

ACÇÃO DE PRODUTOS DO JUÇARA NA HISTOMORFOMETRIA DO INTESTINO DELGADO DE MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER COLORRETAL

Ériko dos Santos Moreira de Oliveira¹, Gabriel de Souza da Cruz¹, Daniel Alves de Paula¹, Tiago Zamperlini Moraes², Bruno Pimentel da Silva², Leonardo Oliveira Trivilin³

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, erikosmoliveira@gmail.com, gabrieldesouzadacruz@gmail.com, daniel.paula@edu.ufes.br

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, tiago.moraes@edu.ufes.br, bruno.silva.64@edu.ufes.br

³Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Departamento de Medicina Veterinária, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, leonardo.trivilin@ufes.br

Resumo

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais prevalentes no Brasil e no mundo, associado a fatores dietéticos, inflamatórios e genéticos. A integridade da mucosa intestinal é crucial para a homeostase gastrointestinal, frequentemente comprometida no CCR. Compostos bioativos de plantas, como as antocianinas do açaí juçara (*Euterpe edulis* M.), têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com polpa e extrato liofilizado de juçara na histomorfometria do intestino delgado de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal por 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Utilizou-se 23 ratos distribuídos em controle positivo (DMH+/Juçara-), grupo polpa (DMH+/Juçara+) e grupo extrato (DMH+/Extrato Juçara+). A suplementação com polpa e extrato de juçara resultou em maior altura da parede e da mucosa intestinal em comparação ao controle positivo, sem diferença significativa no comprimento e largura das vilosidades. Conclui-se que a suplementação com açaí juçara, especialmente na forma de extrato, protege a histomorfologia intestinal contra lesões intestinais.

Palavras-chave: Antocianinas. Câncer colorretal. Antioxidantes.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

A superfície luminal do intestino delgado possui modificações que aumentam sua capacidade digestiva e absorviva (Gartner, 2022). A relação cripta-vilosidade na mucosa é a principal unidade de absorção em ratos (Seyyedini; Nazzari, 2017). Ressalta-se que o epitélio é formado por enterócitos e células caliciformes, responsáveis pela absorção de nutrientes e produção de mucina, respectivamente (Junqueira; Carneiro, 2023). Ainda, o intestino delgado também atua como barreira física, bioquímica e imunológica, protegendo o organismo de agentes nocivos (Vancamelbeke; Vermeire, 2017; Lueschow; McElroy, 2020).

Por outro lado, a progressão do câncer colorretal (CCR) compromete a barreira epitelial, perturbando a homeostase intestinal e levando a proliferação e diferenciação anormal (Grazioso; Brandt; Djouder, 2019; Ternet; Kiel, 2021). Estudos avaliando a indução à carcinogênese por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) mostraram que o tecido tumoral pode afetar negativamente a permeabilidade transepitelial e as junções célula-célula, favorecendo a invasão tumoral (Bekusova *et al.*, 2018, 2021). Ademais, com a proliferação tumoral, pode haver invasão da submucosa e a neoplasia se espalhar além do cólon (Brennan; Garrett, 2016).

Experimentalmente, a administração subcutânea de DMH resulta na formação do metilazoximetanol (MAM) no fígado, que pode causar lesões no intestino delgado, embora sejam mais comuns no intestino grosso (Venkatachalam *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 1974; Teague *et al.*, 1981; Sunter; Senior, 1983, *apud* Silva-Reis *et al.*, 2022). Porém, frutas, como a grumixaba e a jabuticaba, contêm compostos bioativos que protegem a mucosa intestinal (Schulz *et al.*, 2020). E os polifenóis, associado aos mecanismos de supressão e progressão do câncer por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, com foco no alto teor de antocianinas, têm mostrado resultados promissores na modulação da saúde e na redução da metástase (Buhrmann *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2018; Schulz *et al.*, 2020; Baptista *et al.*, 2021; Vannuchi *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2023; Moraes *et al.*, 2019). Interessantemente, o açaí juçara (*Euterpe edulis* M.) é uma fruta notável por seus compostos bioativos e pode ser consumida em forma de polpa ou extrato (Schulz *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022).

