

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

**EFEITO PROTETOR DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MARTIUS) NA  
PROMOÇÃO DA CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON EM RATOS WISTAR**

**MESTRANDA: MARIANA FRANCO FRAGOSO**

**ORIENTADOR: LUÍS FERNANDO BARBISAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**BOTUCATU - SP**

**2013**

**MARIANA FRANCO FRAGOSO**

**EFEITO PROTETOR DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MARTIUS) NA  
PROMOÇÃO DA CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON EM  
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**ORIENTADOR: LUÍS FERNANDO BARBISAN**

**BOTUCATU – SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Fragoso, Mariana Franco.

Efeito protetor do açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) na promoção da carcinogênese química de cólon em ratos Wistar. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Capes: 40105008

1. Açaí - Uso terapêutico. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer - Prevenção.  
3. Reto - Câncer - Prevenção.

Palavras-chave: Açaí, Focos de Criptas Aberrantes, Prevenção, Tumores de cólon.

*Dedicatória*

*A meu Deus:*

*Por ter me abençoado em todos os momentos, por sempre ter iluminado meu caminho, por ter me dado forças para superar a saudade e as dificuldades e, principalmente, pela realização de um sonho!*

*“Façamos do próprio caminho abençoado, manancial de trabalho e fraternidade, auxílio e esperança, a fim de que o nosso Hoje Laborioso se converta para nós em Divino Amanhã.”*

Chico Xavier

*A toda minha família:*

*Aos meus pais, **Amauri** e **Onélia**, e aos meus irmãos **Matheus** e **Marina**. Pelo apoio, compreensão e amor. Pela mão estendida e lágrimas enxugadas e pela força para nunca desistir. Sem o apoio de cada um de vocês, eu não teria conseguido! Amo vocês!*

*Agradecimento especial*

*Ao meu orientador, Prof. Luís Fernando Barbisan:*

*Obrigada pela oportunidade dada, confiança, paciência e competência. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos passados, não apenas como pesquisador, mas também como ser humano.*



*Agradecimientos*

*Quem me conhece sabe que não sou o tipo de pessoa que expressa facilmente o que sente. No entanto, a ocasião exige que eu deixe de lado essa característica e agradeça a todos aqueles que estiveram torcendo por mim durante todo o período do Mestrado. Agradeço a todos que fizeram parte da minha vida, em especial:*

*A meus pais, **Amauri e Onélia**, meus irmãos **Matheus e Marina**, minha avó **Adete**, a todos meus tios e tias, primos e primas. Obrigada por todo o apoio, pelas recepções calorosas quando volto para casa, pelas agradáveis reuniões familiares e pela força dada a cada despedida. Amo todos vocês!*

*A **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!*

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

*A “**Raninho**” (Honey), minha bolinha preta e peluda. O cachorro mais lindo e inteligente que já conheci e tenho o prazer de apertar sempre que volto para casa. Agradeço pelos momentos de alegria e lealdade!*

*Aos meus antigos amigos, **George, Mariana Alves, Eline, Elloá e Magna**, pela amizade, pelo incentivo, pelas longas conversas e apoio em todos os momentos.*

*Às minhas mais novas amigas, **Gisele (Rubinha), Ariane (Sponja) e Fernanda** pela companhia nos momentos mais divertidos da minha vida. Que possamos viver muitas aventuras juntas! Obrigada pela amizade!*

*À **Rosângela**, por ter preenchido o papel de mãe em muitos momentos e cuidado de mim sempre que precisei, sem nunca hesitar.*

*Às moradoras e ex-moradoras da “Vila do Chaves”, em especial à **Rafaela, Giulianna, Natália, Maria Raquel, Mariana Farias, Acácia e Clara**, pela convivência, muitas vezes*

*difícil, pelos momentos de descontração e amizade. Morar com pessoas tão diferentes tem influenciado bastante no meu amadurecimento. Obrigada pela paciência de aturar meu mau humor e minhas TPMs! Adoro vocês!*

*Ao meu companheiro de muito trabalho, **Guilherme**. Obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento desse projeto! Obrigada também pela amizade construída dentre tantos artigos e risadas!*

*A todo o pessoal do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (**Rubinha, Nelci, Flavinha, Tony, Brunno, Spike, Marcão, Bruna, Mariana Tablas, Renata**) pela ajuda no biotério, pelas dúvidas tiradas e por todos os momentos de alegria. Obrigada por terem me acolhido no laboratório e por me deixarem fazer parte dessa família científica!*

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

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

*Aos **animais de experimentação**, por suas vidas em prol do desenvolvimento da ciência.*

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

## RESUMO

Açaí, fruto da *Euterpe oleraceae* Martius, é consumido in natura e em uma variedade de bebidas e alimentos. Esse fruto tem sido bastante consumido e produzido no Brasil, devido à alta popularidade como alimento funcional com capacidade antioxidante e antiinflamatória. Este trabalho investigou o efeito protetor potencial do consumo da polpa de açaí (PA) seca por pulverização na carcinogênese de cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar adultos (peso médio de 200g). Após 4 semanas de administração de DMH, os grupos passaram a receber dieta padrão, dieta contendo 2.5% ou 5.0% de PA e 0.2% de N-acetilcisteína (NAC) durante 10 semanas de tratamento para análise de focos de criptas aberrantes (FCA). Adicionalmente, dois grupos receberam dieta padrão e dieta contendo 5.0% de PA durante 20 semanas de tratamento para análise de tumores de cólon. No experimento de 14 semanas, foi observada redução significativa no número de criptas aberrantes (CA) e em FCA (1-3 CA) nos grupos que receberam 5.0% de PA e 0.2% de NAC (37% e 47% de inibição,  $p = 0.036$ ; 37% e 41% de inibição,  $p = 0.042$ ), respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado. No experimento de 24 semanas, foi observada redução no número de adenocarcinomas invasivos e multiplicidade de tumores no grupo que recebeu 5.0% de PA na dieta ( $p < 0.005$  e  $p = 0.001$ , respectivamente) quando comparados ao grupo não tratado. Além disso, redução significativa na proliferação celular de tumores marcados com Ki-67 e na taxa de crescimento tumoral foi observada no grupo que recebeu 5.0% de PA ( $p = 0.003$  e  $p = 0.001$ ). Portanto, os resultados desse trabalho indicam que uma dieta acrescida de 5.0% da polpa de açaí seca por pulverização pode reduzir o desenvolvimento de FCA e de tumores de cólon induzidos em ratos, indicando seu uso como um potencial alimento funcional.

**Palavras-chave:** Focos de Criptas Aberrantes, Açaí (*Euterpe oleracea* Martius), Prevenção.

## ABSTRACT

Acai, fruit from *Euterpe oleraceae* Martius, is consumed *in natura* and in a variety of beverages and food preparations. This fruit has been widely consumed and produced in Brazil, due to the high popularity as a functional food with antioxidant and anti-inflammatory capacities. This study investigated the potential protective effect of spray-dried açai pulp (AP) intake on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male adult Wistar rats (mean weight of 200g). After 4 weeks of DMH administration, groups were fed standard diet, diet containing AP at 2.5% or 5.0% or 0.2% N-acetylcysteine (NAC) during 10 weeks for analysis of aberrant crypt foci (ACF) as endpoint. Additionally, two groups were fed standard diet or diet containing AP at 5.0% during 20 weeks for analysis of colon tumor as endpoint. In 14-week ACF assay, a significant reduction in number of aberrant crypt (AC) and in ACF (1-3 AC) were observed in groups fed 5.0% AP and 0.2% NAC (37% and 47% inhibition,  $p = 0.036$ ; 37% and 41% inhibition,  $p = 0.042$ ), respectively, when compared to the untreated group. In 24-week tumor assay, a significant reduction in number of invasive adenocarcinomas and tumor multiplicity were observed in group fed 5.0% AP ( $p < 0.005$  and  $p = 0.001$ , respectively) when compared to untreated group. Also, significant reduction in tumor Ki-67 cell proliferation and growth index was observed in group fed 5.0% AP ( $p = 0.003$  and  $p = 0.001$ ). Therefore, the findings of this study indicate that spray-dried açai pulp feeding at 5.0% may reduce the development of chemically-induced ACF and colon tumor in male rats, indicating their use as a potential functional food.

**Palavras-chave:** Aberrant Crypt Foci, Açai (*Euterpe oleracea* Martius), Prevention.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>Revisão de Literatura</b> .....	<b>2</b>
Figura 1. Principais mutações relacionadas com o desenvolvimento do câncer de cólon .....	3
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 separados por sexo .....	4
Figura 3. Desenho esquemático da via Wnt/ $\beta$ -catenina.....	6
Figura 4. Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção das espécies reativas de oxigênio.....	7
Figura 5. Processo esquemático da relação entre inflamação, produção de ERO/ERN e câncer.....	8
Figura 6. Processo de carcinogênese do cólon.....	9
Figura 7. Biomarcadores da carcinogênese de cólon.....	13
Figura 8. Estados brasileiros banhados pela Bacia Amazônica .....	16
Figura 9. Produção de açaí por estado em 2008.....	17
Figura 10. Açaizeiro e seu fruto.....	17

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

PA - POLPA DE AÇAÍ

DMH - 1,2 DIMETILHIDRAZINA

AOM - AZOXIMETANO

FCA - FOCO DE CRIPTA ABERRANTE

CA - CRIPTA ABERRANTE

NAC - N-ACETILCISTEÍNA

EDTA - ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO

HE - HEMATOXILINA-EOSINA

CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> -----	<b>1</b>
<b>I – Revisão de Literatura</b> -----	<b>2</b>
Câncer de cólon -----	3
Carcinogênese experimental de cólon -----	4
Biomarcadores da carcinogênese de cólon -----	9
Quimioprevenção -----	12
Açaí (Euterpe oleraceae Martius)-----	16
<b>II – Referências bibliográficas</b> -----	<b>21</b>
<b>III – Objetivos</b> -----	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II</b> -----	<b>31</b>
I – Artigo científico-----	32
<b>CONCLUSÃO FINAL</b> -----	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b> -----	<b>73</b>

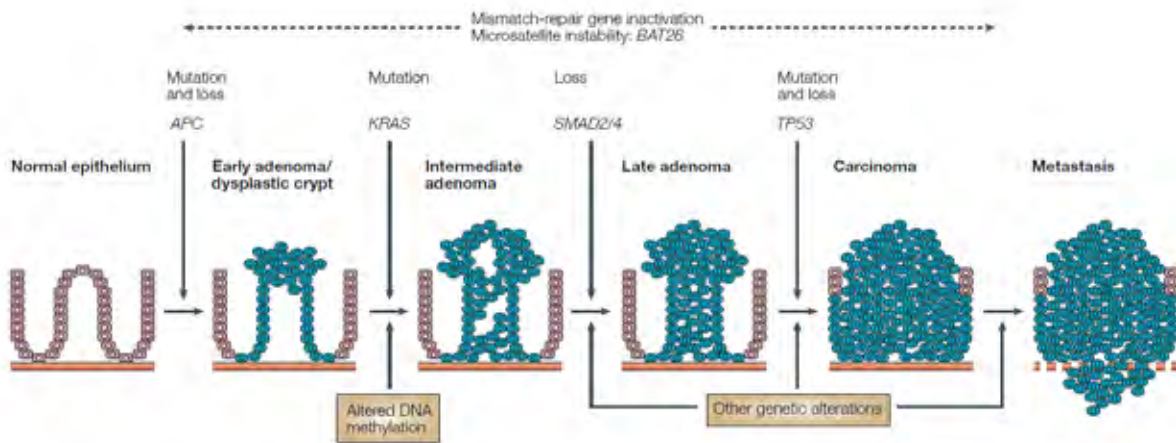


# *Capítulo I*

*I-Revisão de Literatura*

## I. 1. Câncer de cólon

O câncer de cólon, na maioria neoplasias de origem epitelial que acomete as diferentes regiões do cólon, é desenvolvido a partir de um processo de vários estágios que envolvem o acúmulo de alterações genéticas (mutações em genes específicos, como *APC*, *KRAS*, *PI3K*, *PTEN*, receptor de *TGF-β* e *TP53*) e epigenéticas (hipermetilação do DNA em genes supressores de tumor) (Figura 1) (Chen e Huang, 2009; Femia et al., 2010). É a principal causa de morbidade e mortalidade por câncer no mundo, algumas vezes leva décadas para se desenvolver e geralmente se inicia a partir de um pólipó não-canceroso (Kelloff et al., 2004; Vaiopoulos et al., 2010; ACS, 2011).

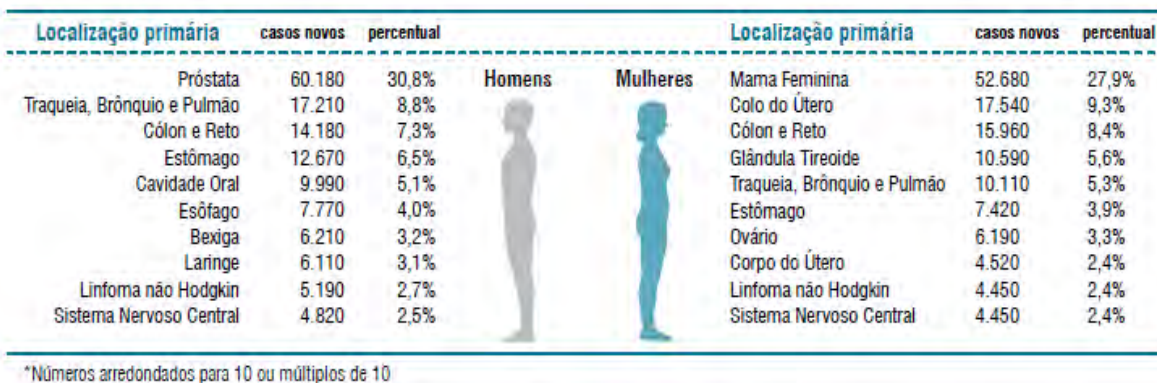


**Figura 1. Principais mutações relacionadas com o desenvolvimento do câncer de cólon** (Davies et al., 2005). BAT26, big adenina tract 26, é uma região de microssatélite alterada na maioria dos cânceres colorretais com deficiência em genes de reparo de DNA; *APC*, *Adenomatous Poliposys Coli*; *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *SMAD2/4*, *SMAD* family member 2 e 4; *TP53*, tumor protein p53.

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de 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 col retal hereditário não polipóide - HNPCC e Polipose Adenomatosa Familiar – FAP),

histórico familiar, inflamação crônica do intestino (colite ulcerativa e doença de Chron) e diabetes (Williams et al., 2010; Velmurugan et al., 2010; ACS, 2011).

