

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA  
E MEDICINA LEGAL**

**EVERTON FÉLIX CESAR**

**Estudo comparativo dos efeitos do álcool, vinho tinto  
e suco de uva na carcinogênese colônica  
experimental**

**Ribeirão Preto**

**2023**

EVERTON FÉLIX CESAR

Estudo comparativo dos efeitos do álcool, vinho tinto e suco de uva  
na carcinogênese colônica experimental

Versão corrigida

*Tese de doutorado apresentada ao  
Departamento de Patologia e Medicina  
Legal da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Doutor.*

*Área de concentração: Patologia.*

*Opção: Patologia Experimental.*

*Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia*

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cesar, Everton Félix.

Estudo comparativo dos efeitos do álcool, vinho tinto e suco de uva na carcinogênese colônica experimental

155 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Patologia experimental.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto.

1. Suco de Uva 2. Vinho Tinto 3. Álcool 4. Carcinogênese 5. Carcinoma Colorretal 6. Quimioprevenção 7. Inflamação 8. Apoptose

Nome: Everton Félix Cesar

Título: Estudo comparativo dos efeitos do álcool, vinho tinto e suco de uva na carcinogênese colônica experimental

*Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.*

*Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia*

**Banca Examinadora**

1) Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

4) Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha saudosa mãe, Lia. Mãe solteira que precisou abdicar de seus sonhos muito cedo para sustentar a casa e seu único filho. Mulher que acreditava que através da educação é possível transformar vidas. Mãe, muito obrigado por sempre acreditar no meu potencial e por me mostrar que a educação é a base de tudo, seu incentivo transformou minha vida. Querida mãe, não há um dia que não sinta sua falta, espero que onde quer que esteja possa ter orgulho do homem que seu filho se tornou.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha companheira **Veridiana Ederli Sunega** por todo amor, compreensão, parceria e apoio incondicional em quase 2 décadas juntos, agora com nossos presentes **Maitê Sunega Félix** e **Jorge Sunega Félix**, que me transformaram em pai ao longo desse trabalho. Eu sou extremamente afortunado por compartilhar com você essa existência e de termos construído uma família linda, a qual sempre sonhei. Maitê, filha, obrigado por sempre me oferecer o sorriso mais lindo e sincero desse mundo. Papai, te ama. Jorge, você veio para completar nossa família, nome de santo guerreiro, você já é um vencedor, papai te ama. Verê, o mais puro amor, meu amor à primeira vista, minha paixão da adolescência, a alma gêmea e tudo mais que eu poderia esperar de um amor verdadeiro, eu te amo.

Agradeço ao meu orientador, **Profº Dr. Sérgio Britto Garcia** por ter acreditado em mim e ter me oferecido essa oportunidade única. Graças à sua generosidade consegui chegar aonde estou. Serei eternamente grato por toda a ajuda, ensinamentos e conselhos que me passou.

Agradeço à toda minha família materna por sempre me incentivarem a fazer o meu melhor, por vibrarem comigo em cada conquista, pelo carinho que sempre recebo e pela admiração que não mereço. **Família Félix**, minhas conquistas são vossas conquistas.

Agradeço à **Ste (Stefania Bovo Minto)** por toda ajuda, compreensão e por sempre estar disposta a ajudar e compartilhar conhecimentos, vitórias e frustrações. Ste, sua amizade vale mais que ouro.

Agradeço à querida **Célia R. L. Marino (Celinha)**, sempre disposta a ajudar quem quer que seja com um sorriso no rosto. Obrigado pela amizade e carinho.

Às técnicas do nosso laboratório, **Rosângela O. Lopes** e **Érika P. D. Gual**. Obrigado pela atenção e disponibilidade em ajudar.

Agradeço à todas as amigadas que o Departamento de Patologia me proporcionou ao longo desses anos, em especial à secretária **Camila**

**Zambonini** por toda paciência, orientações e amizade. A todos os funcionários, colaboradores e professores, meu muito obrigado.

Agradeço à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP**, onde fiz minha primeira graduação e tive meu primeiro contato com a ciência e o mundo acadêmico. Ali iniciei minha trajetória científica, de lá, trago amizades e memórias que carrego no meu coração.

Agradeço imensamente à **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, em especial ao **Departamento de Patologia e Medicina Legal**, minha segunda casa na Universidade de São Paulo, mas nem por isso menos especial que a primeira. Nesse campus lindo fiz minha graduação em medicina e estou realizando o sonho da pós-graduação.

Agradeço à **CNPQ**, por fomentar a ciência no Brasil e acreditar nos pesquisadores brasileiros. Obrigado por todo o suporte financeiro, por proporcionar a realização deste trabalho e a realização de um sonho antigo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – FinanceCode 001”

***“Sucesso não é a chave para a felicidade. A felicidade é a chave para o sucesso. Se você ama o que está fazendo, terá sucesso.”***

***(Albert Schweitzer)***



## RESUMO

CESAR E.F. **Estudo comparativo dos efeitos do álcool, vinho tinto e suco de uva na carcinogênese colônica experimental.** Tese de Doutorado. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum e uma das principais causas de morte por câncer em todo o mundo, sendo o segundo em mortalidade. Fatores ambientais, dietéticos e de estilo de vida, incluindo ingestão de álcool e histórico familiar, são os fatores de risco mais associada ao CCR. Está bem estabelecido que existe uma associação entre o consumo de álcool e risco aumentado de câncer colorretal. Múltiplas vias, incluindo inflamação, estresse oxidativo e apoptose, estão envolvidas na incidência e progressão do CCR. Por outro lado, os produtos e subprodutos quimiopreventivos da uva têm grandes propriedades promotoras da saúde. Os compostos polifenólicos em produtos de uva têm diferentes funções farmacológicas, incluindo anti-inflamatório e prevenção do câncer. Esses compostos podem modular múltiplas vias de sinalização envolvidas na proliferação celular e apoptose em células transformadas, além de potencializar o sistema imunológico do hospedeiro e favorecer um tratamento eficaz. Muitos estudos demonstraram que o vinho e o suco de uva também podem representar um efeito quimiopreventivo no CCR. No entanto, ainda não está claro se a presença de álcool no vinho pode prejudicar ou não as propriedades quimiopreventivas de seus compostos. Nossos experimentos focam na carcinogênese do câncer colorretal induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) em ratos e como tratamentos com vinho, suco de uva e álcool afetaram o processo de carcinogênese. Para entender melhor a resposta a esses diferentes tratamentos, realizamos análises de estresse oxidativo, histoquímica e imuno-histoquímica com o objetivo de elaborar os mecanismos subjacentes. O principal achado do nosso trabalho foi que o suco de uva concentrado foi capaz de atenuar a progressão da carcinogênese induzida pelo carcinógeno MNNG' (60mg/kg) em ratos Wistar. Além disso, o suco de uva demonstrou ser eficaz na prevenção do crescimento e desarranjo estrutural das células colônicas expostas ao MNNG, o mesmo fenômeno não foi observado com o vinho tinto; o suco de uva inibiu a proliferação celular, sugerindo que esse efeito se deva à promoção da apoptose por meio da ativação

de CASP-3 e inibição da via Akt/Surv. Em contrapartida, o álcool mitigou os efeitos anticancerígenos dos compostos derivados da uva presentes tanto no suco de uva como no vinho, e, ainda, contribuiu de forma sinérgica ao MNNG' para o desenvolvimento da carcinogênese. Postulamos que isso ocorreu devido à sua ação pró-inflamatória, demonstrada pelo aumento da expressão de NFkB e aumento dos níveis de produção de MDA. Em conclusão, o álcool aumentou o estresse oxidativo e promoveu a carcinogênese, enquanto o suco de uva teve efeitos opostos. Tanto o vinho tinto quanto o suco de uva adicionado ao álcool apresentaram efeitos neutros na carcinogênese colônica.