A análise histomorfométrica é uma técnica importante para avaliar as alterações gastrointestinais e seus impactos (Seyyedini; Nazzem, 2017), sendo utilizada em estudos sobre suplementação de vitamina C (Higa *et al.*, 2007), metionina (Seyyedini; Nazzem, 2017) e estresse alimentar (Lima *et al.*, 2020). Diante do papel do intestino delgado na homeostase intestinal, torna-se relevante compreender como suas estruturas morfológicas são afetadas pela indução a carcinogênese colorretal por DMH. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com açaí juçara (*Euterpe edulis* M.) sobre a histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos à carcinogênese colorretal induzida pelo DMH.

Metodologia

Os animais usados neste estudo foram mantidos de acordo com a Lei Brasileira de Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008). Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 043/2013.

Para este experimento, um único lote de polpa de fruta juçara foi obtido de fornecedor comercial no município de Rio Novo do Sul, região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. As polpas estavam isentas de corantes e conservantes, armazenadas hermeticamente a -20°C protegidas da luz e do oxigênio atmosférico. A extração dos compostos fenólicos e do pigmento de antocianina da polpa da fruta juçara foi realizada no Laboratório de Análises Químicas de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre / ES, segundo metodologia adaptada de Francis (1982). Resumidamente, 20g da polpa da fruta juçara foram diluídas em 200 mL de álcool de cereais 70% e o pH ajustado para 2,5 com ácido cítrico. O extrato foi armazenado a 4°C protegido da luz e do oxigênio atmosférico por 2 horas. Em seguida, o extrato foi filtrado, concentrado em rotoevaporador e liofilizado. As amostras liofilizadas foram armazenadas hermeticamente a 4°C protegidas da luz até o uso.

O pigmento de antocianina total foi quantificado por espectrofotometria usando metodologia de pH diferencial descrita por Giusti e Wrolstad (2001), usando tampão de cloreto de potássio 0,025 M (pH 1,0) e tampão de acetato de sódio 0,4 M (pH 4,5). Os extratos das antocianinas foram diluídos em cada tampão nas proporções 1:10 e 1:25 e as absorvâncias registradas nos comprimentos de onda de 510 nm e 700 nm. O resultado de antocianinas totais foi expresso em mg de cianidina-3-glicosídeo por grama de polpa (Cy-3-glu: massa molar: 449,2 g.mol⁻¹; absorvidade molar: 26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹). Assim, foram encontrados 107,08 mg de cianidina-3-glicosídeo por grama de polpa.

O experimento utilizou 23 ratos Wistar, machos jovens (aproximadamente dois meses de idade), mantidos em grupos de cinco a seis animais por gaiola em sala com temperatura entre 21° e 24°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, e ciclo luz/escurecimento de 12 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: controle positivo (DMH+/Juçara-): animais induzidos a carcinogênese e não suplementados com juçara (7 animais); grupo polpa (DMH+/Juçara+): animais induzidos a carcinogênese e suplementados com o suco do fruto juçara na concentração 0,1% cianidina-3-glicosídeo (1 mg/mL) (9 animais); grupo extrato (DMH+/Extrato Juçara+): animais induzidos à carcinogênese e suplementados com extrato liofilizado do fruto juçara diluídos em água, sendo 1 mg/mL de cianidina-3-glicosídeo (7 animais).

A indução à carcinogênese colorretal com o 1,2-dimetilhidrazina (DMH) foi realizada em 23 animais. A indução ocorreu conforme metodologia modificada por Laranjeira *et al.* (1998). Neste, o DMH foi

dissolvido em NaCl 0,9% contendo como veículo 1,5% de EDTA, em pH final de 6,5 que foi atingido com o uso de solução de NaOH 1N quando necessário. A aplicação do DMH (48 mg/Kg) ocorreu por via subcutânea, uma vez por semana, por um período de cinco semanas, na dose final de 240 mg/kg.