Sua incidência no mundo é maior em países desenvolvidos (60%), como Austrália, Nova Zelândia, regiões da Europa e América do Norte. Além disso, o câncer de cólon é a terceira mais comum neoplasia em homens e a segunda em mulheres no mundo (Jemal et al., 2011). No Brasil, a maior incidência de casos ocorre nas regiões Sul e Sudeste. Em São Paulo e no Rio Grande do Sul, por exemplo, são estimados 10.908 e 2.680 novos casos para 2012. Já para os estados do Pará e Maranhão estimam-se cerca de 340 e 200 novos casos de câncer de cólon e reto para 2012. É um dos cinco primeiros tipos de câncer mais frequentes na população, estando em quarto lugar para homens e em terceiro para mulheres. Para 2012, o INCA estima cerca de 14.180 novos casos para homens e 15.960 para mulheres (Figura 2). Essa doença apresenta um



**Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 separados por sexo.** (Inca, 2012).

prognóstico propício, se diagnosticado em sua fase inicial, com sobrevida de aproximadamente cinco anos, observada em 55% dos países desenvolvidos e de 40% dos países subdesenvolvidos (INCA, 2012).

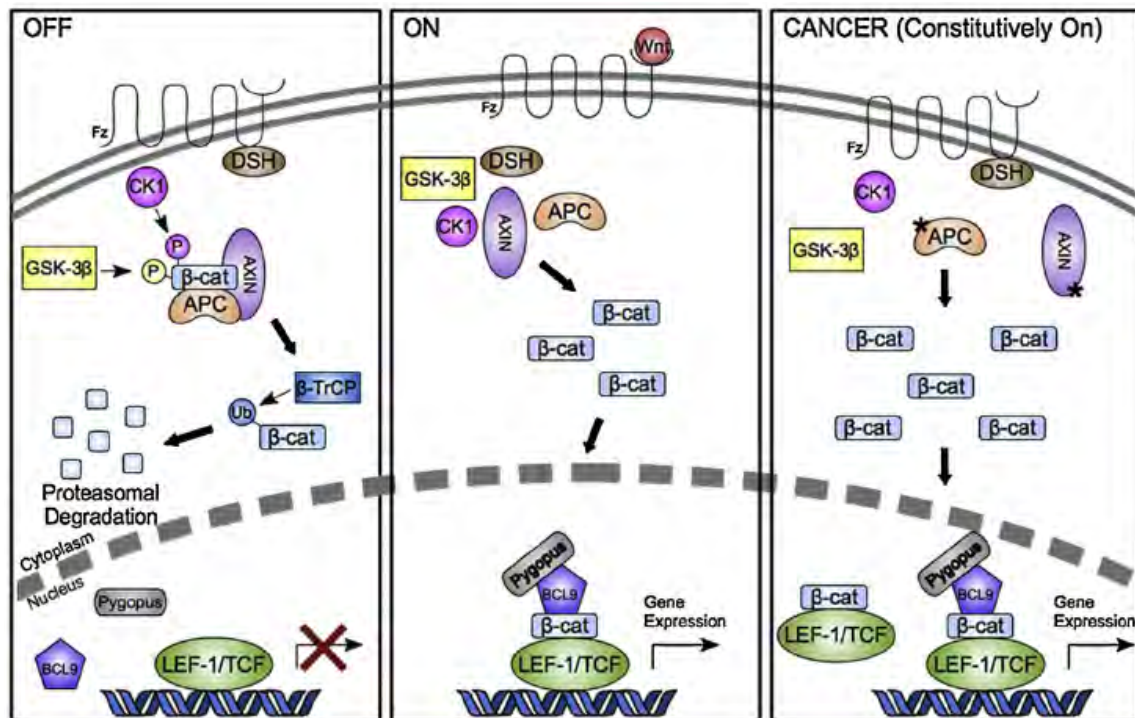
A baixa infraestrutura, recursos limitados na saúde e influência da cultura ocidental na alimentação têm sido associados à alta incidência e mortalidade por câncer nos países subdesenvolvidos (Parkin et al., 2011). Assim, o interesse no desenvolvimento de pesquisas no Brasil, com relação ao câncer de cólon, tem aumentado. A importância dessas pesquisas está relacionada, principalmente, ao aumento da sobrevida, ao tratamento e à prevenção dos pacientes acometidos pela doença.

Os principais eventos genéticos associados ao desenvolvimento do câncer de cólon incluem mutações no gene *APC/β-catenina*, *KRAS* e *P53*, além da Instabilidade de Microssatélite (MSI) e Instabilidade Cromossômica (CIN) (Volgestein et al, 1988; Perse e Cerar, 2011). Outro gene importante é o *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma), o qual é um supressor de tumor, que codifica proteínas de adesão (Volgestein et al, 1988; Takahashi et al., 2004). Cada um desses genes está envolvido em algumas das etapas da carcinogênese de cólon: os genes *K-RAS* e *APC* estão envolvidos em processos iniciais, como na formação de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e adenomas, enquanto que o *DCC* e o *P53* estão envolvidos na formação de adenocarcinomas (Fearon e Volgestein, 1990).

Todos os genes citados acima estão relacionados a algumas das principais vias de carcinogênese de cólon. A via Wnt é uma das principais vias alteradas nesse processo carcinogênico, sendo considerada um evento crucial no mesmo (Perse e Cerar, 2011). Essa via está diretamente relacionada à proliferação celular e é ativada a partir do momento em que a  $\beta$ -catenina é translocada para dentro do núcleo (Klaus e Buchmeier, 2008; Tanaka et al., 2011).

A ativação ou inativação dessa via pode ocorrer de uma das seguintes formas (Figura 3):

- 1) **Wnt não se liga aos seus receptores de membrana:** Quando essa ligação não ocorre, a  $\beta$ -catenina é recrutada pelo complexo de degradação, formado por APC, axina, CK1 $\beta$ , GSK3 $\beta$ . Seus baixos níveis no citoplasma fazem com que ocorra repressão da transcrição de genes alvos (*MYC*, *CYD1*, *AXIN2*) da via Wnt, responsáveis pela proliferação celular. Dessa forma, a  $\beta$ -catenina não é translocada para o núcleo e a proliferação celular é inibida (Figura 3).
- 2) **Wnt liga-se aos receptores de membrana:** Os receptores de membrana responsáveis pela ligação com Wnt são o Receptor Frizzled e o LRP5-LRP6. Quando essa ligação ocorre, componentes do complexo de degradação  $\beta$ -catenina passam a interagir com esses receptores, fosforilando-os. Isso faz com que ocorra a inativação desse complexo de degradação proteossomal, levando a um acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma. Esse acúmulo de  $\beta$ -catenina leva à sua estabilização e à consequente translocação para o núcleo. Ao entrar no núcleo,



**Figura 3. Desenho esquemático da via Wnt/β-catenina** (Jamieson et al., 2012). DSH, dishevelled: componente chave dos ligantes de Wnt na membrana; CK1, caseína quinase 1; GSK-3β, glicogênio sintase quinase 3β, medeia a adição de moléculas de fosfato em resíduos de aminoácidos em serina e treonina; P, fosfato; β-TrCP e BCL9, sistema conjugante de Ubiquitina; Ub, ubiquitina; Pygopus, co-ativador nuclear; LEF-1, Fator 1 Potenciador de Ligação Linfóide; TCF, fator de célula T; Wnt, proteína responsável pela ativação da via e translocação da β-catenina para o núcleo; β-cat, β-catenina.

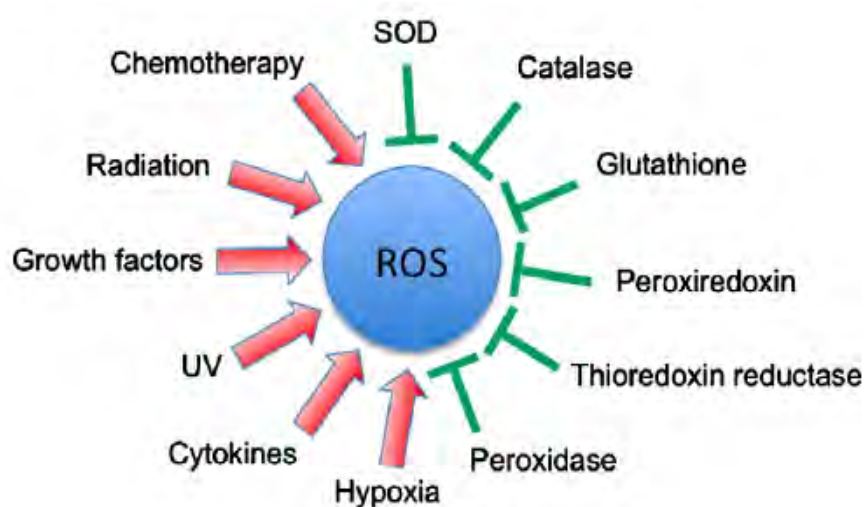
fatores de transcrição (LEF e TCF) são ativados e genes alvos (*MYC*, *CYD1*, *AXIN2*) são transcritos, levando à proliferação celular (Figura 3).

- 3) **Mutação no gene APC (Adenomatous Polipose Coli):** Quando o gene APC está mutado, ele se torna ineficiente no complexo de degradação da β-catenina que se transloca para o núcleo e, conseqüentemente, leva à proliferação celular (Akaiyama, 2000; Takahashi et al., 2000).

Outra importante via da carcinogênese de cólon é a do gene *K-RAS*. Esse gene tem como produto a proteína K-RAS, importante na transdução de sinal, na regulação da expressão gênica e na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Vigil et al, 2010). Essa proteína pode apresentar-se de duas formas: ativada, quando ligada a GTP (Trifosfato de Guanosina), e desativada. Quando ativada, essa proteína sofre mudanças conformacionais que: (i), afetam a atividade de Proteínas Ativadoras de GTP (GAPs),

responsáveis pela hidrólise de GTP; e (ii), afetam a interação com Fator de Troca de Guanina/Fator de Liberação de Guanina (GEF/GRF), promovendo a liberação de GTP. As GAPs são alvos de mutações encontradas nas variantes oncogênicas dos alelos de RAS, o que as torna sem resposta para GTPases. Dessa forma, K-RAS torna-se constitutivamente ativada e operante sobre as cascatas MAPKs e PI3K/Akt, responsáveis por importantes funções como proliferação celular, atividade anti-apoptótica, angiogênese, sobrevivência e metástase (Jancik et al., 2010).

A inflamação é um processo patológico diretamente relacionado à carcinogênese e a tumorigênese (Morrison, 2012). Diversos estudos têm mostrado que a inflamação é



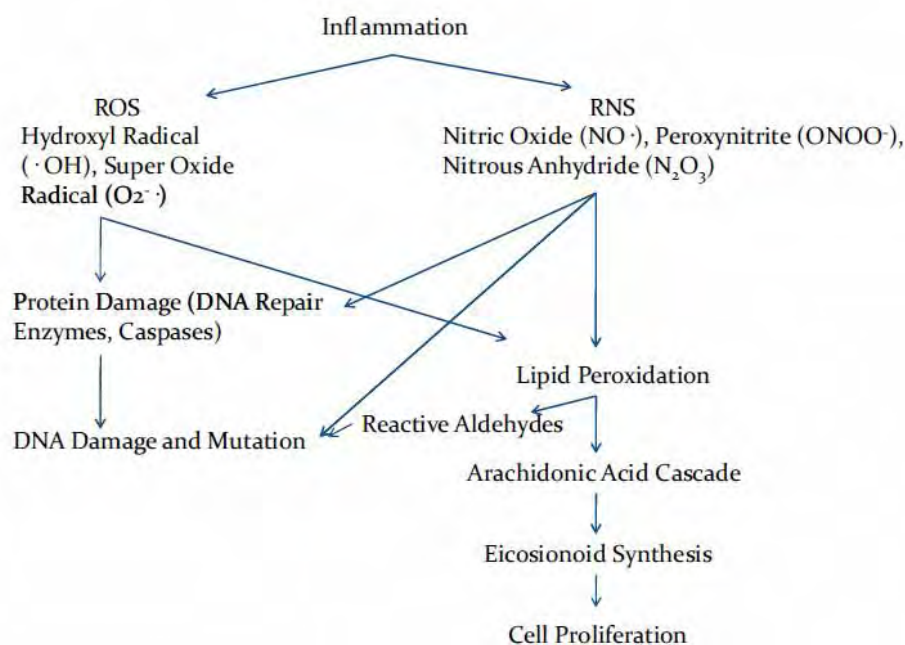
**Figura 4.** Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção das espécies reativas de oxigênio (Reuter et al., 2010). ROS – ERO, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase.

capaz de favorecer o câncer de cólon a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), combinada com uma deficiência na produção de enzimas antioxidantes (Seifried et al., 2007; Tudek e Speina, 2012; Morrison, 2012) (Figura 4).

As ERO representam um paradoxo na sua função biológica, pois podem ser (i) benéficas, quando favorecem a resposta imune do organismo e (ii) maléficas, quando danificam moléculas celulares importantes, que apresentam papel crucial na carcinogênese (Seifried et al., 2007). A sua produção facilita a resposta imune, a partir da modulação de apoptose em neutrófilos no ambiente inflamatório (Droge, 2002). No entanto, caso haja um desequilíbrio em algum dos componentes responsáveis pela resposta imune, o tecido poderá desenvolver uma inflamação crônica, levando à

formação de um microambiente favorável à iniciação e progressão do câncer (Seifried et al., 2007, Morrison, 2012).

O estresse oxidativo induzido pela inflamação tem como característica a indução da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a expressão aberrante de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-6 e IL-8) e quimiocinas (IL-8 e CXCR4) (Reuter et al., 2010). Alguns estudos mostram que as enzimas iNOS e COX-2 e seus respectivos produtos (NO e PGE2) estão com expressão aumentada nas células epiteliais e do estroma em animais que tiveram indução à carcinogênese de cólon por Azoximetano (AOM), estando a primeira presente desde a formação de FCA displásico até grandes adenocarcinomas e a segunda a partir de adenomas (Takahashi, 2004; Asting et al., 2004) (Figura 5). Dessa forma, ambas as enzimas inflamatórias são utilizadas como alvos para a prevenção do câncer (Perse e Cerar, 2011). Por esta razão, o estudo de agentes com ação antioxidante e/ou antiinflamatório são de extrema importância para a prevenção da carcinogênese de cólon.



**Figura 5.** Processo esquemático da relação entre inflamação, produção de ERO/ERN e câncer. (Morrison et al., 2012). ROS, espécies reativas de oxigênio; RNS, espécies reativas de nitrogênio.