**Palavras-chave:** Suco de Uva, Vinho Tinto, Álcool, Carcinogênese, Carcinoma Colorretal, Quimioprevenção, Inflamação, Apoptose

## ABSTRACT

CESAR E.F. **Comparative study of the effects of alcohol, red wine and grape juice on experimental colonic carcinogenesis**. Doctoral thesis. Department of Pathology and Forensic Medicine – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2023.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and one of the main causes of cancer death in the entire world, ranking second in mortality. Environmental and dietary factors, lifestyle, alcohol intake and family history are risk factors associated to CRC. It is well-established that there is an association between alcohol consumption and an increased risk of colorectal cancer. Multiple pathways including inflammation, oxidative stress, and apoptosis are involved in incidence and progression of CRC. On the other hand, chemopreventive grape products and by-products have great health promoting properties. Polyphenolic compounds in grape products have different pharmacologic functions including anti-inflammation and cancer prevention. These compounds may modulate multiple signaling pathways involved in cell proliferation and apoptosis in transformed cells, they also enhance the host immune system and favor an effective treatment. Many studies have demonstrated that wine and grape juice might also represent a chemo preventive effect on CRC. However, it is still unclear whether presence of alcohol in wine could hinder the chemopreventive properties of its compounds or not. Our experiments focus on the carcinogenesis of colorectal cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in rats and how wine, grape juice and alcohol treatments affected the carcinogenesis process. To better understand the response to those different treatments we performed analysis of stress oxidative, histochemical and immunohistochemical aiming to elaborate underlying mechanisms. The main finding of our work was that concentrated grape juice was able to attenuate the progression of carcinogenesis induced by the carcinogen MNNG' (60mg/kg) in Wistar rats. Furthermore, grape juice has been shown to be effective in preventing the growth and structural disarrangement of colonic cells exposed to MNNG, the same phenomenon was not observed with red wine; grape juice inhibited cell proliferation, suggesting that this effect is due to the promotion of apoptosis through CASP-3 activation and inhibition of the Akt/Surv pathway. On

the other hand, alcohol mitigated the anticancer effects of grape-derived compounds present in both grape juice and wine, and also contributed synergistically to MNNG' for the development of carcinogenesis. We postulate that it was due to its pro-inflammatory action, demonstrated by increased NFkB expression and increased levels of MDA production. In conclusion, alcohol increased oxidative stress and promoted carcinogenesis, while grape juice had opposite effects. Both red wine and grape juice added to alcohol presented neutral effects on colonic carcinogenesis.

**Keywords:** Grape Juice, Red Wine, Alcohol, Carcinogenesis, Colorectal Carcinoma, Chemoprevention, Inflammation, Apoptosis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Desenho do delineamento experimental da carcinogênese.....	50
<b>Figura 2:</b> Fotomicrografia com coloração H.E. criptas colônicas.....	67
<b>Figura 3:</b> Fotomicrografia de imunomarcção para PCNA.....	68
<b>Figura 4:</b> Fotomicrografia de imunomarcção para Caspase-3.....	72
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia de imunomarcção para NFkB.....	74
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografia de imunomarcção para AKT.....	77
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografia de imunomarcção para SURV.....	80
<b>Gráfico 1A:</b> Concentração de MDA no cólon.....	61
<b>Gráfico 1B:</b> Concentração de MDA no cólon.....	62
<b>Gráfico 2A:</b> Criptas Aberrantes.....	63
<b>Gráfico 2B:</b> Criptas Aberrantes de grande tamanho.....	64
<b>Gráfico 3:</b> Comprimento das Criptas.....	65
<b>Gráfico 4:</b> Corpúsculos Apoptóticos.....	66
<b>Gráfico 5:</b> Concentração de PCNA.....	69
<b>Gráfico 6A:</b> CASP-3 epitelial.....	70
<b>Gráfico 6B:</b> CASP-3 estromal.....	71
<b>Gráfico 7A:</b> NFkB epitelial.....	73
<b>Gráfico 7B:</b> NFkB estromal.....	74
<b>Gráfico 8A:</b> Akt Epitelial.....	75
<b>Gráfico 8B:</b> Akt Estromal.....	76
<b>Gráfico 9A:</b> SURV Epitelial.....	78
<b>Gráfico 9B:</b> SURV Estromal.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
AF	Ácidos fenólicos
AINES	Anti-inflamatório não estereoidal
Akt	Serina/Treonina kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
AOM	Azoxymethane
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
CASP-3	Caspase-3
CD44	Glicoproteína de superfície celular
CCR	Câncer colorretal
CIMP	Fenótipo metilador da ilha CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
CK1	Caseína quinase 1
CPNM	Câncer de pele não melanoma
CoAp	Corpúsculos Apoptóticos
COX-2	Ciclooxigenase-2
CO2	Dióxido de carbono
CYP2E1	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1)
DAB	3,3' Diaminobenzidina
DMH	Dimetil-hidrazina
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA metiltransferase
DSB	Double Strand Brake
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
DTNB	5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitélio mesenquima

EROs	Espécies reativas do oxigênio
FCA	Foco de Criptas Aberrantes
GLOBOCAN	Global Cancer Data
GSH	Glutathiona reduzida
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
H.E.	Hematoxilina-Eosina
HNPCC	Hereditary Nonpolypoid Colorectal Cancer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JNKJUN	c-Jun N-terminal cinase
kDa	KiloDaltons
Ki-67	Proteína nuclear ki67
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MAT	Microambiente tumoral
MEC	Matriz extracelular
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases
MNNG	N-Metil-N-nitroso-N-guanidina
MSI	Instabilidade de microssatélites
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Cloreto de Sódio
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NOS	Nitric Oxide Synthase
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PdG	N2-propano-2'-desoxiguanosina