A suplementação com o suco e extrato da polpa iniciou-se uma semana após a indução neoplásica e a disponibilidade deste suplemento ocorreu três vezes por semana, por gavagem, até completarem 23 semanas. Para a suplementação fixou-se a dose de 1 mg/Kg de cianidina-3-glicosídeo por animal.

Realizou-se a eutanásia na 23ª semana, por meio da indução anestésica com cetamina/xilazina (dose de acordo com o peso vivo), seguido da aplicação de cloreto de potássio hipersaturado. Após, segmentos do intestino delgado foram coletados, acondicionados em frascos contendo formalina 10% tamponada e mantido hermeticamente fechados até o processamento histopatológico.

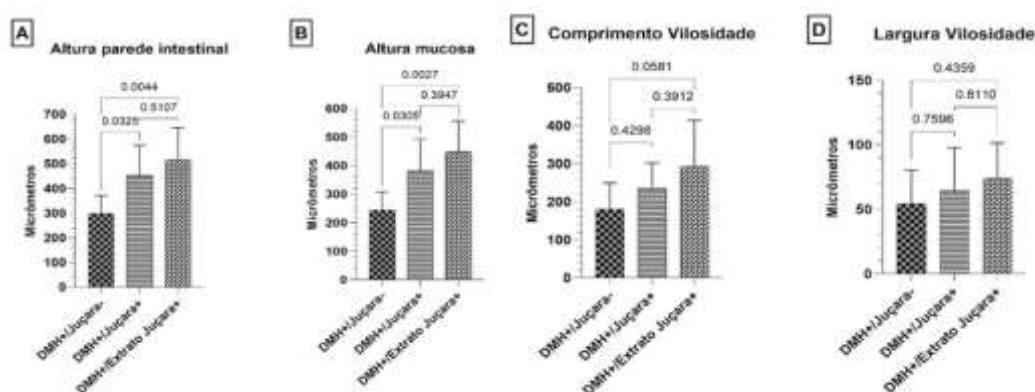
As lâminas foram montadas e analisadas por fotomicrografia digital em microscópio óptico com aumento de 5X, seguidas para a análise histomorfométrica onde foram obtidas mensurações em triplicata para: altura da mucosa intestinal, altura da parede intestinal, altura da microvilosidade, largura da microvilosidade. Em seguida, todos os dados dos parâmetros avaliados foram tabulados e direcionados para a avaliação da distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Após, avaliou-se o efeito da suplementação com produtos do fruto juçara em intestino delgado de ratos induzidos à carcinogênese colorretal, por meio da Análise de Variância para dados não pareados (ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Tukey. Para todas as análises, considerou-se $p = 0,05$. Todas as análises estatísticas e produção de gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism 10.4.1 versão DEMO.

Resultados

Na análise da altura da parede intestinal (Figura 1A), o grupo controle positivo (DMH+/Juçara-) apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo polpa ($p = 0,0325$) e ao grupo extrato ($p = 0,0044$). De forma semelhante, o valor da altura da mucosa (Figura 1B) foi significativamente menor no grupo controle positivo quando comparada ao grupo polpa ($p = 0,0305$) e ao grupo extrato ($p = 0,0027$).

Em contraste, no comprimento das vilosidades (Figura 1C), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), embora haja uma tendência de aumento no grupo tratado com extrato ($p = 0,0581$) em relação ao controle positivo. Por fim, não houve diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) no que diz respeito a largura da vilosidade (Figura 1D), sugerindo que essa característica permaneceu preservada independentemente do tratamento com juçara.