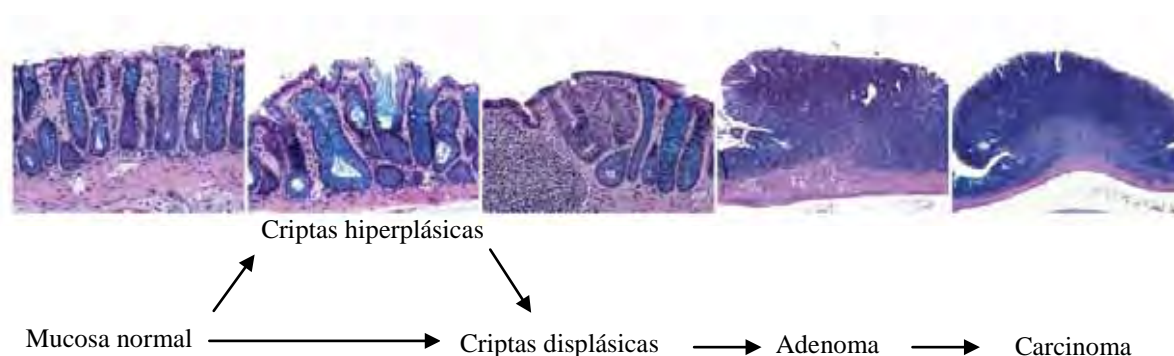


## I. 2. Carcinogênese experimental de cólon

O processo de múltiplas etapas da carcinogênese propõe que o câncer se desenvolve depois de um determinado período de tempo, devido ao acúmulo de mutações somáticas em uma única célula. Essas mutações resultam em mudanças fenotípicas graduais, a partir de células pré-neoplásicas, que progridem para células neoplásicas. Suas múltiplas etapas são: a iniciação, promoção e progressão (Russo, 2007; Pitot, 2007).

- a) **Iniciação**: é uma fase irreversível da carcinogênese e envolve a ação de agentes carcinogênicos químicos ou físicos que agem diretamente no DNA.
- b) **Promoção**: envolve mecanismos epigenéticos e é, geralmente, um processo lento e reversível, que leva a acumulação de células pré-malignas anormais em divisão.
- c) **Progressão**: também é uma fase irreversível e leva ao final do processo de carcinogênese, com crescimento do tumor e aquisição do potencial invasivo e metastático.

O câncer de cólon é uma neoplasia que se desenvolve, a partir de múltiplas etapas que podem ser reconhecidas no nível histopatológico (Volgstein et al., 1988; Chen e Huang, 2009; Latifah et al., 2010), e inicia-se a partir de criptas hiperplásicas, que podem levar ao desenvolvimento de criptas displásicas, adenomas e adenocarcinomas (Perse e Cerar , 2010) (Figura 6). Cada uma dessas etapas é caracterizada por diversas alterações genéticas (Takahashi et al., 2004), que podem ser estudadas a partir de sua expressão.



**Figura 6. Processo de carcinogênese do cólon.** (Adaptado de Perse e Cerar , 2010)

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, as duas substâncias mais utilizadas são a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o seu metabólito, o azoximetano (AOM). Essas substâncias são as mais utilizadas, por apresentarem 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. Essa metabolização ocorre no fígado com a participação de várias enzimas, incluindo a CYP2E1 (Sohn et al., 2001; Perse e Cerar, 2011).

Esse modelo permite a observação de diversas características importantes para o câncer de cólon 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 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 câncer de cólon 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).

### ***1. 3. Biomarcadores da carcinogênese de cólon***

Biomarcadores relacionados ao câncer podem ser definidos como características fenotípicas ou genotípicas, que se alteram durante a carcinogênese e/ou durante a resposta a algum agente quimiopreventivo ou a alguma intervenção terapêutica (Das et al., 2007). Entender quando o epitélio do cólon normal se torna neoplásico, hiperplásico ou displásico, ou quando este apresenta um indicador precoce da doença é objetivo de estudo de diversos grupos de pesquisa (Wargovich et al., 2010). Dessa forma, a observação e o estudo das lesões pré-neoplásicas fornecerão biomarcadores para a avaliação do desenvolvimento do câncer de cólon e consequente identificação de moduladores da carcinogênese em estudo de curto tempo (Figura 7) (Bird, 1987).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) foram inicialmente descritos por Bird (1987) e sua presença está principalmente associada ao câncer de cólon. Os FCAs são lesões iniciais, caracterizadas por agrupamentos de células epiteliais da mucosa, que representam criptas intestinais com paredes mais amplas e espessas que as criptas intestinais normais e abertura luminal alterada (Bird, 1987; Mori et al, 2005; Cappell, 2007).

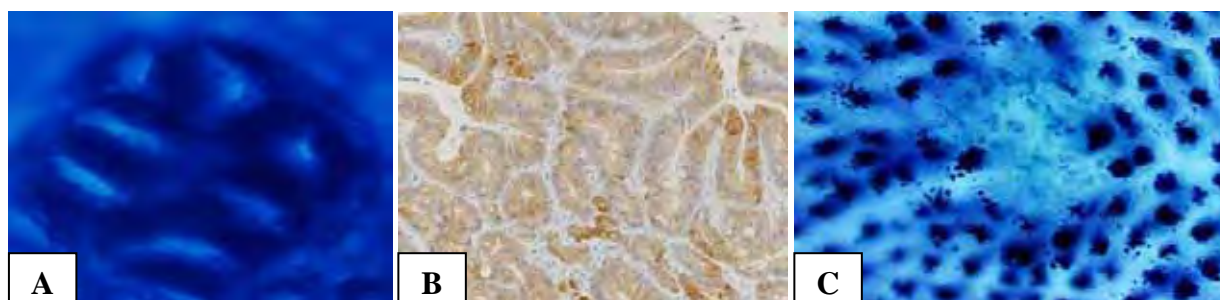
Essas lesões foram inicialmente observadas no cólon de roedores, tratados com agentes químicos para a carcinogênese de cólon e, posteriormente, em pacientes de alto risco para câncer esporádico e hereditário (Pretlow et al., 1991; Alrawi et al., 2006). Por conta dessa característica, muitos estudos têm considerado os FCA como sendo lesões precursoras importantes para o desenvolvimento da neoplasia de cólon.

Os FCAs podem ser identificados microscopicamente na superfície da mucosa do cólon, após a coloração com azul de metileno (Perse e Serar, 2010). Em humanos, elas podem ser identificadas pela colonoscopia de alta resolução (Alwari et al., 2006). São utilizados como biomarcadores potenciais para detecção de fatores de risco e de proteção, que influenciam a carcinogênese de cólon em ratos iniciados com carcinógenos químicos específicos (Corpert e Pierre, 2005). Como a análise de FCA na superfície do cólon é facilmente realizada, essas lesões apresentam um amplo uso como substitutos de tumores na pesquisa com agentes quimiopreventivos (Mori et al., 2005).

Além dos FCAs, existem outros dois biomarcadores também utilizados para a carcinogênese de cólon: criptas aberrantes com acúmulo de  $\beta$ -catenina (BCAC) e focos com depleção de mucina (MDF).

Como explicado anteriormente, a proteína  $\beta$ -catenina faz parte da via Wnt, responsável, dentre outras funções, pela ativação da proliferação celular (Akayama, 2000; Takahashi et al., 2000). Mori e colaboradores (2005) observaram mutações em diversos códons do gene  $\beta$ -catenina em 10 de 15 BCAC. Estudos com agentes naturais encontrados em plantas como o sesaminol, miricetrina e vacantinol C inibiram a formação dessas lesões no cólon de ratos, demonstrando a importância deste biomarcador para a busca de agentes quimiopreventivos (Mori et al., 2004).

MDFs são lesões pré-neoplásicas displásicas caracterizadas pela ausência ou escassez da produção de mucina. Elas são facilmente visualizadas no cólon de ratos induzidos quimicamente a partir da coloração do cólon com diamina de ferro alto azul-alciano (HID-AB), técnica que realça a produção de mucina (Caderni et al., 2003; Mori et al., 2004, 2005). Embora os MDFs apresentem uma menor incidência (número de MDF/cólon) quando comparadas às FCAs (Caderni et al., 2003; Mori et al., 2005), as mesmas apresentam um maior potencial para progressão na carcinogênese de cólon de animais quimicamente tratados. Ao passo que, os FCAs são mais comuns, mas apenas as que se tornam displásicas podem progredir para a sequência adenoma-adenocarcinoma.



**Figura 7. Biomarcadores da carcinogênese de cólon.** Em A, FCA com sete criptas na mucosa de cólon corada com azul de metileno (foto pessoal); Em B, tumor de cólon com marcação positiva de imunistoquímica para  $\beta$ -catenina (foto pessoal); Em C, visão topográfica de um MDF no cólon corado com HID-BA (retirado de Mori et al., 2005).

#### ***I. 4. Quimioprevenção***

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 e após a promoção/progressão, respectivamente (Johnson, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que aproximadamente 35% dos cânceres estão relacionados com o padrão alimentar (Russo, 2007; Fergurson, 2010; Gibson, 2010). Como o processo de carcinogênese de cólon em humanos pode levar décadas para se instalar e desenvolver, este longo período permite que ocorra a prevenção da doença com, principalmente, uma alimentação saudável e mudança do estilo de vida (Chen e Huang, 2009). Dessa forma, a identificação de substâncias que previnam o desenvolvimento do câncer colorretal é uma importante medida de saúde pública e o objetivo de estudo de várias pesquisas recentes.

Um agente quimiopreventivo 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). Por conta disso, o interesse pelo efeito preventivo e terapêutico de compostos químicos oriundos de plantas medicinais e alimentos funcionais sobre diversas neoplasias aumentou nos últimos anos.

Apesar desse interesse, os componentes químicos presentes nas plantas medicinais e nos alimentos com atividade anticarcinogênica ainda não foram totalmente elucidados (Seely et al, 2005; Gibson et al., 2010; Greenlee, 2012). Atualmente, muita ênfase tem sido dada aos polifenóis, que apresentam diversos grupos hidroxilas ligados aos seus anéis aromáticos (Signorelli et al., 2005; D'Archivio et al., 2007). Esses compostos apresentam diversas propriedades e seus efeitos principais são: ação antioxidante, antiinflamatória e anticarcinogênica. Além disso, são propostos como sendo agentes quimiopreventivos primários (Kang et al., 2011). Sua classificação na literatura difere muito entre diferentes autores (Tsao et al., 2010). No entanto, podem

ser divididos em cinco classes, quanto ao número de anéis fenólicos e aos elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros: flavonóides, estilbenos, ácidos fenólicos, alcoóis fenólicos e lignanas (D'Archivio, et al., 2007; Kang et al., 2011).

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 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 indução de atividades quimioprotetoras (D'Archivio et al., 2007).

### I. 5. Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.)

O açázeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira perene e ribeirinha, endógena da região Amazônica (Ferreira et al., 2011; Schauss, 2010) (Figura 8). Cresce principalmente na Floresta Amazônica do Brasil, assim como nos países que fazem divisa ao norte, como o Suriname e as Guianas. Pode chegar a medir cerca de 30-40 metros de altura e sua inflorescência pode produzir até dois quilos de fruto (Schauss, 2010).



**Figura 8.** Estados brasileiros banhados pela Bacia Amazônica. (Foto: Imazon, 2011)

Seu fruto, quando maduro, apresenta cor violácea, é redondo, pesa em média 1,5 gramas e tem grande importância econômica, em especial ao estado do Pará (Murieta, 1999; Schauss, 2010). Além da produção da polpa a partir do fruto, essa planta destaca-se pelo uso de sua semente no preparo de rações, fertilizantes e combustíveis, e do seu tronco na produção de palmito (Carvalho, 2010; Schauss, 2010).

É um fruto reconhecidamente com alto valor energético, por conter alto teor de lipídios, como os ácidos graxos essenciais Ômega 6 e Ômega 9. Além disso, é rico em carboidratos, fibras, vitaminas E, proteínas e minerais (Mn, Fe, Zn Cu, Cr) (Portinho et al., 2012). A constituição química de sua semente é caracterizada pela presença de fibras (celulose e hemicelulose), representando cerca de 63-81% da semente, proteínas



(5-6%), minerais (2-6%) e lipídios (2-3%) (Rogez, 2000). Em 2008, o Brasil produziu mais de 120 mil toneladas de açaí e seu principal produtor foi o Pará (Figura 9).

Brasil e Unidades da Federação	Variável		
	Quantidade (t)	Valor (mil reais)	Participação (%) sobre a quantidade
Brasil	120.890	133.746	100%
Pará	107.028	122.638	89%
Maranhão	9.191	7.432	8%
Acre	1.537	745	1%
Amapá	1.294	939	1%
Amazonas	1.274	1.392	1%
Rondônia	314	385	0%
Bahia	250	213	0%
Tocantins	2	4	0%

Fonte: IBGE, 2008.

**Figura 9. Produção de açaí por estado em 2008.** (Fonte: FBB, 2008)

Apesar de nesta região existirem três tipos de *Euterpe*, *Euterpe precatória*, *Euterpe edulis* e *Euterpe olearea*, esse último é a mais consumida e mundialmente exportada (Poulose et al., 2012). Sua maior produção se dá na região do estuário do Rio Amazonas, onde se localizam os estados do Amapá e Pará, sendo caracterizada por solos de várzea. Apesar de ser natural de áreas alagadas, também se adapta bem ao cultivo em terra firme (Carvalho, 2010) (Figura 10).



**Figura 9. Açazeiro e seu fruto.** A, cultivo de açaí; B, inflorescência do açazeiro; C, infrutescência do açazeiro; D, açaí. Fotos: Embrapa Amazônia Oriental.

Com o aumento do interesse por esse fruto, tem-se feito a expansão do cultivo dessa planta para áreas de terra firme. Para isso, foi desenvolvida pela Embrapa a primeira cultivar do Brasil, chamada BRS Pará, com características adaptáveis ao cultivo em regiões de terra firme, como no Sul da Bahia (Carvalho, 2010).

Nos últimos anos, essa fruta emergiu como sendo uma importante fonte natural de antioxidantes (Hogan et al., 2010), devido à alta concentração de polifenóis, principalmente a antocianina, que dá cor roxa ao fruto. Antocianinas e antocianidinas são polifenóis conhecidos por apresentarem propriedades quimiopreventivas para diversos tipos de câncer, principalmente contra os do trato gastrointestinal (Thomasset et al., 2009). Diversos estudos, utilizando extratos ricos em antocianinas ou isolado de antocianinas, já foram realizados com resultados promissores (Kang et al., 2003; Cooke et al., 2006; Bobe et al., 2006).

Por apresentar esses fitoquímicos, o fruto tem forte capacidade antioxidante e antiinflamatória *in vitro* e *in vivo* quando comparada a outros frutos, sendo considerado um alimento funcional (Ferreira et al., 2011; Poulouse et al., 2012). Além disso, estudos mostraram que o açaí apresenta alta capacidade antioxidante contra o superóxido e o radical peróxil, nos ensaios com a superóxido dismutase (SOD) e de absorvência do radical oxigênio (ORAC), respectivamente (Schauss et al., 2006).