PBS	Phosphate Buffer Saline
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase gamma
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
p53	Proteína 53
p65	Proteína 65
p21Waf/Cif1	inibidor 1 da quinase dependente de ciclina
RESV	Resveratrol
SURV	Survivina
STAT3	Ativador da transcrição 3
TLR	Toll like receptor
TNF- $\alpha$	Tumoral Necrosis Factor – alfa
TNF- $\beta$	Tumoral Necrosis Factor – beta
TRIS–HCl	Solução de Tris (hidroximetil) aminometano e Ácido clorídrico
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WCRF	World Cancer Research Fund
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless-type



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$

Alfa

$\beta$

Beta

$\gamma$

Gamma

$\kappa$

Kappa

## LISTA DE TERMOS EM OUTRAS LINGUAS

*Vitis vinífera*

*Vitis labrusca*

*Vitis labrusca l.*

*Vitis aestivalis-cinerea*

Tight junctions

## **SUMÁRIO**

1. Introdução.....	21
1.1 Cancer Colorretal – uma visão sócioepidemiológica.....	22
1.2 Quimioprevenção do Câncer Colorretal .....	24
1.3 Uva, Suco de Uva, Vinho Tinto e seus compostos bioativos .....	26
1.3.1 Compostos Bioativos Não-Flavonóides.....	28
1.3.2 Compostos Bioativos Flavonóides .....	30
1.3.3 Consumo brasileiro de derivados de uva .....	31
1.4 Álcool e Câncer Colorretal.....	32
1.4.1 Promoção tumoral associada à inflamação .....	34
1.4.2 Produção de Acetaldeído.....	35
1.4.3 Alteração na permeabilidade do colon.....	36
1.5 Microambiente tumoral e inflamação no CCR.....	37
1.6 Carcinogênese Experimental .....	43
2. Justificativa e Relevância .....	44
3. Objetivos .....	46
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos .....	47
3.2.1 Análise de estresse oxidativo:.....	47
3.2.2 Estudo histopatológico colônico:.....	47
3.2.3 Imunomarcadores de carcinogênese:.....	47
4. Materiais e Métodos.....	48
4.1 Animais – Consideração geral .....	49
4.2 Delineamento Experimental .....	49
4.2.1 Desenho do Experimento.....	50
4.3 Preparo do Carcinógeno Químico.....	51
4.4 Carcinogênese Experimental .....	51
4.5 Tratamento com Suco de Uva, Solução de Suco de Uva + Álcool e Vinho Tinto.....	51
4.6 Eutanásia dos Animais.....	53
4.7 Coleta e processamento dos tecidos.....	54
4.8 Análise Bioquímica para as dosagens de GSH e MDA .....	55
4.9 Análise dos Focos de Criptas Aberrantes .....	56
4.10 Análise Quantitativa de Corpúsculos Apoptóticos .....	56
4.11 Imunoistoquímica.....	57
4.12 Análise Estatística .....	59

5. Resultados.....	60
5.1 MDA e GSH - Análise do estresse oxidativo no cólon .....	61
5.2 Análise dos focos de Criptas Aberrantes .....	62
5.3 Avaliação da dimensão das criptas colônicas aparentemente normais .....	64
5.4 Avaliação da Apoptose através dos Corpúsculos Apoptóticos .....	65
5.5 Expressão do PCNA no cólon .....	67
5.6 Expressão de Caspase-3 (CASP-3) no Epitélio.....	69
5.7 Atividade da Caspase-3 (CASP-3) no Estroma .....	70
5.8 Expressão do NFkB no Epitélio .....	72
5.9 Expressão do NFkB no Estroma .....	73
5.10 Expressão de AKT no Epitélio .....	75
5.11 Expressão da AKT no Estroma .....	76
5.12 Expressão da Survivina (SURV) no Epitélio.....	77
5.13 Expressão da Survivina (SURV) no Estroma.....	78
6. Discussão .....	81
6.1 Impacto do suco de uva no tecido colônico .....	82
6.2 Impacto do Álcool no tecido colônico.....	85
6.3 Apoptose: o denominador comum do Suco de Uva e do Vinho Tinto .....	87
6.4 Álcool, Inflamação e estresse oxidativo .....	96
6.5 Suco de Uva ou Vinho Tinto: qual é o melhor? .....	99
7. Conclusões.....	101
8. Referências .....	103
9. Anexos .....	130
9.1 Aprovação do Comitê de Ética de Exeprimentação animal .....	131
9.2 Artigo Científico .....	132

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CANCER COLORRETAL – UMA VISÃO SÓCIOEPIDEMIOLÓGICA

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019 câncer foi a primeira ou a segunda principal causa de morte antes da idade de 70 anos em 112 de 183 países ocupando o terceiro ou quarto lugar em outros 23 países (World Health Organization (WHO), 2020). Sendo, portanto, uma barreira importante para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo. Segundo os dados do último levantamento realizado pela GLOBOCAN, somente no ano de 2020, houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma (CPNM), exceto carcinoma basocelular) e 10 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo CPNM, exceto carcinoma basocelular) em todo o mundo. Destes, mais de 1,9 milhão de novos casos de câncer colorretal (CCR) e 935.000 mortes foram estimados para esse mesmo ano (SUNG; FERLAY; SIEGEL et al., 2021). No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2023-2025 sugere que sejam diagnosticados 45.630 novos casos de CCR. Desse total de casos, 21.970 seriam diagnosticados em homens e 23.660 em mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2023).

O CCR é o segundo câncer adulto mais comum em mulheres e o terceiro mais comum em homens, e é a quarta principal causa de morte por câncer, representando 9,2% das mortes em todo o mundo (BRAY et al. 2018; DEKKER et al., 2019). A literatura tem evidenciado que o CCR ocupa o terceiro lugar em termos de incidência, porém, o segundo em termos de mortalidade dentre todos os tipos de câncer no mundo. Sendo que as taxas de incidência são aproximadamente 4 vezes maiores nos países em desenvolvimento quando em comparação com os países desenvolvidos. (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE; SOERJOMATARAM; JEMAL; BRAY, 2021).

Idade, fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante no desenvolvimento do CCR. Sabe-se que o CCR apresenta fatores de risco relacionados ao estilo de vida e que estes variam de acordo com as condições socioeconômicas da população. (OLIVEIRA; LATORRE; TANAKA; ROSSI; CURADO, 2018). Dentre os inúmeros fatores de risco modificáveis,

destacam-se o tabagismo, dieta pouco saudável (alto consumo de carne vermelha e processada e baixo consumo de frutas, de vegetais e fibra alimentar), consumo de bebidas com alto teor de álcool, sedentarismo e excesso de peso corporal (World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. 2018). Carnes vermelhas e processadas demonstraram ser ricas em compostos N-nitrosos prejudiciais ao DNA, bem como carnes cozidas em altas temperaturas (ou seja, grelhadas, grelhadas ou enegrecidos) que contêm altos níveis de aminas heterocíclicas mutagênicas (VARGAS; THOMPSON, 2012).

