. R.; FRAGOSO, M. F.; FERNANDES, A. A. H.; BARBISAN, L. F. Inhibitory Effects of Dietary Açai (Euterpe Oleracea) Pulp Powder on Colon Carcinogenesis induced by Azoxymethane in Mice. In: XIII Workshop da Pós-Graduação, 2014, Botucatu. XIII Workshop da Pós-Graduação, 2014. FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; FERNANDES, A. A.; BARBISAN, L. F. Protective effects of açai pulp intake on early DNA damage and aberrant crypt foci development in male Swiss mice. FeSBE, 2014.

	<ul style="list-style-type: none"> ROMUALDO, G. R.; GRASSI, T. F.; FRAGOSO, M. F.; BARBISAN, L. F. Gestational exposure to genistein inhibits the deleterious effects of bisphenol-A on uterine development of Sprague-Dawley rats offspring. FeSBE, 2014.
Outros	<ul style="list-style-type: none"> Realização de experimentação em biotério e análises em laboratório.
2015	
Eventos	<ul style="list-style-type: none"> AACR Anual Meeting 2015 (Filadélfia, EUA)
Resumos	<ul style="list-style-type: none"> FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; PELLIZZON, C. H.; BARBISAN, L. F. Açai intake reduces the aberrant crypt foci development in a colitis-associated carcinogenesis model in male Wistar rats. 2015.
Artigos	<ul style="list-style-type: none"> ROMUALDO, GUILHERME RIBEIRO; FRAGOSO, MARIANA FRANCO; BORGUINI, RENATA GALHARDO; DE ARAÚJO SANTIAGO, MANUELA CRISTINA PESSANHA; FERNANDES, ANA ANGÉLICA HENRIQUE; BARBISAN, LUIS FERNANDO. Protective effects of spray-dried açai (Euterpe oleracea Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. Food Research International, v. 77, p. 432-440, 2015.
Outros	<ul style="list-style-type: none"> Estágio de 12 meses no Fox Chase Cancer Center (Filadélfia, EUA), sob orientação da Dra. Margie L. Clapper.
2016	
Eventos	<ul style="list-style-type: none"> XXXI Reunião Anual da FeSBE – Foz do Iguaçu, PR, Brasil. 25th AICR Research Conference Celebrating a Generation of Cancer Research – North Bethesda, MD, EUA.
Resumos	<ul style="list-style-type: none"> FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; BARBISAN, L. F. Chemopreventive evaluation of lyophilized açai pulp intake in a colitis-associated colon carcinogenesis model in rats. In: 25th AICR Research Conference Celebrating a Generation of Cancer Research, 2016, Bethesda. 25th AICR Research Conference Celebrating a Generation of Cancer Research. Washington, DC: AICR Research Department, 2016. p. 22-22. FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; VANDERVEER, L.; FRANCO-BARRAZA, J.; CUKIERMAN, E.; CLAPPER, M. L.; BARBISAN, LUIS FERNANDO. Effects of açai and its isolated anthocyanin cyaniding 3-rutinoside (C3R) on rat colon tumor growth and on RKO colon tumor cells. 2016.
Outros	<ul style="list-style-type: none"> Estágio em docência na disciplina de Morfologia para o curso de Nutrição. Finalização dos experimentos e escrita do artigo.