As atividades antioxidantes e antiinflamatórias do açaí têm sido estudadas em modelos humanos, animais e em cultura celular (Del Pozo-Insfran et al., 2006; Jensen et al., 2008; Spada et al., 2009). Esses estudos mostram que o consumo de açaí pode reduzir os riscos de doenças cardiovasculares (Rocha et al., 2007; Xie et al., 2011, 2012; Feio et al., 2012), doenças cerebrais relacionadas à idade (Poulouse et al., 2012; Spada et al., 2009), inflamação e enfisema pulmonar em camundongos (Moura et al., 2011), prevenir o câncer de esôfago induzido por carcinógeno em ratos (Stoner et al., 2010), proteger eritrócitos humanos e células polimorfonucleares contra o estresse oxidativo (Honzel et al., 2008; Jensen et al., 2008), reduzir a proliferação de células HL-60, através da indução da apoptose pela caspase-3 com o uso de porções polifenólicas da polpa de açaí (Del-Pozo-Insfran et al., 2006) e reduzir o dano oxidativo ao DNA pelo desafio com peróxido de hidrogênio e apresentar atividade antiproliferativa e anticarcinogênica contra a carcinogênese de bexiga induzida em camundongos Swiss (Fragoso et al., 2012).

Um dos mais recentes trabalhos com humanos, utilizou voluntários não-fumantes e clinicamente saudáveis, no qual foi comparado o consumo de quatrocentos mililitros de suco de açaí, adicionado do camu-camu e de uma amora andina (frutos com capacidade antioxidante) com uma solução de monossacarídeos (13 g de glicose e 7,2g de frutose). Foi observado um aumento na concentração de ácido ascórbico e de substâncias desconhecidas com propriedades redutoras no plasma. Dessa forma, o consumo estabilizou o balanço entre pró e antioxidantes, mesmo sem ter tido diminuição de marcadores de estresse oxidativo (Ellinger et al., 2012).

Além dos estudos sobre a polpa e o seu extrato, existem alguns trabalhos acerca das propriedades antioxidantes de sua semente. Estudo feito com o extrato da semente de açaí mostrou efeito vasodilatador dependente do endotélio, podendo ser usado como planta medicinal no tratamento de doenças cardiovasculares (Rocha et al, 2007). Outro estudo determinou a capacidade antioxidante do extrato feito com a semente de açaí e observou que a mesma pode ser utilizada na preparação de novos antioxidantes potenciais para prolongar a vida de prateleira de diversos alimentos (Rodrigues et al., 2006).

Sua função antioxidante vem sendo estudada em diversos ensaios, principalmente aqueles que se referem à função de eliminar radicais peróxil e superóxido (Jensen et al., 2008; Schauss et al., 2006). No entanto, apesar do grande interesse em suas propriedades, estudos envolvendo a importância medicinal desses compostos no câncer são muito limitados (Hogan et al., 2010). Dessa forma, mais trabalhos *in vivo* são necessários para entender o mecanismo de ação do açaí, principalmente referentes ao processo de carcinogênese, visto que há apenas dois trabalhos disponíveis na literatura (Stoner et al., 2010; Fragoso et al., 2012).

Apesar de todas essas características benéficas, 178 casos agudos da doença de Chagas, observados entre novembro e dezembro de 2006, foram relacionados ao consumo de açaí. Durante o processamento do fruto para o preparo de patê e bebidas, o fruto deve ser triturado. A transmissão da doença de Chagas por via oral pode ter se dado durante esse processo de trituração, no qual o agente transmissor da doença, chamado de barbeiro e contaminado pelo *Tripanossoma cruzi*, foi esmagado inadvertidamente juntamente com o fruto, facilitando a liberação de fezes contaminadas e a consequente transmissão da doença (Nóbrega et al., 2009). Pereira e colaboradores

(2009) também consideraram que o suco de açaí, processado principalmente à noite, facilita o processo de transmissão da doença.

Portanto, considerando que a inflamação e o estresse oxidativo são fatores que contribuem para a progressão do câncer de cólon, tem-se como hipótese que o consumo do extrato de açaí, alimento com propriedades antiinflamatórias e antioxidativas, reduziria o desenvolvimento de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e de tumores na carcinogênese de cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar.

## *II-Referências Bibliográficas*

\*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Biblioteca. Editora Unesp. Normas para publicação da Unesp. São Paulo: Ed. Unesp, 1994. 4v., v.2: Referências bibliográficas.

## II. 1. Referências Bibliográficas

Akiyama T. (2000). Wnt/b-catenin signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11, 273-283.

Alrawi, S.J., Schiff, M., Carroll, R.E., & et al. (2006). Aberrant Crypt Foci. *Anticancer research*, 120, 107-119.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer: Facts and Figures 2011-2013**. Estados Unidos, 2011. Available in: <<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/ColorectalCancerFactsFigures/colorectal-cancer-facts--figures-2011-2013>>. Accessed in August 2, 2011.

Araújo, J.R., Gonçalves, P., & Martel F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition research*, 31, 77-87.

Asting, A. G., Carén, H., Andersson, M., Lönnroth, C., Lagerstedt, K., & Lundholm, K. (2004). COX-2 gene expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter methylation status. *BMC Cancer*, 11, 238.

Bird, R.P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. *Cancer pathogenesis Lett.*, 37, 147-151.

Bobé G., Wang B., Seeram N.P., Nair M.G., Bourquin L.D.(2006). Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC(Min) mice fed suboptimal levels of sulindac. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 9322-9328.

Caderni, G., Femia, A.P., Giannini, A., & et al. (2003). Identification of Mucin-depleted Foci in the Unsectioned Colon of Azoxymethane-treated Rats Correlation with Carcinogenesis Identification of Mucin-depleted Foci in the Unsectioned Colon of Azoxymethane- treated Rats: Correlation with Carcinogenesis. *Cancer Research*, 1, 2388-2392.

Cappell, MS. (2008). Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America*, 37, 1-24.

CARVALHO, A. V. (Ed.). Agência de Informação Embrapa: açaí. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/Abertura.html>>. Acesso em: 18 fev. 2011.

Chen, J. & Huang, X. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer biology and therapy*, 8, 1313-7.

Cooke D., Schwarz M., Boocock D., Winterhalter P., Steward W.P., Gescher A.J., et al. (2006). Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--

relationship with tissue anthocyanin levels. *International journal of cancer*, 119, 2213–2220.

Corpet, D.E., & Pierre, F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European journal of cancer*, 41, 1911–22.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., & et al. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 43, 348–61.

Das, D., Arber, N., & Jankowski, J. (2012). Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*, 76, 51–67.

Day, A.J., & Williamson, G. (2001). Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr*, 86, 105–10.

de Moura R.S., Pires K.M.P., Santos Ferreira T., Lopes A.A., Nesi R.T., Resende A.C., et al. (2011). Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49, 855–863.

Dias M.C., Spinardi-Barbisan A.L.T., Rodrigues M.A.M., de Camargo J.L.V., Terán E., Barbisan L.F. (2006). Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44, 877–884.

Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47–95.

Ellinger S., Gordon A., Kürten M., Jungfer E., Benno F., Zur B., et al. (2012). Bolus Consumption of a Specifically Designed Fruit Juice Rich in Anthocyanins and Ascorbic Acid Did not Influence Markers of Antioxidative Defense in Healthy Humans Bolus Consumption of a Specifically Designed Fruit Juice Rich in Anthocyanins and Ascorbic. *J Agric Food Chem*, just accepted.

Fearon, E.F., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759–767.

Feio C., Izar M.C., Ihara S.S., Kasma S.H., Martins C.M., Feio M.N., et al. (2011). *Euterpe oleracea* (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 3, 237–245.

Femia, A. P., Luceri, C., Toti, S., Giannini, A., Dolara, P., & Caderni, G. (2010) Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC cancer*, 10, 194.

Femia, A.P., & Caderni, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta medica*, 74, 1602–7.

- Femia, A.P., Luceri, C., Toti, S., & et al. (2010). Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC cancer*, 10, 194.
- Ferguson L.R. (2010). Meat and cancer. *Meat science*, 84,308–313.
- Ferreira J., Lopes C., Magalhães D.B., Costa D.C., Silva M.E., Pedrosa M.L. (2011). Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 49, 188–94.
- Fragoso M.F., Prado M.G., Barbosa L., Rocha N.S., Barbisan L.F. (2012). Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (Euterpe oleraceae Martius) Intake. *Plant foods for human nutrition*, 67, 235–241.
- FBB – Fundação Banco do Brasil. (2008). **Fruticultura – açai**. Desenvolvimento Regional Sustenrável, v.2, p. 1-48.
- Gibson T.M., Ferrucci L.M., Tangrea J.A., Schatzkin A. (2011). Epidemiological and Clinical Studies of Nutrition. *NIH Public Access*, 37, 282–296.
- Greenlee H. (2012). Natural products for cancer prevention. *Seminars in oncology nursing*, 28, 29–44.
- Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y, et al. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 118, 208–214.
- Honzel D., Carter S.G., Redman K., Schauss A.G., Endres J.R., Jensen G.S. (2008). Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 8319–8325.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer - **Estatística sobre a incidência de câncer colorretal na população brasileira**. Brasil, 2012 ([http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5)). Accessed in August 2, 2012.
- IMAZON – Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia – Mapa da Amazônia Legal. Brasil, 2011. Acesso em 05 de dezembro de 2012.
- Jamieson, C., Sharma, M., & Henderson, B. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus:  $\beta$ -Catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology*, in press.
- Jancík, S., Drábek, J., Radzioch, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 1-13.
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.*, 61, 69-90.



Jensen, G. S.; Wu, X.; Patterson, K. M.; Barnes, J.; Carter, S. G.; Scherwitz, L.; Beaman, R.; Endres, J. R.; Schauss, A. G. (2008). In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *J Agric Food Chem*, 56, 8326-8333.

Johnson IT. (2007). Phytochemicals and cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 2, 207–15.

Kang S-Y, Seeram N.P., Nair M.G., Bourquin L.D. (2003). Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 194, 13–19.

Kang, N.J., Shin, S.H, Lee, H.J., & Lee, K.W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics*, 130, 310–24.

Kelloff, G.J., Schilsky, R.L., Alberts, D.S., Day, R.W., Guyton, K.Z., Pearce, H.L. & et al. (2004). Colorectal adenomas: a prototype for the use of surrogate end points in the development of cancer prevention drugs. *Clin Cancer Res.*, 10, 3908-3918.

Klaus, A., & Burchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8, 387-398.

Lakatos P.L., Kiss L.S., Miheller P. (2011). Nutritional Influences in Selected Gastrointestinal Diseases. *Dig Dis*, 29, 154-165.

Latifah, S.Y., Armania, N., Tze, T.H., & et al. (2010) Germinated brown rice (GBR) reduces the incidence of aberrant crypt foci with the involvement of beta-catenin and COX-2 in azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutrition journal*, 9, 16.

Maskens, A.P., & Dujardin-Loits, R.M. (1981). Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise de novo in flat mucosa. *Cancer*, 47, 81–89.

Mori, H., Hata, K., Yamada, Y., Kuno, T., & Hara, A. (2005). Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chemico-biological interactions*, 155, 1–9.

Mori, H., Yamada, Y., Kuno, T., & Hirose, Y. (2004). Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutation research*, 566, 191–208.

Morrison, W. (2012). Inflammation and cancer: a comparative view. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 26, 18-31.

Murrieta, R.S.S.; Dufour, D.; & Siqueira, A.D. (1999). Food consumption and subsistence in three cabloco populations on Marajó Island, Amazonia, Brazil. *Human Ecology*, 27, 455-475.

Nóbrega A.A., Garcia M.H., Tatto E., Obara M.T., Costa E., Sobel J., et al. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 15, 653–655.

Parkin D. (2011). Global cancer statistics. *A cancer journal for clinicians*, 61, 69–90.  
Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/canjclin.49.1.33/full>.

Pereira K.S., Schmidt F.L., Guaraldo A.M.A, Franco R.M.B., Dias V.L., Passos L.A.C. (2009). Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of food protection*, 72, 441–446.

Perse, M., & Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 1-14.

Pitot H.C. (2007). Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annual review of pathology*, 2, 1–29.

Portinho J.A., Zimmermman L.M., Bruck M.R. (2012). Efeitos benéficos do açai. *International Journal of Nutrology*, 5, 15-20.

Poulose S.M., Fisher D.R., Larson J., Bielinski D.F., Rimando A.M., Carey A.N., et al. (2012). Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 1084–1093.

Poulose SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells.(2012). *Journal of agricultural and food chemistry*, 4, 1084–1093.

Pozo-Insfran D., Percival S.S., Talcott S.T. (2006). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 1222–1229.

Pretlow, T. P., Barrow, B. J., Ashton, W. S., O’Riordan, M. A., Pretlow, T. G., Jurcisek, J. A., & Stellato, T. A. (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci. In human colonic mucosa. *Cancer Res.*, 5, 1564–1567.

Rajamanickam, S., & Agarwal, R. (2008). Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Development Research*, 69, 460-471.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & vAggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine*, 49, 1603-16.

Rocha P.M., Carvalho L.C.R.M., Sousa M.V., Madeira S.V.F., Sousa P.J.C., Tano T., et al. (2007). Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular pharmacology*, 46, 97–104.

- Rodrigues R.B., Lichtenthaler R., Zimmermann B.F., Papagiannopoulos M., Fabricius H., Marx F., et al. (2006). Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal of agricultural and food*, 54, 4162–4167.
- Rogez, H. (2000). Açai: Preparo, composição e melhoramento da conservação. Belem, Brazil: UFPA editora.
- Russo, G.L. (2007). Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical pharmacology*, 74, 533–44.
- Safe, S., Wargovich, M.J., Lamartiniere, C.A., & Mukhtar, H. (1999). Symposium on mechanisms of action of naturally occurring anticarcinogens. *Toxicol. Sci.*, 52, 1–8.
- Seely D., Mills E.J., Wu P., Verma S., Guyatt G.H. (2005). The effects of green tea consumption on incidence of breast cancer and recurrence of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Integrative cancer therapies*, 4, 144–155.
- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 8604–10.
- Schauss, A.G., Clewell, A., Balogh, L., Szakonyi, I. P., Financsek, I., Horváth, J., Hirka, G. (2010). Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active®). *Toxicology*, 278, 46–54.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18, 567-79.
- Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*, 16, 449-466.
- Sohn, O.S., Fiala, E.S., Requeijo, S.P. (2001). 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*, 61, 8435–8440.
- Spada P.D.S., Dani C., Bortolini G. V., Funchal C., Henriques J.A.P., Salvador M. (2009). Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *Journal of medicinal*, 12, 1084–1088.
- Stoner G.D., Wang L.S., Seguin C., Rocha C., Stoner K., Chiu S., et al. (2010). Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. *Pharmaceutical*, 27, 1138–1145.

Sunter, J. P., Appleton, D. R., Wright, N.A. & Watson, A. J. (1978). Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 29, 211–223.

Takahashi, M., & Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Science*, 95, 475-480.

Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., & Wakabayashi, K. (2000). Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis*, 6, 1117-20.

Tanaka SS, Kojima Y, Yamaguchi YL, Nishinakamura R, Tam PPL. (2011). Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. *Development, growth & differentiation*, 53, 843–56.

Tanaka T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8, 5.

Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 5, 1-5.

Thomasset S., Teller N., Cai H., Marko D., Berry D.P., Steward W.P., et al. (2009). Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64, 201–211.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 12,1231–46.