Os fatores de risco supracitados foram responsáveis por mais da metade de casos e mortes por CCR nos Estados Unidos da América entre 1995 e 2016. (ISLAMI; GODING; MILLER; SIEGEL; FEDEWA; JACOBS; McCULLOUGH; PATEL; MA; SOERJOMATARAM; FLANDERS; BRAWLEY; GAPSTUR; JEMAL, 2017).

O fator socioeconômico tem tido grande impacto em todos os demais fatores de risco denominados modificáveis. Isto é, quanto maior o IDH maior a incidência de CCR em determinada população. Nos últimos anos a população dos países em desenvolvimento tem levado um estilo de vida mais ocidentalizado, ou seja, a população passou a comer mais alimentos ultraprocessados e se tornou mais sedentária. Observou-se, portanto, um aumento na incidência de CCR nos países emergentes, uma vez que esses hábitos estão diretamente associados ao desenvolvimento econômico. (OLIVEIRA; LATORRE; TANAKA; ROSSI; CURADO, 2018). Desta forma, o CCR pode ser considerado um marcador de desenvolvimento socioeconômico. No entanto, o status socioeconômico tem impacto não apenas na incidência de CCR bem como também no seu desfecho clínico. Em uma metanálise realizada por COUGHLIN, em 2020, ficou demonstrado que o status socioeconômico é um preditor independente do estágio do CCR no momento do diagnóstico, casos do grupo com status socioeconômico mais alto apresentam maior probabilidade de diagnosticar a doença em estágio inicial do que aqueles do grupo de status socioeconômico mais baixo, que apresentaram doença mais avançada (COUGHLIN, 2020).

Felizmente, além da prevenção primária através do rastreamento para o CCR existem alguns fatores de proteção que podem ajudar a mitigar o desenvolvimento do CCR. Os fatores de proteção que foram associados a uma diminuição na incidência de CCR incluem atividade física regular, dieta rica em frutas e vegetais, dieta rica em fibras, dieta rica em folato, cálcio, laticínios, vitamina D, vitamina B6, ingestão de magnésio, consumo de peixe, alho, uso regular de aspirina, anti-inflamatórios não esteróides (AINES) (THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Uma outra estratégia que pode atuar como fator protetor é a redução no consumo de álcool. Kim e colaboradores demonstraram que reduzir o consumo de álcool de níveis pesados para moderados ou leves foi associado a uma diminuição do risco de câncer relacionado ao álcool e a todos os tipos de câncer (KIM et al., 2022). Parar o consumo de álcool não foi associado a uma menor incidência de câncer relacionado ao álcool, mas se a abstinência fosse mantida ao longo do tempo, a incidência de câncer relacionado ao álcool e todos os cânceres tenderia a diminuir. (KIM et al., 2022).

## 1.2 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER COLORRETAL

A quimioprevenção do câncer refere-se ao uso de agentes para a inibição, retardo ou reversão da carcinogênese antes que ocorra a invasão local dos tecidos (BENETOU; LAGIOU A; LAGIOU P, 2015).

O resveratrol e a antocianina, presentes no vinho e suco de uva, têm efeitos antiproliferativos no crescimento de células de câncer colorretal e podem ajudar a prevenir seu aparecimento (SCHNEIDER; VINCENT; DURANTON; BADOLO; GOSSE; BERGMANN et al., 2000. YI; FISCHER; KREWER; AKOH, 2005).

Além do vinho, outros derivados de uva, como o suco de uva, podem se apresentar como um fator protetor contra o desenvolvimento do CCR. Contudo, a literatura demonstra que tais benefícios dependem da quantidade consumida e do tipo de composto alcóolico. Logo, há um interesse crescente em várias dietas, bebidas e alimentos naturais como uma potencial forma de controlar, prevenir o aparecimento de CCR. Estudos epidemiológicos exibindo efeito



protetor de dietas ricas em frutas e vegetais contra diferentes tipos de câncer têm atraído atenção crescente para a possibilidade de explorar metabólitos secundários biologicamente ativos de plantas para combater o câncer (ALAM; ALMOYAD; HUQ, 2018).

Muitos estudos demonstraram repetidamente que os componentes alimentares bioativos presentes em frutas, vegetais e especiarias exibem efeitos quimiopreventivos do câncer em uma variedade de modelos pré-clínicos e, portanto, chamaram muita atenção devido à sua capacidade de suprimir o câncer (TARAPORE; SIDDIQUI; MUKHTAR, 2012). Ademais, esses compostos bioativos derivados da dieta apresentaram também o potencial de reduzir os efeitos do desenvolvimento do CCR, despertando muitos interesses entre os pesquisadores (GANESAN; XU, 2017; KUPPUSA; YUSOFF; MANIAM; ICHWAN; SOUNDHARRAJAN; GOVINDAN, 2014). As ações dos compostos bioativos são variadas, dependendo de substâncias químicas distintas, visando vias diversas e benéficas para a saúde humana. Nas diversas investigações pré-clínicas com compostos bioativos em modelos de CCR ficou demonstrado a presença de atividades anticancerígenas. Recentemente, novos resultados sugerem a existência de vários compostos novos com tal propriedade, como apigenina, betanina,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, sulfeto de dialila, galato de etila, ácido gálico, resveratrol, quercetina, luteolina, silimarina (GANESAN; XU, 2017). Esses compostos são inofensivos do ponto de vista toxicológico e podem ser empregados no tratamento sinérgico para diminuir o crescimento de células cancerígenas por meio de mediadores quimioterápicos (SINGH; SINGH, 2012).

Estudos extensivos mostraram o efeito quimiopreventivo dos polifenóis dietéticos. Esses antioxidantes naturais podem prevenir o aparecimento de cânceres do trato gastrointestinal, melhorando assim o bem-estar humano. Os polifenóis são potentes sequestradores de EROs e outros radicais livres que causam danos ao DNA e transformação neoplásica. Os efeitos quimiopreventivos dos polifenóis se estendem à prevenção da ativação pró-carcinogênica, regulação negativa da inflamação e inibição da proliferação celular, interferindo nas atividades do ciclo celular das células cancerígenas.

### 1.3 UVA, SUCO DE UVA, VINHO TINTO E SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS

As uvas têm uma longa história e fazem parte da dieta humana há mais de 6.000 anos. Ao longo dos séculos têm sido utilizadas de várias formas, desde diretamente como alimentos (uvas de mesa), para a produção de sucos e vinhos (uvas para vinho), ou como uvas secas para maior durabilidade (uvas passas) (KANDYLIS, 2021). As uvas utilizadas na produção de vinho ou suco são principalmente de espécies européias (*Vitis vinifera*) e americanas (*Vitis labrusca*). As variedades de uvas tintas (*Vitis labrusca l.*) são amplamente cultivadas nas Américas do Norte e do Sul e, no Brasil, representam mais de 80% das uvas processadas, destinadas principalmente à produção de suco de uva. As uvas *V. labrusca l.* mais comumente cultivadas são Bordo, Isabel, Concord e Niagara, que representam cerca de 50% da produção total de uvas (NIXDORF E HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; TOALDO ET AL., 2013).