Figura 1 – Análise histomorfométrica do intestino delgado de ratos submetidos à carcinogênese colorretal com ou sem tratamento com açaí juçara (*Euterpe edulis* M.). (A) Altura da parede intestinal; (B) Altura da mucosa; (C) Comprimento das vilosidades; (D) Largura das vilosidades. Os dados estão expressos em micrômetros (μm), representando média $\pm$ desvio padrão. O grupo DMH+/Juçara- corresponde aos animais submetidos à indução carcinogênica sem tratamento com juçara (grupo controle positivo). O grupo DMH+/Juçara+ recebeu a polpa de juçara após indução, enquanto o grupo DMH+/Extrato Juçara+ foi tratado com extrato de juçara.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

Esses achados indicam que ambos tratamentos, principalmente o grupo extrato, demonstraram efeito protetor em relação à carcinogênese induzida por DMH, sugerindo possível regeneração ou preservação da parede e da mucosa intestinal.

O DMH é um agente metabolizado no fígado capaz de induzir a carcinogênese no intestino ao ser transportado tanto pela bile quanto pela corrente sanguínea (Venkatachalam *et al.*, 2020). Seu mecanismo de atuação está associado a impactos deletérios na arquitetura intestinal pelas mutações no DNA de células-tronco dos colonócitos localizados na base das criptas de Lieberkühn, alterando a permeabilidade e as junções estreitas das células intestinais, levando a formação de adenocarcinomas de cólon e, subsequentemente, a metástase do câncer (Bekusova *et al.*, 2018, 2021, 2022). A partir disso, pode-se inferir o mesmo tipo de mecanismo ocorrido nas células-tronco do intestino delgado. No entanto, a suplementação com a polpa e com o extrato de juçara (*Euterpe edulis* M.) foi capaz de atenuar os danos, promovendo a melhora e o retorno original das características estruturais intestinais. Em especial, o grupo tratado com extrato de juçara apresentou melhores resultados em comparação ao grupo tratado com polpa, possivelmente pela predominância de compostos fenólicos (Cardoso *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2016).

Para analisar os parâmetros histomorfométricos do intestino delgado dos ratos submetidos à carcinogênese por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e suplementados com juçara foi utilizada a técnica de histomorfometria, permitindo avaliar e compreender as alterações gastrointestinais e seus impactos no organismo (Seyyedini; Nazzem, 2017). Estudos prévios recorreram ao seu uso em casos para avaliar o potencial da suplementação de vitamina C (Higa *et al.*, 2007), da administração de metionina (Seyyedini; Nazzem, 2017) e as consequências do estresse alimentar na histomorfologia intestinal (Lima *et al.*, 2020). Essa técnica foi eficaz para detectar as alterações estruturais intestinais e avaliar o impacto da indução à carcinogênese colorretal neste estudo. Dessa forma, essa metodologia pode ser aplicada para investigar alterações morfológicas em outras regiões do trato gastrointestinal, auxiliando na avaliação de lesões e efeitos de tratamentos em estudos futuros.

Nesse sentido, os resultados obtidos nesse estudo reforçam a capacidade do açaí juçara (*Euterpe edulis* M.) em atuar como um potencial agente modulador da integridade intestinal. A manutenção da histomorfologia intestinal observada nos grupos suplementados com juçara sugere que a inclusão de alimentos ricos em compostos bioativos pode representar uma estratégia complementar na prevenção de lesões associadas ao CCR e doenças inflamatórias intestinais.

Conclusão

A suplementação com açaí juçara (*Euterpe edulis* M.), na forma de polpa ou extrato liofilizado, demonstrou potencial efeito protetor frente às alterações induzidas por DMH. Destaca-se que o grupo tratado com extrato liofilizado apresentou melhor preservação da arquitetura intestinal quando comparado ao grupo tratado com a polpa, indicando que a forma concentrada dos compostos bioativos, especialmente as antocianinas, pode contribuir de maneira mais efetiva para a manutenção da integridade da mucosa intestinal.

Referências

- BAPTISTA, S. *et al.* Biological activities of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and jucara (*Euterpe edulis* Mart.) intake in humans: An integrative review of clinical trials. **Nutrition Reviews**, v. 79, n. 12, p. 1375-1391, 2021.
- BEKUSOVA, V. *et al.* Increased paracellular permeability of tumoradjacent areas in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. **Cancer Biology & Medicine**, v. 15, n. 3, p. 251, 2018.
- BEKUSOVA, V. *et al.* Effects of 1, 2-dimethylhydrazine on barrier properties of rat large intestine and IPEC-J2 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10278, 2021.