Tudek, B., & Speina, E. (2012). Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. *Mutation research*, in press.

Vaiopoulos, A.G., Papachroni, K.K., & Papavassiliou, A.G. (2010) Colon carcinogenesis: Learning from NF-kappaB and AP-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42, 1061-5.

Velmurugan, B., Singh, R.P., Kaul, N., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2010). Dietary Feeding of Grape Seed Extract Prevents Intestinal Tumorigenesis in APC<sup>min/+</sup> Mice<sup>1</sup>. *Neoplasia*, 12, 95–102.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature reviews. Cancer*, 10, 842-57.

Volgstein, B., Fearon, E., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Smits, A.M.M., Bos, J. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*, 319, 525-532.

Wargovich, M.J., Brown, V.R., & Morris, J. (2010). Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. *Cancers*, 2, 1705–1716.

Williams, C. D., Satia, J. A., Adair, L. S., Stevens, J., Keku, T. O., & Sandler, R. S. (2010). *NIH Public Access*, 18, 1552–1561.

Xie C., Kang J., Burris R., Ferguson M.E., Schauss A.G., Nagarajan S., et al. (2011). Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*, 216, 327–333.

Xie C., Kang J., Li Z., Schauss A.G., Badger T.M., Nagarajan S., et al. (2012). The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23, 1184–1891.

### *III - OBJETIVOS*

### ***III. 1. Objetivo geral***

Avaliar o efeito protetor da ingestão do extrato da polpa de açaí, sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar.

#### ***2. Objetivos específicos***

- Quantificar o número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) na mucosa colônica;
- Caracterizar histologicamente os FCA, de acordo com seu grau de displasia, e os tumores, de acordo com seu nível de invasão;
- Analisar a expressão imunoistoquímica de  $\beta$ -catenina, Ki-67, Caspase-3, Conexina43.

# *Capítulo II*

*II- Artigo Científico*



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

Mariana F. Fragoso<sup>1</sup>; Guilherme R. Romualdo<sup>2</sup>; Daniel A. Ribeiro<sup>3</sup>; Luis F. Barbisan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> UNESP Sao Paulo State University, School of Medicine, Program of Post-Graduation in Pathology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil.

<sup>2</sup> UNESP Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil.

<sup>3</sup> UNIFESP, Federal University of Sao Paulo, Department of Biosciences, 11060-001, Santos, SP, Brazil.

\*Corresponding author

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-0970 Botucatu, SP, Brazil. Phone: +55 14 38800469.

E-mail address: [barbisan@ibb.unesp.br](mailto:barbisan@ibb.unesp.br) (L.F. Barbisan).

**Key Words:** Aberrant crypt foci; Spray-dry; Açaí pulp; Colon carcinogenesis

**Abstract**

Acai, a fruit from *Euterpe oleraceae* Martius, is consumed *in natura* and in a variety of beverages and food preparations. This study investigated the potential protective effect of spray-dried açai powder (AP) intake on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male Wistar rats. After 4 weeks of DMH administrations, the groups were fed a standard diet, a diet containing AP at 2.5% or 5.0% or a diet containing 0.2% N-acetylcysteine (NAC) for 10 weeks with the analysis of aberrant crypt foci (ACF) as the endpoint. Additionally, two groups were fed a standard diet or a diet containing AP at 5.0% for 20 weeks with the analysis of colon tumours as the endpoint. In the 14-week ACF assay, a significant reduction in the total number of aberrant crypts (AC) and ACF (1-3 AC) were observed in the groups that were fed 5.0% AP (37% AC and 47% ACF reduction,  $p = 0.036$ ) and 0.2% NAC (39% AC and 41% ACF reduction,  $p = 0.042$ ), when compared with the untreated group. In the 24-week tumour assay, a significant reduction in the number of invasive tumours ( $p < 0.005$ ) and tumour multiplicity ( $p = 0.001$ ) was observed in the group fed with 5.0% AP when compared with the untreated group. In addition, a significant reduction in tumour Ki-67 cell proliferation ( $p = 0.003$ ) and growth index ( $p = 0.001$ ) was observed in the group that was fed 5.0% AP. Therefore, the findings from this study indicate that spray-dried açai powder, when fed at 5.0%, may reduce the development of chemically induced ACF and colon tumours in male rats, demonstrating its use as a potential functional food that protects against colon carcinogenesis.

### **Highlights**

- ❖ The beneficial effect of spray-dried açai powder (AP) on chemically induced rat colon carcinogenesis was investigated.
- ❖ Intake of AP at 5.0% inhibited the development of aberrant crypt foci and colon tumours.
- ❖ Tumour cell proliferation and growth indices were modified by dietary AP at 5.0%.
- ❖ AP is a potentially functional food that protects against colon carcinogenesis.

## 1. Introduction

Colon cancer is a significant cause of cancer mortality among men and women in industrialised Western societies, including Australia, New Zealand, Europe and North America (Siegel, Naishadham & Jemal, 2012). In Brazil, this malignancy is the third and fourth most frequent cancer diagnosed in women and men, respectively (INCA, 2012). This disease emerges through a multi-step process via a hyperplasia-adenoma-carcinoma sequence, involving the accumulation of numerous genetic and epigenetic alterations (Cappell, 2008; Watson & Collins, 2011). Experimental and epidemiologic evidence indicate that lifestyle and dietary habits have been associated with up- or down-regulation of the risk factors for colon cancer development (Watson & Collins, 2011; Lofano et al., 2012). Furthermore, there are several non-modified risk factors that include genetic predispositions (i.e., Lynch Syndrome and Familial Adenomatous Polyposis and chronic inflammation of the bowel, such as ulcerative colitis and Crohn's disease) and diabetes (Watson & Collins, 2011; ACS, 2011).

During chemically induced colon carcinogenesis, ACF has been recognised as an early surrogate preneoplastic lesion (Bird & Good, 2000; Yoshimi et al., 2004; Mori et al., 2004; Alrawi et al., 2006). In addition, ACF has been identified in human post-mortem and colonoscopy screening studies. Therefore, ACF may be considered a suitable biomarker for adenoma recurrence in high-risk patients (Pretlow et al., 1992; Takayama et al., 2005; Gupta & Schoen, 2009). Because of the morphological and genetic similarities in ACF development between rodents and humans, this preneoplastic lesion may be used in cancer screening and prevention studies for the detection of risk factors and protective factors associated with colon cancer progression or recurrence (Copert & Taché, 2002; Corpet & Pierre, 2005; Femia & Caderni, 2008).

Colon cancer chemoprevention may be achieved by consumption of dietary substances that prevent, inhibit or reverse the risk of developing this malignancy (Copert & Taché, 2002; Das, Arber & Jankowski, 2007). Because various compounds from fruits and vegetables have antioxidant and anti-inflammatory properties, they are believed to be protective against colon cancer initiation and progression (Das, Arber & Jankowski, 2007; Arikawa & Gallaher, 2008; Dias et al., 2010; de Moura et al., 2012). Especially, various *in vitro* and *in vivo* studies have been focused on the anti-tumour properties of food-derived polyphenols (D'Archivio et al., 2008; Guo, Kong & Meydani, 2009; Link, Balaguer & Goel, 2010; Araújo, Gonçalves & Martel, 2011).

In the family Arecaceae and genus *Euterpe*, the species *E. oleracea*, *E. edulis* and *E. precatoria* are referred to as “açai” (Poulose et al., 2012). The açai species *Euterpe oleraceae* Martius is an exotic fruit that, when mature, turns from green to dark purple with a single seed covered by a small edible pulp that represents approximately 13-15% of the fruit (Schauss et al., 2006a,b). It is originally a native of Central and South America and grows in the flood plains of the Amazon region (Rodrigues et al., 2006, Carvalho, 2010). It has become an important crop produced and consumed in Brazil and one of the main exports of the Amazon estuary (Schauss et al., 2006a,b; Carvalho, 2010). Over the past years, açai has gained popularity as a functional food ingredient that can be consumed *in natura* or in a variety of beverages and food preparations (Mertes-Talcott et al., 2008; Schauss et al., 2010) because of its colorant and antioxidant/anti-inflammatory properties (Hogan et al., 2010; Poulose et al., 2012). Açai is known to possess high amounts of polyphenols, especially anthocyanin and proanthocyanidin (mainly cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside) (Gallori et al., 2004; Schauss et al., 2006a,b; Rodrigues et al., 2006; Poulose et al., 2012). Given

its benefits to human health, in order to extend the shelf life and preserve the pigment stability of açai, which is otherwise a highly perishable fruit, a spray-drying technique can be used to produce açai powder with high anthocyanin content (Tonon, Brabet & Hubinger, 2010).

Due to the increased popularity of açai consumption (Vidigal et al., 2011; Menezes et al., 2011) and the lack of studies on its anti-tumour property in chemically induced rodent cancer models (Stoner et al., 2010; Fragoso et al., 2012), the present study was conducted to investigate the potential protective effect of spray-dried açai powder (AP) against colon carcinogenesis using ACF formation and tumour development as the end-points.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Animals and treatment

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 881-2011). Four-week-old male Wistar rats were obtained from Centro de Tecnologia do Paraná (TECPAR, Araucaria PR, Brazil). The animals were housed in polypropylene cages covered with metallic grids in a room maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 10\%$  humidity under a 12-h light–dark cycle. After a 2-week acclimation period, the animals were randomly distributed into groups for two experiments (Figure 1): For the *ACF assay*, groups G1 to G4 received four s.c. injections of DMH (40 mg/kg) twice a week for two weeks and group G5 received similar injections of EDTA (DMH vehicle). After four weeks of initiation of colon carcinogenesis, the groups were fed a standard diet (G1), standard diet containing 2.5% AP (G2), standard diet containing 5.0% AP (G3 and G5) or standard diet containing 0.2% N-acetylcysteine (NAC) (G4), which is an antioxidant and anticarcinogenic agent (Seril et al., 2002, Amrouche-Mekkioui & Djerdjouri, 2012), for 10 weeks. Fourteen weeks after the beginning of the dietary açai regimen, groups G1 to G5 were sacrificed for the ACF assay. For the *tumour assay*, groups G6 and G7 were induced to initiation of colon carcinogenesis as described above. After four weeks of tumour initiation, the animals were maintained on the standard diet (G6) or the standard diet containing 5.0% AP (G7) for 20 weeks. Groups G6 and G7 were then sacrificed for histopathology analysis and the colon tumour assay. The animals in both

experiments were sacrificed by exsanguination under sodium pentobarbital anaesthesia (45 mg/kg body weight). Individual body weight and food consumption were recorded twice a week throughout the two experimental periods.

Frozen açai pulps were obtained from Belém, PA, Brazil and spray-dried using an industrial scale spray-dryer system with maltodextrin DE10 as a carrier agent (Figure 2). Açai pulp powder was produced and kindly donated by Centroflora Group Brazil (Botucatu, SP, Brazil) with the following characteristics: moisture at 6%, volumetric density at 350– 650 g/l and total polyphenol content at  $\geq 0.5\%$  (Fragoso et al., 2012).

## **2.2 Colon processing and histopathological analysis**

At necropsy, the colon was removed, opened longitudinally and rinsed with saline to eliminate residual bowel contents. It was then flattened and fixed in 10% buffered formalin for 24 h at room temperature. Afterwards, the colon was stained with 1.0% methylene blue dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) for the quantitative analysis of classical ACF (Dias et al., 2010; de Moura et al., 2012). ACF were identified according to Bird's criteria (Bird & Good, 2000). The number of ACF with 1–3 aberrant crypts (AC) or  $\geq 4AC$ , as well as the number of total ACs and total ACF were analysed. In addition, all of the colons were Swiss-rolled (4–6 segments with 2-mm widths) and embedded in paraffin.

Histological evaluation was carried out on haematoxylin-eosin (HE)-stained colon sections and ACF were classified as conventional or dysplastic lesions according to Yoshimi et al. (2004). The tumours were classified as adenomas or adenocarcinomas



according to Hamilton and Aaltonen (2000). In addition, the colonic adenocarcinomas were sub-classified into invasive and non-invasive types (i.e., based on tumour cell invasion into the submucosa and muscularis) and their incidences (% rats with tumour) were assessed.

### **2.3 Immunohistochemistry protocol**

The protein expression levels of Ki-67 (i.e., cell proliferation marker), cleaved caspase-3 (i.e., apoptosis marker) and  $\beta$ -catenin and connexin 43 (Cx43) (i.e., tumour progression markers) in the colon tumours were detected immunohistochemically using a polymer system (MACH 4 Universal HRP polymer Detection, Biocare, CA, USA). Briefly, deparaffinated 5- $\mu$ m colon tumour sections on silanised slides were treated sequentially with 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) at 120°C for 5 min in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation Denmark A/S), 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min, nonfat milk for 60 min, either mouse anti-Ki-67 (1:100 dilution, Abcam ab16667, Cambridge, MA 02139), rabbit polyclonal cleaved anti-caspase-3 (clone Asp 175, 1:100 dilution, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), rabbit polyclonal anti- $\beta$ -catenin (clone ab6302, Abcam, MA, USA) or rabbit polyclonal anti-Cx43 (clone GJA1, Abcam, MA, USA) antibodies overnight at 4°C, the mouse probe for 30 min at room temperature and the HRP polymer for another 30 min at room temperature (de Moura et al., 2012). Chromogenic development was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Co, USA). The slides were counterstained with Harris's haematoxylin.

#### **2.4 Ki-67, cleaved caspase-3, $\beta$ -catenin and connexin 43 analysis**

Ki-67 and cleaved caspase-3 were evaluated by counting at least 500 tumour cells. The indices of cell proliferation and apoptosis were calculated as percentages of positively stained cells in each tumour sample. To assess the degree to which cellular proliferation and apoptosis changes may affect the net growth potential of a colon tumour, a Growth Index (GI%) was established as the Ki-67 labelling index minus the apoptosis index.

The *in situ* expression of  $\beta$ -catenin and Cx43 was evaluated in each colon tumour based on staining intensity and cellular localisation (i.e., membrane, cytoplasm and nucleus) (Buhmeida et al, 2008; Kanczuga-Koda et al., 2010).

#### **2.5 Statistical analysis**

The data for body weight gain, food consumption, ACF and tumour multiplicity, cell proliferation and apoptosis were compared among the groups. In addition, incidences of conventional and dysplastic ACF, colon tumour and altered  $\beta$ -catenin and Cx43 expression were compared by the chi-square test or the Fisher's exact test. The differences among the groups were considered significant when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed using the Jandel Sigma Stat software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

### **3. Results**

#### **3.1 General findings**

The AP-fed animals looked healthy throughout the experimental period. No significant alterations in body weight, body weight gain or food consumption associated with AP feeding were observed when compared with the groups receiving only standard diet in both ACF and Tumor assays (Table 1). Macroscopic examinations of the stomach, intestines, kidneys and liver did not reveal any apparent toxicity associated with AP after the 14- and 24-week feeding studies.