O suco de uva é uma bebida não fermentada, com cor, aroma e sabor característicos, e é submetido a tratamento que garante sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Os compostos fenólicos presentes no suco de uva associados a benefícios à saúde são principalmente os flavonoides, flavonoides e antocianinas, que fazem parte da família dos flavonoides; e compostos não flavonóides, como ácidos fenólicos e resveratrol estilbeno (BARBALHO SM, 2020). Esses compostos estão associados à modulação de parâmetros fisiológicos importantes, como proteção antioxidante, inibição da função plaquetária e redução de biomarcadores (RIBEIRO; SILVA; CAMPANHOLO; RIBEIRO; RIBEIRO; FORONES, 2018).

O vinho, uma das bebidas alcoólicas mais antigas, é criado durante um processo de fermentação do mosto de uva. Os principais constituintes do vinho são água, etanol (geralmente entre 9-15%), carboidratos, ácidos orgânicos (ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico etc.), bem como polifenóis e compostos voláteis (GUTIERREZ-ESCOBAR; ALIANO-GONZALEZ; CANTOS-VILLAR, 2021). O uso medicinal do vinho estava relacionado a práticas religiosas. Na Mesopotâmia e no Egito era usado para tratar a tosse, fraqueza e aumentar o apetite. Até Hipócrates acreditava que o vinho era uma parte nutritiva

de uma dieta saudável. Mais recentemente, muito se tem discutido sobre o paradoxo francês que infere que o consumo leve a moderado de quantidades regulares de vinho tinto, apesar do consumo de uma dieta rica em gordura saturada pode estar relacionada a efeitos cardioprotetores (BARBALHO SM. 2020). A composição fenólica (tanto concentração como composição) muda principalmente nas primeiras etapas da vinificação e continua durante o armazenamento. Nesse sentido, é importante observar que a composição fenólica do vinho final difere da composição das uvas correspondentes como consequência da produção de novos derivados, como tirosol, flavenos e ácidos fenólicos livres. (KENNEDY; MATHEWS; WATERHOUSE, 2002). O conteúdo total de compostos fenólicos nas uvas é afetado por vários fatores: cultivo, origem geográfica, ano de produção, química do solo, grau de maturação, bem como radiação solar e temperatura. Por todas estas razões, a estimativa do teor de polifenóis no vinho é bastante desafiadora e, conseqüentemente, representa um grande obstáculo na criação de um “consumo moderado padronizado” de vinho (VRDOLJAK; KUMRIC; TICINOVIC KURIR; MALES; MARTINOVIC; VILOVIC; BOZIC, 2021). Não obstante, uvas, vinhos e subprodutos da uva contêm grandes quantidades de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, em altas concentrações de 1000 a 1800 mg/L (LÓPEZ-VÉLEZ; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; DEL VALLE-RIBES, 2003).

Os compostos fenólicos, por sua vez, constituem um dos mais importantes parâmetros de qualidade dos vinhos, pois contribuem para suas características organolépticas (cor, adstringência e sabor), assim como são considerados importantes compostos bioativos (atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante) (MAZZA; MINIATI, 1993; SIGLETARY et al., 2003).

Há dois grupos distintos de compostos fenólicos presentes no vinho: não-flavonóides e flavonóides. Os principais compostos fenólicos do vinho (1) não flavonoides incluem três grupos principais: estilbenos (resveratrol), ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos mais abundantes são representados pelos ácidos gálico, elágico, para-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siringico. Os ácidos hidroxicinâmicos

primários são os ácidos coumarico, catártico e fertárico; (2) flavonóides, que compreendem uma grande variedade de compostos como flavonas (luteolina), flavan-3-óis (catequina e epicatequina), flavonóis (miricetina, quercetina, kaempferol e rutina) e (3) antocianinas (malvidina, cianeto, peonidina, delphinidina, pelargonidina e petunidina) (CASTALDO ET AL. 2019).

### 1.3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS NÃO-FLAVONÓIDES

Um dos compostos mais amplamente estudados na literatura dos polifenóis presentes na uva e nos seus derivados é o resveratrol (RESV). O RESV é absorvido por difusão passiva ou transporte mediado por carreadores através da membrana apical do enterócito e, em seguida, rápida e extensivamente metabolizado em glicuronídeos ou sulfatos de resveratrol (LANCON; DELMAS; OSMAN; THENOT; JANNIN; LATRUFFE, 2004). Enquanto isso, uma porção significativa (cerca de 90%) do RESV ingerido atinge o cólon em sua forma intacta e é subsequente submetido à fermentação intestinal. Uma vez absorvidos pela veia porta, os metabólitos polifenólicos produzidos entram no fígado, onde são posteriormente metilados, glucuronizados ou sulfatados. Então, os metabólitos penetrarão na circulação sistêmica e atingirão os tecidos e células-alvo onde a significância fisiológica pode ser demonstrada. RESV e metabólitos não utilizados podem ser reciclados de volta ao intestino delgado através da bile ou excretados pela urina (GOWDA; KARIMA; REZAUL; SHISHIRA; XIE; CHEN, 2019).

O resveratrol, que também pode ser isolado de amoras e amendoins, tem propriedades anti-CCR potencialmente notáveis envolvendo múltiplas vias de sinalização, como Wnt, NF-κB, MAPK, EROs e caspases, entre outras (VERNOUSFADERANI; AKHTARI; REZAEI; REZAEI; SHIRANIRAD; MASHHADI; HASHEMI; KHANKANDI; BEHZAD, 2021). Nos últimos anos, um número crescente de estudos revelou que o RESV pode regular a migração e invasão de células tumorais através da modulação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em vários tipos de câncer, como carcinoma oral de células escamosas, glioma e câncer de pâncreas (YUAN; ZHOU; HUANG; et al., 2022). Na progressão maligna dos tumores, a EMT é conhecida por causar perda de adesão mútua entre as células tumorais e, portanto, levar ao aumento da

capacidade de invasão e movimento (AIELLO et al., 2018). A serina/treonina quinase (AKT) está intimamente relacionada à ocorrência de EMT e está envolvida em muitos processos biológicos e patológicos, como angiogênese, invasão e metástase. Além disso, a via glicogênio sintase quinase (GSK)-3 $\beta$  é a via clássica a jusante da AKT e frequentemente participa do desenvolvimento da EMT com AKT (DOU Y, et al., 2018). Em um trabalho recente YUAN L, et al. conseguiram demonstrar que o RESV pode inibir a invasão e metástase de células de câncer de cólon por meio da reversão de EMT através da via de sinalização AKT/GSK-3 $\beta$ /Snail e que AKT pode ser um regulador-chave da EMT em células de câncer de cólon, podendo servir como um potencial alvo terapêutico para esta doença (YUAN; ZHOU; HUANG; et al., 2022). Vários estudos demonstraram a capacidade do resveratrol de induzir apoptose e inibir a progressão do ciclo celular de células de câncer de cólon (PATEL; MISRA; PATEL; MAJUMDAR, 2010).