- BEKUSOVA, V. *et al.* Selective Role of TNF α and IL10 in regulation of barrier properties of the colon in dmh-induced tumor and healthy rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15610, 2022.
- BRENNAN, C.; GARRETT, W. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. **Annual review of microbiology**, v. 70, n. 1, p. 395-411, 2016.
- BUHRMANN, C. *et al.* Resveratrol regulates colorectal cancer cell invasion by modulation of focal adhesion molecules. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1073, 2017.
- CARDOSO, A. *et al.* An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (juçara). **Planta Medica**, v. 50, n. 08, p. 487-499, 2018.
- FERNÁNDEZ, J. *et al.* Functional anthocyanin-rich sausages diminish colorectal cancer in an animal model and reduce pro-inflammatory bacteria in the intestinal microbiota. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 133, 2018.
- FRANCIS, F. G. Analysis of Anthocyanins. Anthocyanins as Food colors. **New York: Academic Press**; 1982. p. 182-208.
- FREITAS, R. *et al.* *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n. 1, p. 8173876, 2016.
- GARTNER, P. Tratado de Histologia. 5. ed. Rio de Janeiro: **GEN Guanabara Koogan**, 2022.
- GIUSTI, M. M; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.) **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**(unit F1.2.1–1). John Wiley & Sons.
- GRAZIOSO, T.; BRANDT, M.; DJOUDER, N. Diet, microbiota, and colorectal cancer. **Iscience**, v. 21, p. 168-187, 2019.
- HIGA, O. *et al.* Protective effects of ascorbic acid pretreatment in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury: a histomorphometric study. **Clinics**, v. 62, p. 315-320, 2007.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas. 14. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2023.
- LARANJEIRA, L. L. S; TAHA, M. O; FERME, A; Lemos, R; Plaple rH. (1998). Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. **Acta cirúrgica brasileira** [online], 13(3), 177-182. Disponível em: Acesso em: 26 agosto 2025.
- LIMA, M. N. G. *et al.* Histomorfometric Analysis of Duodenum of Rats Submitted to Food Stress. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 9747-9761, 2020.
- LUESCHOW, S. R.; MCELROY, S. J.. The Paneth cell: the curator and defender of the immature small intestine. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 587, 2020.
- MORAES, L. F. S. *et al.* Anthocyanins/anthocyanidins and colorectal cancer: What is behind the scenes?. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 1, p. 59-71, 2019.

MORAIS, R. A. *et al.* Nutritional composition and bioactive compounds of native Brazilian fruits of the Arecaceae family and its potential applications for health promotion. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 4009, 2022.

SCHULZ, M. *et al.* Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits—A review. **Food Research International**, v. 137, p. 109744, 2020.

SEYYEDIN, S.; NAZEM, M. N. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. **Folia morphologica**, v. 76, n. 4, p. 620-629, 2017.

SILVA-REIS, R. *et al.* An integrative approach to characterize the early phases of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in the rat. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 409, 2022.

SIQUEIRA, A. P. S. *et al.* Effects of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) on health: An overview of clinical and experimental studies and call for action. **Nutrients**, v. 15, n. 8, p. 1809, 2023.

TERNET, C.; KIEL, C. Signaling pathways in intestinal homeostasis and colorectal cancer: KRAS at centre stage. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 31, 2021.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821-834, 2017.

VANNUCHI, N. *et al.* Chemical composition, bioactive compounds extraction, and observed biological activities from jussara (*Euterpe edulis*): The exotic and endangered Brazilian superfruit. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 3192-3224, 2021.

VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology research**, v. 9, n. 1, p. 2-18, 2020.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo, Brazil (Fapes) - Edital FAPES Universal nº 03/2017 [80707750/18].