#### **3.2 Colonic preneoplastic lesions (ACF assay)**

The data on the modifying effect of AP powder intake on colonic ACF development are summarised in Table 2. All DMH-initiated groups developed ACF in the colons (G1-G4) (Figure 3A) whereas no evidence of ACF formation was detected in the colons from the vehicle-treated group receiving only 5.0% AP (G5). In the 14-week ACF assay, AP feeding significantly reduced the number of total AC in the groups that received 5.0% AP (G3) (37% inhibition) and 0.2% NAC (G4) (39% inhibition) when compared with the untreated group (G1) ( $p = 0.036$ ). Furthermore, the development of ACF (1-3 AC) was significantly reduced in groups G3 and G4 by 47% and 41%, respectively ( $p = 0.042$ ). In addition to the ACF stereological analysis, five macroscopic tumours were collected and histologically analysed (Table 3).

#### **3.3 Histopathological analysis (Tumour assay)**

The numbers and incidences of non-invasive and invasive colon tumours are presented in Table 3. The data on the colon tumours detected in the ACF assay were also included.

At the time of sacrifice, the tumours were collected for histopathological analysis. They were classified into invasive, noninvasive, well-differentiated or poorly differentiated tumours. A total of five tumours were obtained in the ACF assay (14 week-study). They belonged to the untreated group (G1) (4 tumours) and the group that was fed 2.5% AP (G2) (1 tumour), and 80% of them were classified as noninvasive tumours. In the 24-week tumour assay, the untreated group (G6) developed invasive (75%) (Figure 3B) and noninvasive (25%) tumours whereas the group that received 5.0% AP (G7) developed only noninvasive tumours (100%) ( $p = 0.005$ ). Additionally, most of the tumours in the untreated group (G6) were histologically classified as high-grade tumours (Figure 3C). A significant reduction ( $p = 0.001$ ) in tumour multiplicity (noninvasive and invasive tumours) was observed in the group that received 5.0% AP (G7) when compared with the untreated group (G6) (14 and 24-week studies). Furthermore, premalignant dysplastic ACF were observed in both the untreated group (G6) and the group fed with 5.0% AP (G7) without any statistically significant difference between the two (data not shown).

### **3.4 Analyses of $\beta$ -catenin, connexin 43, cell proliferation and apoptosis**

The in situ expression of Ki-67, cleaved caspase-3,  $\beta$ -catenin and Cx43 was analysed in all colon tumour sections (Figure 3D2, E2 and F, Figure 4A and B).  $\beta$ -catenin and Cx43 were markedly expressed in the cell membrane of epithelial cells in

the normal colonic mucosa (Figure 3D1 and E1), as previously described (Buhmeida et al, 2008; Kanczuga-Koda et al., 2010). Also in accordance with previous studies, most of the tumours showed altered expression of  $\beta$ -catenin and Cx43 (Figure 3D2, E2 and F).

Most of the colon tumours expressed altered levels of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and the nucleus. However, there was no significant difference in  $\beta$ -catenin expression between colon tumour samples from the untreated group (G6) and the group that was fed 5.0% AP (G7) (data not shown). A reduced expression of Cx43 was observed in both noninvasive and invasive colon tumours in comparison with its membranous expression in normal colon mucosa (Figure 3E2 and F). Additionally, aberrant cytoplasmic  $\beta$ -catenin and Cx43 expression in the colon tumours was frequently observed at the borders of invasion (Figure 3D2, E2 and F).

The indices of positivity for both Ki-67 ( $p = 0.003$ ) and cleaved caspase-3 ( $p = 0.041$ ) were lower in the group that received 5.0% AP (G7) when compared with the untreated group (G6) (Figure 4C and D). Moreover, a lower growth index ( $p = 0.001$ ) was registered in the group fed with 5.0% AP (G7,  $GI\% = 47.45 \pm 6.34$ ) when compared with the untreated group (G6,  $GI\% = 69.51 \pm 6.03$ ).

#### 4. Discussion

The findings of the present study provide the first evidence that AP feeding attenuates the colon carcinogenesis process. Our findings consist of two main points: First, the magnitude of the inhibitory effect on ACF development was very similar to that of the classic antioxidant and anticarcinogenic agent N-acetylcysteine (Seril et al., 2002 Amrouche-Mekkioui & Djerdjouri, 2012); Second, a clear anti-tumour effect was specifically characterised by a reduction in the cell proliferation, multiplicity and invasiveness of chemically induced colon tumours. In addition, AP intake did not show any signs of toxicity on the animals according to their weight gain profiles and food consumption, further demonstrating that AP is a safe and functional food ingredient for cancer chemoprevention studies, as we previously described (Fragoso et al., 2012).

Among the natural products that can potentially inhibit the multistage process of colon carcinogenesis, polyphenols have been considered a suitable choice for cancer prevention especially because of their antioxidant properties (Kang et al., 2011; Gollucke et al., 2012). Polyphenols are categorised as chemopreventive agents because they can quench or prevent the formation of reactive oxygen and nitrogen species that can drive genetic mutations, genomic instability and ultimately carcinogenesis in different target organs (Kang et al., 2011; Tsao, 2010; Kang et al., 2011; Gollucke et al., 2012).

Açaí is an exotic fruit rich in polyphenols and known to possess proper antioxidant and anti-inflammatory properties (Schauss et al., 2006a; Mertens-Talcott et al., 2008; Hogan et al., 2010). Its major polyphenolic compound is anthocyanin, which is the pigment that accounts for the fruit's attractive colour and that has shown many

biological activities including antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities in different *in vivo* and *in vitro* systems (Wang & Stoner, 2008; He & Giusti, 2010). Thus, the high polyphenol content in açai pulps may be responsible for the potential cancer-preventive activity of AP, as observed in this chemically induced rat colon carcinogenesis model.

The detection of colonic preneoplastic/precancerous lesions is essential for clarification of the mechanisms of tumour progression or prevention of colon cancer occurrence (Bird & Good, 2000; Corpet & Taché, 2002; Mori et al., 2004; Femia et al., 2008). ACF are putative preneoplastic lesions easily detected in unsectioned colons under methylene-blue staining and have been fairly consistent predictors of colon tumour outcomes in cancer prevention studies in rodents (Corpet & Taché, 2002; Femia & Caderni, 2008; Arikawa & Gallaher, 2008). In the 14-week ACF assay, a significant reduction in ACF development was observed in the animals fed with 5.0% AP (G3) or 0.2 NAC (G4), especially in terms of the number of ACs. Therefore, our results demonstrate that dietary intake of 5.0% AP attenuates the promotion stage of DMH-induced colon carcinogenesis in male Wistar rats.

The number and multiplicity of ACF are major determinants of the risk for developing colon cancer (Takayama et al., 2005; Alwari et al., 2006). Although numerical reductions in both AC and small ACF (1-3 AC) were observed in the group of animals fed with 5.0% AP, a few ACF may still give rise to putative dysplastic lesions and colon tumours (Mori et al., 2004). Thus, the effectiveness of AP's influence on colon cancer promotion should be further investigated, mainly with long-term

bioassays for tumour development because a low number of colon tumours were detected in our 14-week feeding study.

DMH is a potent mutagen and carcinogen used in different chemically induced colon carcinogenesis rodent models (Newell & Heddle, 2004; Femia & Caderni, 2008). Mimicking the development of sporadic human colon cancer, DMH exposure induces adenomas and adenocarcinomas in the middle and distal colon rather than the proximal colon (Bird & Good, 2000; Yoshimi et al., 2004; Femia & Caderni, 2008). Cell proliferation may lead to an increased risk of developing cancer whereas apoptosis is a protective innate mechanism for eliminating cells with DNA damage or genomic instability (Hanahan and Weinberg, 2011). In addition, an increase in both cell proliferation and apoptosis relative to the normal mucosa during the development of colon tumours in rats has been documented (Mełen'-Mucha and Niewiadomska, 2002). In our 24-week tumour assay, a significant reduction in the cell proliferation indices, the incidence of invasive tumours and tumour multiplicity were observed in the groups fed with 5.0% AP compared with the control group. Thus, dietary açai at 5.0% has the potential to inhibit tumour growth and invasiveness by reducing the imbalance between cell proliferation and cell loss because these processes play key roles in carcinogenesis and tumour progression (Hanahan & Weinberg, 2011).

The progressive imbalance between cell proliferation and apoptosis during the transformation of colonic epithelium into the malignant phenotype has been described (Anti et al., 2001). In addition, high apoptotic cell counts have been associated with high histological grades and poor prognoses in colon cancer (Hilska et al., 2005). The present study showed that apoptotic indices were lower in colon tumours from the 5.0% AP group



than from the untreated group. Because the apoptotic index increases with tumour grade and aggressiveness in certain cancers (Liu et al., 2001; Hiska et al., 2005), it is possible that a lower apoptotic index in colon tumours from the 5.0% AP group indirectly corroborates with the conventional morphology-based histological grading system.

The Wnt pathway is one of the main pathways linked to colon cancer development (Klaus and Birchmeier, 2008; Burgess et al., 2011). It is directly associated with cell proliferation and activated as soon as  $\beta$ -catenin is translocated to the nucleus. The pathway is aberrantly activated when APC is mutated and becomes inefficient in degrading the  $\beta$ -catenin complex (Akaiyama, 2000). Once inside the nucleus,  $\beta$ -catenin can bind to TCF (T Cell Factor) and LEF1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor 1) to signal cell proliferation (Klaus and Buchmeier, 2008; Jamieson et al., 2012). In the 24-week feeding study, the colon tumours showed altered  $\beta$ -catenin expression characterised by a loss or reduction of the protein at the cell-to-cell borders but an over-expression in the cytoplasm and nucleus. No significant difference in the in situ expression of  $\beta$ -catenin was observed in the colon tumours between the untreated group and the group fed with 5.0% AP, which is most likely due to the small number of tumours observed in the latter group.

Connexins are a family of gap junction proteins that form intermembranous aqueous channels for the exchange of ions, metabolites, nucleotides and other small signalling molecules between cells (Trosko and Ruch, 2002; Cronier et al., 2009). The gap junctional intercellular communication (GJIC) is an important factor in the maintenance of tissue homeostasis, proliferation, differentiation and development (Trosko and Ruch, 2002; Cronier et al., 2009). GJIC is characterised by an intercellular channel formatted by two hemichannels, the connexons, and their six transmembrane

protein subunits called the connexins (Trosko and Ruch, 2002; Cronier et al., 2009). There are six different connexins (Cx26, Cx30, Cx32, Cx40, Cx43 and Cx45), which are responsible for the selective permeability of the plasma membrane in a tissue-specific fashion (van der Heyden et al., 1998; Trosko and Ruch, 2002; Cronier et al., 2009).

Aberrant Cx43 expression has been found in different types of tumours, including lung, mammary, colon and liver (Yamasaki et al., 1996; van der Heyden et al., 1998; Trosko and Ruch, 2002; Cronier et al., 2009; Sirnes et al., 2012). In all the cited cases, Cx43 expression in tumour cells was either lost or aberrantly expressed (Yamasaki et al., 1996; Kanczuga-Koda et al., 2010). The most studied connexins in colon cancer are Cx32 and Cx43 (Kanczuga-Koda et al., 2010; Han et al., 2011; Sirnes et al., 2012). Cx43 appears to be downregulated in colon tumours, which may lead to a loss of cell-cell communication. Thus, Cx43 is classified as a tumour suppressor protein due to the loss of its function in regulating intercellular trafficking activity during carcinogenesis (Han et al., 2011; Sirnes et al., 2012). Aberrant expression and activity of Cx43 might be caused by many factors in addition to gene mutations, such as (i) the loss of connexin transcriptional genes; (ii) the loss of connexin mRNA; and (iii) the accumulation of Cx43 in the cytoplasm due to a loss of its membrane targeting signal (van der Heyden et al., 1998; Han et al., 2011). In our 24-week feeding study, the colon tumours exhibited altered Cx43 expression characterised by a loss or reduction of the protein at the cell membrane, but an anomalous expression pattern in the cytoplasm was clearly detected in both the untreated group and the group receiving 5.0% AP.

Sirner and collaborators (2012) have demonstrated that colon cancer cells cannot form Cx43 gap junction channels and that the loss of Cx43 expression is correlated with a poor prognosis in patients with colorectal cancer. When Cx43 is absent from the membrane, it can be localised in the cytoplasm in a granular form and, then, may be degraded by lysosomes, leading to the aberrant regulation of intercellular trafficking (Siner et al., 2012). As detected in our study, the cytoplasmic accumulation of Cx43 was frequently observed at the borders of invasion in the tumour samples from the untreated group, indicating that this abnormality may be associated with tumour invasiveness and may serve as a potential target for cancer prevention measures (Trosko and Ruch, 2002).

A relationship between Cx43 and the Wnt pathway has been previously described, showing that Cx43 colocalises with  $\beta$ -catenin in HT29 cells and that Cx43 is also capable of reducing  $\beta$ -catenin-mediated gene transcription (Sirnes et al., 2012). Thus, both Cx43 and  $\beta$ -catenin expression changes are early events in colon carcinogenesis (Kanczuga-Koda et al., 2004, 2010; Siner et al., 2012). In the present study, there was either a lack of membranous distribution of Cx43 or a shift to predominantly cytoplasmic accumulation of Cx43 in both the untreated group and the group receiving 5.0% AP. In contrast, cytoplasmic accumulations of both  $\beta$ -catenin and Cx43 were frequently observed at the borders of invasion from the tumour samples of the untreated group, indicating that such changes may be associated with tumour progression and invasiveness (van der Heyden et al., 1998).

In summary, our findings suggest that spray-dried açai powder, when fed at the highest concentration (5.0%), significantly attenuates DMH-induced early and late

colon carcinogenesis in male rats. Further investigations on the chemopreventive mechanisms against colon carcinogenesis by dietary açai must still be conducted.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Mariana F. Fragoso and Guilherme R Romualdo were recipients of fellowships from CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PIBIC), respectively.

### **References**

- Akiyama, T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine & Growth Factors Reviews*, 11, 273-282.
- Alrawi, S. J., Schiff, M., Carroll, R. E., Dayton, M., Gibbs, J. F., Kulavlat, M., & Anderson, G. R. (2006). Aberrant Crypt Foci. *Anticancer Research*, 120, 107–119.
- American Cancer Society. Colorectal Cancer: Facts and Figures 2011-2013. United States of America, 2011. Available in: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/ColorectalCancerFactsFigure/s/colorectal-cancer-facts--figures-2011-2013>. Accessed in August 2, 2011.