Nosso grupo realizou um trabalho no qual avaliamos a ação antineoplásica do resveratrol RESV isolado e associado ao etanol na carcinogênese induzida por MNNG. Nossos achados demonstraram que o resveratrol apresentou ação antineoplásica e quimiopreventiva na fase de promoção da carcinogênese no cólon de ratos. Ademais, o RESV apresentou um efeito pró-apoptótico nas criptas displásicas aumentando a expressão de caspase-3. Por outro lado, um achado interessante desse trabalho foi que o etanol conseguiu mitigar o efeito antineoplásico do resveratrol, sugerindo não haver uma associação benéfica entre resveratrol e etanol no nosso trabalho. (CESAR; MINTO; GARCIA, 2022).

Além dos estudos in vitro e em fase pré-clínica a literatura também explorou o benefício dos compostos bioativos da uva em ensaios clínicos randomizados. Em um desses ensaios, investigou-se o efeito da administração oral de RESV antes da cirurgia em pacientes com CCR. Os resultados mostraram uma diminuição adicional nos níveis de Ki-67 em tecidos tumorais após a administração de RESV, indicando a supressão da proliferação de células cancerígenas (PATEL et al. 2010). Outro estudo revelou que o RESV micronizado induziu a expressão de várias proteínas pró-apoptóticas, como a caspase-3 clivada, em tecidos malignos do fígado de pacientes com metástases

hepáticas de CCR (HOWELLS et al. 2011). O trabalho também confirmou a segurança e tolerabilidade do resveratrol.

Além da classe dos estilbeno representada pelo RESV, outros compostos tão relevantes quanto o RESV e com potencial ação antineoplásica são os ácidos fenólicos (AFs). Os AFs são metabólitos amplamente encontrados em plantas, vitais para a propagação e crescimento da planta, e também formados contra patógenos, exercendo um papel defensivo. Eles têm sido relatados para uma ampla gama de potencial terapêutico contra câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, envelhecimento, distúrbios inflamatórios e doenças cardíacas coronárias por meio de seu potencial antioxidante (ISLAM et al., 2021).

### 1.3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS FLAVONÓIDES

A quercetina, um composto flavonol da família dos flavonoides presentes tanto no suco de uva quanto no vinho tinto, mostrou efeitos anti-CCR através da regulação de diferentes mecanismos moleculares. Diversos estudos demonstraram que a regulação negativa da via Wnt/ $\beta$ -catenina e genes relacionados (ciclina D1 e survivina) foi envolvida em episódios apoptóticos induzidos por quercetina em células de câncer de cólon. Outras vias, como PI3K/AKT/mTOR, JNK/JUN e NF- $\kappa$ B, também poderiam ser reguladas pela quercetina, exercendo assim um efeito inibitório contra as células CCR (ZHANG; LIU; YAN et al. 2022). No vinho tinto, a quercetina representa o principal flavonol, e sua concentração é aproximadamente 50mg/L. Os efeitos benéficos dos flavonóis dietéticos têm sido relacionados ao seu efeito antioxidante, à ativação de mecanismos antioxidantes endógenos e à regulação positiva da expressão da sintase do óxido nítrico (NOS). Além disso, a quercetina demonstrou neutralizar e diminuir a inflamação; inibir a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e reduzir a expressão dos receptores Toll-like (TLR2 e TLR4) (MINZER; ESTRUCH; CASAS, 2020). Outro flavonoide presente nos compostos de uva é a luteolina. No trabalho de Shi RX e colaboradores ficou demonstrado que a luteolina sensibiliza o fator de necrose tumoral (TNF-alfa), induzindo assim a apoptose em células de CCR por meio da supressão de NF- $\kappa$ B e seus genes-alvo (SHI; ONG; SHEN, 2004). Ademais, em outro estudo pesquisadores

descobriram que a parada do ciclo celular e a apoptose foram promovidas pela luteolina em células de CCR, sendo regulada por meio da enzima glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  e ciclina D1 através da via Wnt/ $\beta$ -catenina (PANDURANGAN; DHARMALINGAM; SADAGOPAN; RAMAR; MUNUSAMY; GANAPASAM, 2013).

As antocianinas existem abundantemente em vários vegetais, frutas e vinhos e são componentes-chave da família dos flavonoides. Uma meta-análise recentemente publicada de 7 estudos observacionais mostrou que a administração de antocianina contribui para um menor risco de gênese do CCR (WANG; YANG; YANG; ZHAO; CAI; SHI, 2019). As antocianinas extraídas de uvas podem aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como caspase-3, -8 e -9, enquanto diminuem a de proteínas anti-apoptóticas, levando à morte celular em células HCT-116. Esses polifenóis ainda modulam as proteínas das junções célula-célula (*tight junctions*), importante para manter a adesão célula-célula, e diminuem a expressão de metaloproteinases (MMP) mitigando a migração celular. Essas atividades pró-apoptóticas e anti-migração exercidas pelas antocianinas da uva são devidas à regulação positiva de p38-MAPK e à regulação negativa de Akt (SHIN, 2009; SHIN, 2011). Um estudo de Anwar et al. demonstrou que um extrato rico em antocianina da uva baga foi capaz de diminuir a viabilidade das células CCR suprimindo o inibidor 1 da quinase dependente de ciclina (p21Waf/Cif1), ativando a caspase-3 e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANWAR; FRATANTONIO; FERRARI; SAIJA; CIMINO; SPECIALE, 2016).

### 1.3.3 CONSUMO BRASILEIRO DE DERIVADOS DE UVA

Os últimos dados disponíveis pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (em inglês, OIV) citam que em 2013 a produção mundial de sucos de uva foi estimada em cerca de 11–12 milhões de hectolitros e os principais países produtores e consumidores foram Estados Unidos da América, Brasil e Espanha (OIV, 2013). Ainda, dados mais recentes mostram que produção mundial em 2022 superou a marca dos 15 milhões de hectolitros de suco de uva (STATISTA,

2022). O consumo de vinho no Brasil foi projetado para atingir aproximadamente 301,3 milhões de litros em 2021. Até 2024, estima-se que o número chegará a cerca de 394 milhões de litros. Contudo, a partir do ano de 2020 o Brasil deixou de figurar entre os 5 maiores consumidores de suco de uva do mundo. Muito embora, a nossa produção local tenha ultrapassado a marca dos 130 milhões de litros de suco de uva nesse ano, representando um aumento de 152% em comparação ao ano anterior 2019 (Uvibra/Consevitis-RS, 2023). Por outro lado, a produção mundial de vinho, excluindo sucos e mostos, em 2021 foi estimada em 260 milhões de hectolitros. Enquanto seu consumo foi de cerca 236 milhões de hectolitros, sendo o Brasil o responsável pelo consumo de 4,1 milhões de hectolitros nesse mesmo ano, alcançado o segundo lugar no mercado de vinhos na América do Sul, ficando atrás apenas da Argentina (OIV, 2022). Os dados anteriormente mencionados mostram que há um crescente aumento no consumo de vinho tinto e suco de uva pela nossa população. Tal fato demonstra que o estudo das propriedades e ações desses compostos estão longe de perder sua relevância no mundo acadêmico, pelo contrário, torna-se premente investigarmos como esses compostos influenciam em nossa saúde e, em particular, no CCR.

#### 1.4 ÁLCOOL E CÂNCER COLORRETAL

O câncer é uma das doenças mais significativas associadas ao consumo crônico de álcool, e o consumo crônico é um forte fator de risco para câncer, particularmente do trato aerodigestivo superior, fígado, colorretal e mama. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento do câncer induzido pelo álcool, incluindo as ações do acetaldeído, o primeiro e principal metabólito do etanol, e o estresse oxidativo. No entanto, evidências crescentes sugerem que padrões aberrantes de metilação do DNA, um importante mecanismo epigenético de controle transcricional, também podem fazer parte dos mecanismos patogênicos que levam ao desenvolvimento de câncer induzido pelo álcool (VARELA-REY; WOODHOO; MARTINEZ-CHANTAR; MATO; LU, 2013).



Aproximadamente 4% dos cânceres em todo o mundo são causados pelo consumo de álcool, o que equivale a mais de 740.000 casos de câncer globalmente em 2020. Beber álcool, mesmo em níveis mais baixos de ingestão, pode aumentar o risco de câncer e estimamos anteriormente que mais de 100.000 casos de câncer em 2020 foram causados por consumo leve e moderado do equivalente a cerca de uma ou duas bebidas alcoólicas por dia. Trabalhos anteriores relataram que o maior consumo de álcool foi positivamente associado ao aumento do risco de câncer colorretal. Anton-Culver e colaboradores ao examinarem a associação entre o consumo de cerveja, licor e vinho e a sobrevivência global entre pacientes com câncer colorretal, os autores encontraram 50% menos mortalidade por todas as causas em pessoas com consumo regular de vinho do que naquelas com consumo pouco frequente de vinho (ZELL; MCELIGOT; ZIOGAS; HOLCOMBE; ANTON-CULVER, 2007).

O impacto do consumo de álcool na carga de câncer difere por tipo de câncer, e os cânceres de esôfago, fígado e mama representam os casos de câncer mais atribuíveis ao álcool em todo o mundo (RUMGAY et al., 2021). Apesar disso, há pouca conscientização pública sobre onexo causal entre álcool e câncer e o uso de álcool está crescendo em várias regiões do mundo.

A meta-análise conduzida pela WCRF encontrou um aumento de 7% no risco de câncer colorretal (RR 1,07 (95% CI 1,05–1,08)) por 10 g de álcool por dia. O WCRF também encontrou alguma evidência de um efeito de limiar em torno de 20 g por dia com uma associação mais fraca em níveis de ingestão mais baixos (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018). A meta-análise de Bagnardi e colegas não encontrou efeito do álcool no risco de câncer colorretal entre bebedores leves, mas o RR aumentou para 1,17 (95% CI 1,11–1,24) para o consumo moderado e 1,44 (95% CI 1,25–1,65) para beber pesado (BAGNARDI et al., 2015). As diferenças entre os locais foram mínimas, com o risco de câncer de cólon (RR 1,07 95% CI 1,05–1,09) semelhante ao câncer retal (RR 1,08 95% CI 1,07–1,10). O álcool também pode aumentar o risco de lesões pré-cancerosas no cólon, com uma meta-análise relatando um aumento de 27% no risco de adenoma colorretal (RR 1,27 (95% CI 1,17-1,37)) por 25 g de álcool por dia (RUMGAY et al, 2021).

Após evidências epidemiológicas da ligação entre o uso de álcool e o risco de câncer em vários locais, vários caminhos foram investigados para explicar os efeitos carcinogênicos do álcool. Vários mecanismos têm sido sugeridos para delinear o consumo de álcool e o desenvolvimento do câncer. Especula-se que mecanismos genéticos e epigenéticos estejam envolvidos na carcinogênese induzida pelo álcool. Uma compreensão dos mecanismos pelos quais o etanol induz a transformação neoplásica é importante para o desenvolvimento de estratégias apropriadas no tratamento de cânceres associados ao álcool. O consumo crônico de etanol pode iniciar ou promover a carcinogênese por meio de múltiplos mecanismos. O etanol em si não é cancerígeno, mas os dados disponíveis sugerem que o acetaldeído e as EROs têm efeitos genotóxicos ou promotores de tumores. Assim, a coadministração de etanol e cianamida, um potente inibidor da acetaldeído desidrogenase, aumentou a incidência de tumores em ratos tratados com acetoximetilmetilnutrisamina, dando suporte adicional à noção de que o acetaldeído poderia estar envolvido na carcinogênese associada ao etanol. Outros mecanismos carcinogênicos incluem déficits nutricionais, alterações na metilação do DNA e vigilância imunológica prejudicada (NA; LEE, 2017).

#### 1.4.1 PROMOÇÃO TUMORAL ASSOCIADA À INFLAMAÇÃO

O câncer de cólon é uma das malignidades mais bem definidas em que a inflamação desempenha um papel na carcinogênese em vários estágios. A alimentação crônica com etanol promove a tumorigênese colônica induzida por Azoximetano + dextran sulfato de sódio (AOM-DSS), potencialmente aumentando a inflamação na mucosa colônica de camundongos. Shukla e colaboradores demonstraram que o etanol causa reação inflamatória sustentada na mucosa e submucosa do cólon, conforme evidenciado pela infiltração de células mono e algumas polimorfonucleares, levando à formação de agregados linfóides, ruptura da integridade da mucosa e ocorrência de alguns pontos erosivos na superfície epitelial (SHUKLA; CHAUDHRY; MIR; GANGWAR; YADAV; MANDA; MEENA; RAO, 2016). A mieloperoxidase e o receptor-1 de granulócitos são marcadores de neutrófilos. Eles também demonstraram que as células que expressavam esses marcadores foram detectadas na mucosa

colônica de camundongos AOM-DSS alimentados com etanol, mas não em camundongos AOM-DSS (SHUKLA; CHAUDHRY; MIR; GANGWAR; YADAV; MANDA; MEENA; RAO, 2016). Além disso, a administração de etanol aumentou significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL5/RANTES, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10) na mucosa colônica em estágio pré-canceroso. A alimentação crônica com etanol aumentou significativamente o número e o tamanho dos pólipos no cólon de camundongos tratados com AMO e DSS, possivelmente aumentando a inflamação. Além das alterações na permeabilidade intestinal, o etanol provoca um efeito sinérgico com o microbioma intestinal na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-6 (NA; LEE, 2017).