- Amrouche-Mekkioui, I., & Djerdjouri, B. (2012). N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. *European Journal of Pharmacology*, 691, 209–17.
- Anti, M., Armuzzia, A., Morinid, S., Iasconea, E., Pignataroa, G., Cocob, C., Lorenzette, R., Paoluccia, M., Covinoa, M., & Gasbarrinia, A. (2004). Severe imbalance of cell proliferation and apoptosis in the left colon and in the rectosigmoid tract in subjects with a history of large adenomas. *Gut*, 48, 238-246.
- Araújo, J.R., Gonçalves, P., & Martel, F. 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31, 77-87.
- Arikawa, A.Y., Gallaher, D.D., 2008. Cruciferous vegetables reduce morphological markers of colon cancer risk in dimethylhydrazine-treated rats. *Journal of Nutrition*, 138, 526–532.
- Bird, R. P., & Good, C. K. (2000). The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*, 112-113, 395–402.
- Buhmeida, A., Elzagheid, A., Algars, A., Collan, Y., Syrjänen, K., & Pyrhönen, S. (2008). Expression of the cell-cell adhesion molecule beta-catenin in colorectal carcinomas and their metastases. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 116, 1–9.

- Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., & Ramsay, R.G. 2011. Wnt signaling and colon tumorigenesis - a view from the periphery. *Experimental Cell Research*, 317, 2748-58.
- Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37, 1–24.
- Carvalho, A.V. (Ed.). Agência de Informação Embrapa: açaí. Available in: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/Abertura.html>. Accessed in February, 18, 2011.
- Corpet, D. E., & Pierre, F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer*, 41, 1911–22.
- Corpet, D.E., Taché, S., 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutrition and Cancer*, 43, 1–21.
- Cronier, L., Crespin, S., Strale, P.O., Defamie, N., & Mesnil, M. (2009). Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 323-38
- D'Archivio, M., Santangelo, C., Scazzocchio, B., Vari, R., Filesi, C., Masella, R., & Giovannini, C. (2008). Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction:

- relevance for cancer prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 213–28.
- Das, D., Arber, N., & Jankowski, J.A. (2007). Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*, 76, 51–67.
- Moura, N. A., Caetano, B. F. R., Sivieri, K., Urbano, L. H., Cabello, C., Rodrigues, M. a M., & Barbisan, L.F. (2012). Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2902–10.
- Dias, M. C., Vieiralves, N. F. L., Gomes, M. I. F. V., Salvadori, D. M. F., Rodrigues, M. a M., & Barbisan, L. F. (2010). Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 772–80.
- Femia, A. P., & Caderni, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*, 74, 1602–7.
- Fragoso, M. F., Prado, M. G., Barbosa, L., Rocha, N. S., & Barbisan, L. F. (2012). Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleracea* Martius) Intake. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 235–41.
- Gallori, S., Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Barbosa, W. L. R., & Vincieri, F. F. (2004). Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai palm). *Chromatographia*, 59, 739–743.

- Gollucke, A.P.B., Aguiar Jr, O., Barbisan, L.F., Ribeiro, D.A. (2012). Use of grape polyphenols against carcinogenesis: putative molecular mechanisms of action using in vitro and in vivo systems. *Journal of Medicinal Food*, in press.
- Guo, W., Kong, E., & Meydani, M. 2009. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and Cancer*, 61, 807-10
- Gupta, A. K., & Schoen, R. E. (2009). Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Current Opinion in Gastroenterology*, 25, 59–65.
- Hamilton, S. R., & Aaltonen, L. A. (2000). World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics. *IARC press*, 6, 103.
- Han, Y., Zhang, P. J., Chen, T., Yum, S. W., Pasha, T., & Furth, E. E. (2011). Connexin 43 expression increases in the epithelium and stroma along the colonic neoplastic progression pathway: implications for its oncogenic role. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011, 5617-19.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- He, J., & Giusti, M.M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-87.
- Hilska, M., Collan, Y.U., O Laine, V.J., Kössi, J., Hirsimäki, P., Laato, M., & Roberts, P.J. 2005. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in



predicting survival in colorectal cancer. *Disease of the Colon and Rectum*, 48, 2197-208.

Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., & Zhou, K. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 118, 208–214.

INCA - Instituto Nacional do Câncer - Estatística sobre a incidência de câncer colo-retal na população brasileira. Brasil, 2012. Available in: ([http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5)). Accessed in August 2, 2012.

Jamieson, C., Sharma, M., & Henderson, B. R. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus:  $\beta$ -Catenin caught in a loop. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2–5.

Kanczuga-Koda, L., Koda, M., Sulkowski, S., Wincewicz, A., Zalewski, B., & Sulkowska, M. (2010). Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer - a shift from membranous CX32 and CX43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. *In vivo*, 24, 101–7.

Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J., & Lee, K. W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics*, 130, 310–24.

- Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 8, 387–98.
- Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1771-92.
- Liu, S., Edgerton, S.M., Moore, D.H. 2<sup>nd</sup> & Thor, A.D. (2001). Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 7, 1716-23.
- Lofano, K., Principi, M., Scavo, M. P., Pricci, M., Ierardi, E., & Di Leo, A. (2012). Dietary lifestyle and colorectal cancer onset, recurrence, and survival: myth or reality? *Journal of Gastrointestinal Cancer*, (Epub ahead of print).
- Melen' -Mucha, G., Niewiadomska, H., 2002. Frequency of proliferation, apoptosis, and their ratio during rat colon carcinogenesis and their characteristic pattern in the dimethylhydrazine-induced colon adenoma and carcinoma. *Cancer Investigation*, 20, 700–712.
- Menezes, E., Deliza, R., Chan, H.L., & Guinard, J-X. 2011. Preferences and attitudes towards açai-based products among North American consumers. *Food Research International*, 44, 1997-2008.
- Mertens-Talcott, S. U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L. a, Meibohm, B., Talcott, S. T., & Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of

anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 7796–802.

Mori, H., Yamada, Y., Kuno, T., & Hirose, Y. (2004). Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutation Research*, 566, 191–208.

Newell, L.E., & Heddle, J.A. (2004). The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*, 564, 1-7.

Poulose, S. M., Fisher, D. R., Larson, J., Bielinski, D. F., Rimando, A. M., Carey, A. N., Shukitt-Hale, B. (2012). Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1084–93.

Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Pretlow, T. G., Stellato, T. A. (1992). Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *Journal of Cellular Biochemistry, Supplement*, 16G, 55-62.

Rodrigues, R. B., Lichtenthaler, R., Zimmermann, B. F., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., Marx, F., & Almeida, O. (2006). Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4162–7.

- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8604–10a.
- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D., & Kababick, J. P. (2006). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8598–603b.
- Schauss, A. G., Clewell, A., Balogh, L., Szakonyi, I. P., Financsek, I., Horváth, J., & Hirka, G. (2010). Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active®). *Toxicology*, 278, 46–54.
- Seril, D. N., Liao, J., Ho, K.-L. K., Yang, C. S., & Yang, G.-Y. (2002). Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. *Carcinogenesis*, 23, 993–1001.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinician*, 62, 10-29.
- Sirnes, S., Bruun, J., Kolberg, M., Kjenseth, A., Lind, G. E., & Svindland, A. Brech, A., Nesbakken, A., Lothe, R.A., Leite, E., & Rivedal E (2012). Connexin 43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *International Journal of Cancer*, 131:570-581.

- Stoner, G. D., Wang, L.-S., Seguin, C., Rocha, C., Stoner, K., Chiu, S., & Kinghorn, A. D. (2010). Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. *Pharmaceutical Research*, 27, 1138–45.
- Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Kukitsu, T., Takanashi, K., Ishiwatari, H., Kogawa, T., Abe, T., & Niitsu Y. (2005). Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3, S42–5.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907–914.
- Trosko, J. E., & Ruch, R. J. (2002). Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Current Drug Targets*, 3, 465–82.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–46.
- van der Heyden, M. a, Rook, M. B., Hermans, M. M., Rijksen, G., Boonstra, J., Defize, L. H., & Destrée, O. H. (1998). Identification of connexin 43 as a functional target for Wnt signalling. *Journal of Cell Science*, 111, 1741–9.
- Vidigal, M.C.T.R., Minim, V.P.R., Carvalho, N.B., Milagres, M.P., & Gonçalves, A.C.A. 2011. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá

(*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). *Food Research International*, 44, 1988-1996.

Wang, L.S., & Stoner, G.D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281-90.

Watson, A.J., & Collins, P.D. (2011). Colon cancer: a civilization disorder. *Digestive Disease*, 29, 222-8.

Yamasaki, H., & Naus, C. C. (1996). Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis*, 17, 1199–213.

Yoshimi, N., Morioka, T., Kinjo, T., Inamine, M., Kaneshiro, T., Shimizu, T., Mori, H. (2004). Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Science*, 95, 792–7.

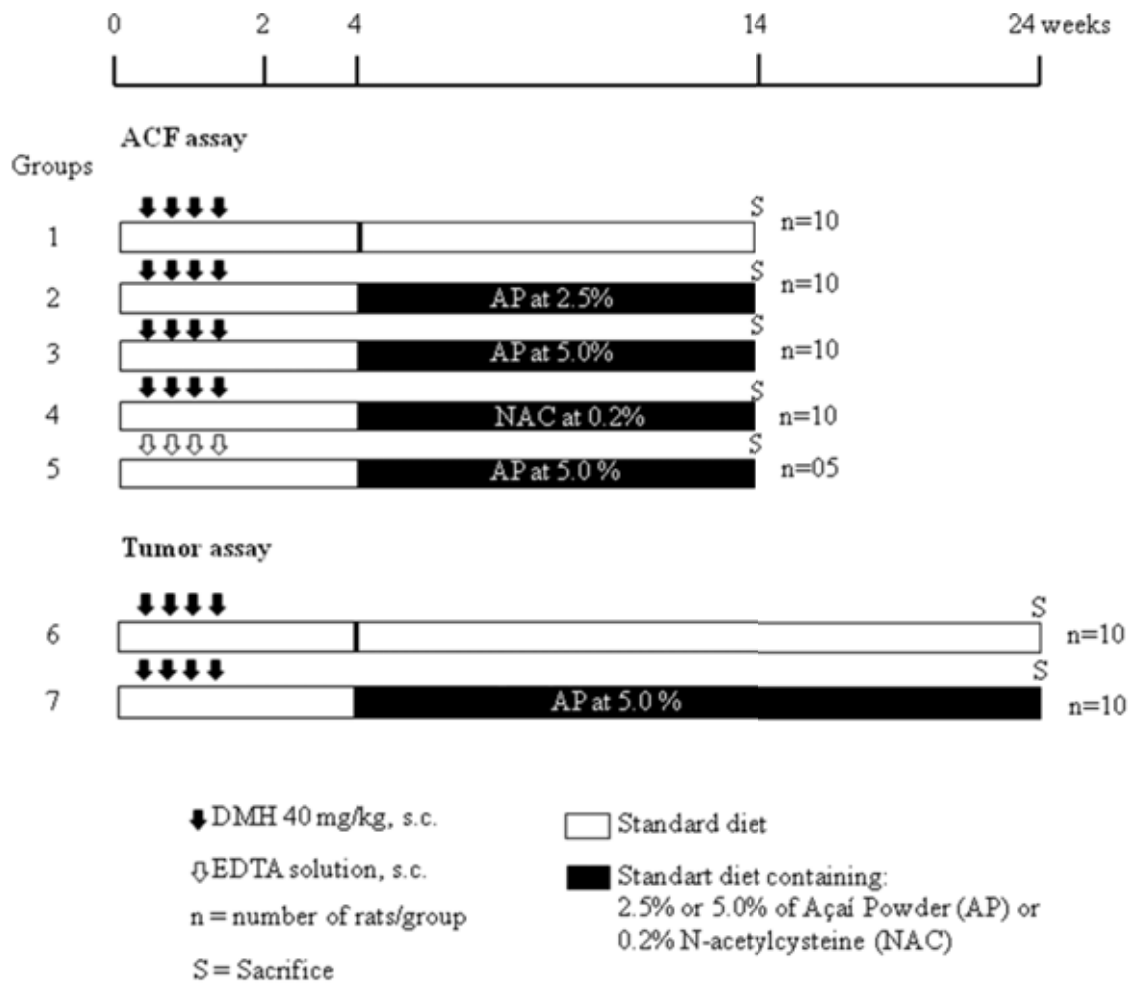
### List of figures

**Figure 1.** Experimental design (for details see Materials and Methods).

**Figure 2.** Flow chart of the spray-dried açai powder production, provided by the CENTROFLORA – ANIDRO DO BRASIL Company.

**Figure 3.** (A) Representative topographic view of classic ACF in a methylene blue-stained colon whole-mount containing five aberrant crypts; (B) Representative microscopic view of one invasive colon tumour detected in HE-stained sections; (C) Representative microscopic view of a histologically high-grade invasive colon tumour; (D1, arrows) Typical cell membrane expression of  $\beta$ -catenin in a non-altered colonic crypt; (D2) Aberrant  $\beta$ -catenin expression in an invasive colon tumour; (E1) Typical cell membrane expression of connexin 43 in a non-altered colonic crypt; (E2) Altered connexin 43 expression in a non-invasive colon tumour; (F) Reduced expression of connexin 43 in an invasive colon tumour. A 40x objective was used for all pictures.

**Figure 4.** (A) Representative Ki-67 immunostaining (brown nuclei) in a colon tumour (40x objective); (B) Representative cleaved caspase-3 immunostaining (brown apoptotic cells or apoptotic bodies) in a colon tumour (60x objective, arrows); (C) Ki-67 labelling indices in tumour sections from the untreated group (G6) and the group fed with 5.0% AP (G7); (D) Cleaved caspase-3 labelling indices in tumour sections from the untreated group (G6) and the group fed with 5.0% AP (G7).



**Figure 1**



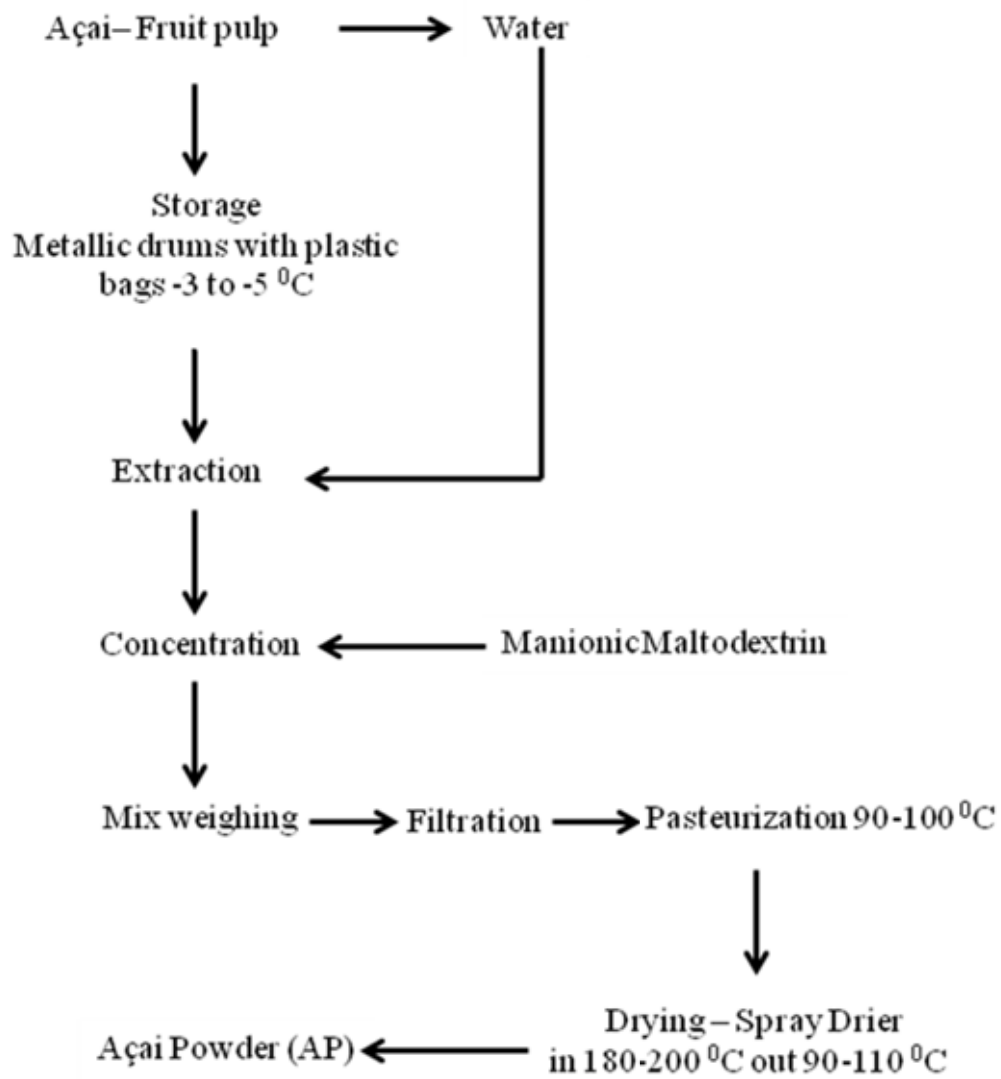
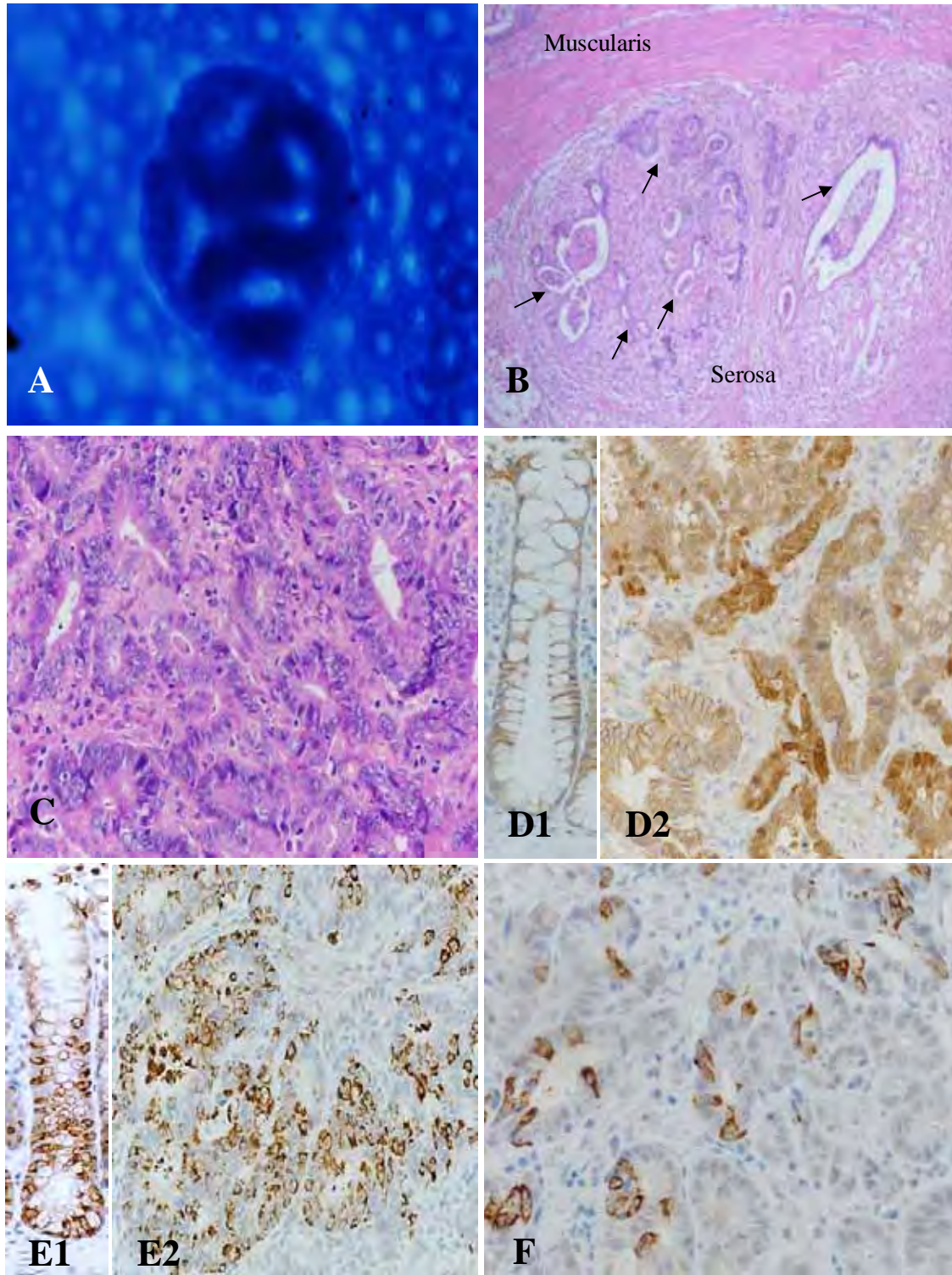


Figure 2



**Figure 3**

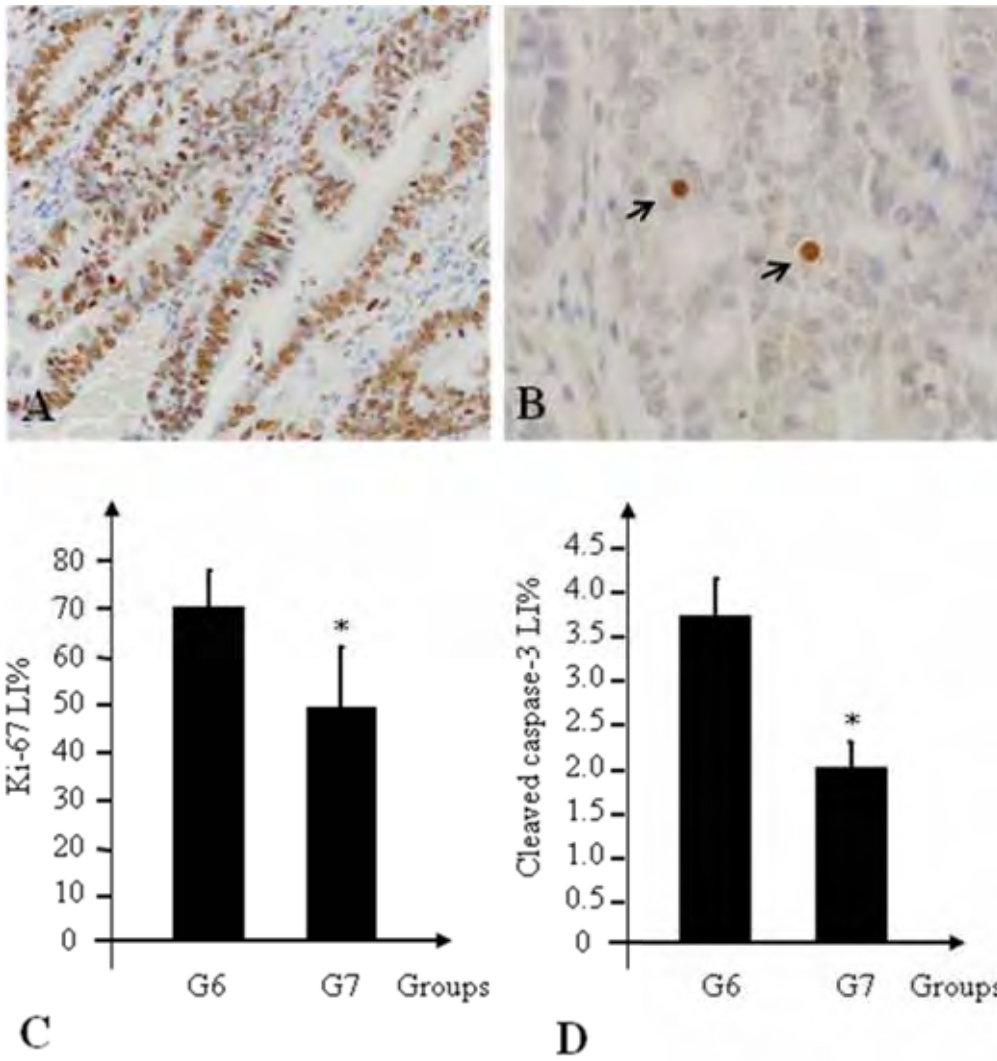


Figure 4

Table 1- Effects of spray-dried açai powder (AP) intake on body weight and food and water consumption parameters in different groups<sup>1</sup>.

Parameters	Group / Treatment <sup>2</sup>					
	DMH-initiated			Non-initiated		
	Untreated	2.5% AP	5.0% AP	NAC	AP 5.0%	AP 5.0%
<i>14-week study</i>	10 <sup>3</sup>	10	10	10	05	05
Final body weight (g)	352.85 ± 16.57	354.18 ± 16.42	352.70 ± 16.25	352.00 ± 16.22	353.24 ± 16.31	353.24 ± 16.31
Body-weight gain (g)	174.09 ± 4.53	183.55 ± 7.96	201.50 ± 11.66	207.5 ± 8.87	200.00 ± 11.17	200.00 ± 11.17
Food consumption (g/rat/day)	27.60 ± 0.29	27.49 ± 0.42	27.24 ± 0.55	27.58 ± 0.461	27.42 ± 0.60	27.42 ± 0.60
Water consumption (ml/rat day)	67.59 ± 8.02	69.23 ± 5.55	70.76 ± 6.40	69.68 ± 3.73	66.99 ± 5.81	66.99 ± 5.81
AP consumption (g/rat/day)	0	0.69 ± 0.03	1.36 ± 0.11	0	1.37 ± 0.10	1.37 ± 0.10
<i>24-week study</i>	10	10	10	10	10	10
Final body weight (g)	416.47 ± 14.83	-	420.48 ± 15.45	-	-	-
Body-weight gain (g)	230.90 ± 16.56	-	248.10 ± 14.71	-	-	-
Food consumption (g/rat/day) <sup>4</sup>	25.52 ± 0.41	-	27.39 ± 0.39	-	-	-
Water consumption (ml/rat day)	56.20 ± 2.04	-	52.21 ± 2.06	-	-	-
AP consumption (g/rat/day)	0	-	1.35 ± 0.07	-	-	-

<sup>1</sup> Values are mean ± S.E.; <sup>2</sup> DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x 40 mg/kg b.wt., s.c.); AP = 2.5% or 5.0% spray-dried açai pulp in the standard diet for 10 or 20 weeks; <sup>3</sup> Final number of animals.

Table 2- Effects of spray-dried açai pulp (AP) intake on the development of colonic aberrant crypt foci (ACF) in a 14-week study <sup>1</sup>.

Treatment <sup>2</sup>	Number of rats	Number of ACF			Total number	
		1-3 AC <sup>3</sup> /colon	≥ 4AC/colon	AC/colon <sup>4</sup>	ACF/colon	
<i>DMH-initiated</i>						
Untreated	10	201.45 ± 28.22	75.90 ± 10.20	735.00 ± 96.58	251.00 ± 37.07	
2.5% AP	10	163.20 ± 21.99	72.95 ± 14.35	700.35 ± 63.03	228.80 ± 31.37	
5.0% AP	10	105.90 ± 9.33*	50.35 ± 11.35	460.75 ± 102.20**	180.05 ± 15.65	
(G4) 0.2% NAC	10	119.15 ± 13.33*	46.35 ± 7.82	449.10 ± 57.93**	158.15 ± 18.21	
<i>Non-initiated</i>						
5.0% AP	05	0	0	0	0	

<sup>1</sup>Values are mean ± S.E.; <sup>2</sup>DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4x 40 mg/kg b.wt., s.c.); AP = 2.5% and 5.0% in the standard diet for 10 weeks; NAC = 0.2% N-acetylcysteine in the standard diet for 10 weeks; <sup>3</sup>AC = aberrant crypt. \*,\*\* Different from the G1 group, p = 0.042 and p = 0.036.

Table 3 - Effects of spray-dried açai powder (AP) intake on colon tumour development in the DMH-initiated animals.

Treatment <sup>1</sup>	Number of rats <sup>2</sup>	14-week study		24-week study		Multiplicity (mean ± S.E)
		Non-invasive (%)	Invasive (%)	Non-invasive (%)	Invasive (%)	
Untreated	10/10	75 (3) <sup>3</sup>	25 (1)	20 (2)	80* (8)	0.73 ± 0.10 (14)
5.0% AP	10/10	0	0	100 (4)	0	0.20 ± 0.09** (4)
2.5% AP	10/0	100 (1)	0	-	-	-
0.2% NAC	05/0	0	0	-	-	-

<sup>1</sup>DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x 40 mg/kg b.wt., s.c.); AP = 2.5% and 5.0% in the standard diet for 20 weeks; NAC = 0.2 % N-acetylcysteine in the standard diet for 20 weeks; <sup>2</sup>Number of animals at 14/24-week study; <sup>3</sup>Total number of colon tumours. \*, \*\*, Different from untreated group, p = 0.005 and p <0.001, respectively.

# *Conclusão Final*

## **Conclusão Final**

O presente estudo investigou o efeito potencial protetor do consumo de açaí na carcinogênese de cólon induzida. Os resultados obtidos mostraram que este consumo inibiu o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA) e tumores de cólon. Além disso, os índices de proliferação celular e apoptoses foram alterados nos grupos tratados com açaí na dieta. Dessa forma, pode-se considerar o açaí como sendo um agente quimiopreventivo potencial contra a carcinogênese de cólon.



# *Anexos*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA"  
FACULDADE DE MEDICINA



FACULDADE DE MEDICINA  
FMB  
FACULDADE DE MEDICINA



CEEA

Comitê de Ética em Experimentação Animal



Check animal de Portaria (PRM) nº 38 de 2004/99

## Certificado

Certificamos que (Protocolo CEEA 881-2011) Efeitos da ingestão de ocaí (Euterpe oleracea Mart) sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar, a ser conduzido por Mariana Franco Fragoso, orientada pelo Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "matos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capellucci  
Secretário da CEEA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/04/2011.

Distribuído Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (Ddx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capelluc@fmb.unesp.br