O NF- $\kappa$ B desempenha um papel crítico no desenvolvimento do câncer de cólon associado à inflamação. Após a administração de etanol a ratos, a quantidade de seu inibidor, I $\kappa$ B no citoplasma diminuiu no cólon, mas a localização de p65, a subunidade funcionalmente ativa de NF- $\kappa$ B no núcleo, aumentou. Como consequência, a expressão de iNOS e o conteúdo de seu produto óxido nítrico foram elevados, levando à inibição da contração colônica em ratos. O tratamento com etanol aumentou a produção de interferon  $\gamma$  e IL-4 nas células do linfonodo cecal. Além disso, o etanol aumentou a expressão de COX-2 induzida por arsênico por meio da geração de EROs e ativação de NF- $\kappa$ B.

#### 1.4.2 PRODUÇÃO DE ACETALDEÍDO

Uma vez consumido, o álcool é metabolizado por enzimas, incluindo álcool desidrogenase (ADH), citocromo P-450 2E1 (CYP2E1) e catalase bacteriana, produzindo acetaldeído. O acetaldeído é altamente reativo em relação ao DNA e possui várias propriedades carcinogênicas e genotóxicas. Como é altamente reativo em relação ao DNA, o acetaldeído pode se ligar ao DNA para formar adutos de DNA que alteram sua forma física e potencialmente bloqueiam a síntese e o reparo do DNA. Esses adutos de DNA são particularmente genotóxicos, pois podem induzir mutações pontuais no DNA, quebras de fita dupla, trocas de cromátides-irmãs e mudanças estruturais para cromosomas (RUMGAY et al 2021). Os adutos de DNA em questão incluem N2-

etilideno-2'-desoxiguanosina, N2-etil-2'-desoxiguanosina, N2-propano-2'-desoxiguanosina (PdG) e N2-eteno-2'-desoxiguanosina (WANG; MCINTEE; CHENG; SHI; VILLALTA; HECHT, 2000). O aduto PdG pode formar estruturas adicionais altamente genotóxica tais como ligações cruzadas de DNA-proteína e ligações cruzadas entre fitas de DNA que podem conferir carcinogênese. Assim como as ligações cruzadas DNA-proteína, o acetaldeído também pode se ligar a proteínas que causam diretamente alterações estruturais e funcionais. Essas proteínas incluem glutatona, proteína envolvida na redução do estresse oxidativo causado pelo álcool, e enzimas que contribuem para o reparo e metilação do DNA, entre outras (BROOKS; THERUVATHU, 2005). Tanto o acetaldeído quanto o etanol podem afetar a metilação do DNA, o que pode levar a alterações na expressão de oncogenes e genes supressores de tumor. Além disso, o acetaldeído pode inibir a atividade da DNA metiltransferase (DNMT), que é essencial para a metilação normal do DNA (SEITZ; STICKEL, 2005).

#### 1.4.3 ALTERAÇÃO NA PERMEABILIDADE DO COLON

Alterações na permeabilidade intestinal são consideradas cruciais no CCR em estágio inicial. Purohit et al apontaram que o álcool realmente prejudica a permeabilidade intestinal. A resposta inflamatória é sempre acompanhada com a tumorigênese do CCR. Os microrganismos intestinais são as principais causas indutoras de resposta inflamatória. Em circunstâncias normais, a permeabilidade intestinal funciona isolando bactérias intestinais e toxinas de células epiteliais devido as camadas de muco e tight junction. Acredita-se que o dano à permeabilidade intestinal seja o passo inicial do CCR (SCHERNHAMMER; GIOVANNUCCI; BABA; FUCHS; OGINO, 2011; PUROHIT et al., 2008.)

Diao e colaboradores demonstraram em um estudo retrospectivo com 158 pacientes com diagnóstico de CCR, o prognóstico desses pacientes foi marcadamente influenciado pelo consumo de álcool. Os autores demonstraram que o consumo de álcool levou ao aumento da permeabilidade intestinal, tornando mais fácil para as bactérias invadirem as células epiteliais. Posteriormente, em um estudo desenvolvido com CCR em ratos e alimentados com dieta com etanol ou sem etanol, o número de tecidos que desenvolveram CCR em camundongos alimentados com dieta com etanol foi maior do que os

dos controles, sugerindo um envolvimento potencial do consumo de álcool no CCR em estágio inicial (DIAO et al, 2020). Notavelmente, as *tight junctions* analisadas nesse estudo estavam marcadamente danificadas nos roedores que consumiram álcool, bem como a camada mucosa intestinal, o que agravou ainda mais a resposta inflamatória em células epiteliais do colon (DIAO et al., 2020).

## 1.5 MICROAMBIENTE TUMORAL E INFLAMAÇÃO NO CCR

O CCR pode ser dividido em duas classes: 1) esporádico, onde não há (ou há muito pouco) histórico familiar de CCR, e 2) familiar ou hereditário, no qual mutações genéticas herdadas predisõem um indivíduo a desenvolver CCR. Acredita-se que cerca de 10% a 20% de todos os pacientes com CCR possuam um histórico familiar positivo (DEKKER et al., 2019). Enquanto a maioria dos casos de CCR ocorre de maneira esporádica, o CCR familiar envolve várias condições hereditárias que predisõem um indivíduo ao desenvolvimento deste câncer. As duas principais síndromes hereditárias do CCR são o CCR hereditário sem polipose (HNPCC) e a polipose adenomatosa familiar (PAF). HNPCC, ou síndrome de Lynch, é a síndrome CCR hereditária mais comum. Pacientes com HNPCC têm 80% de chance de desenvolver CCR (BOGAERT; PRENEN, 2014).

A maioria dos tumores de cólon se desenvolve por meio de um processo de várias etapas envolvendo uma série de alterações histológicas, morfológicas e genéticas que se acumulam com o tempo (SIMON, 2016). A progressão de células pré-cancerosas em um fenótipo invasivo pode durar mais de uma década (HALF; ARBER, 2013). Nesse sentido, a carcinogênese colônica é caracterizada pelo acúmulo progressivo de distúrbios genéticos e epigenéticos. Esses eventos moleculares são acompanhados por alterações histológicas que progridem de leves anormalidades arquiteturais crípticas em pequenos adenomas a eventuais cânceres invasivos (KHARE; CHAUDHARY; BISSONNETTE; CARROLL, 2009).

Diferentes estudos se propuseram a modelar o processo de tumorigênese e descrever a ordem dos eventos que ocorrem ao longo desse processo. No início da década de 1990, Vogelstein e seu grupo usaram o CCR como um sistema modelo para estudar a sequência de alterações genéticas que ocorrem

durante o desenvolvimento do câncer. Eles analisaram os diferentes estágios do CCR, começando com epitélio saudável, progredindo para adenoma precoce, adenoma intermediário e adenoma tardio, e eventualmente carcinoma e metástase. Essa análise os levou a sugerir um modelo de progressão em várias etapas. Fearon e Vogelstein descreveram a tumorigênese do cólon como um processo de várias etapas no qual o acúmulo de múltiplas mutações genéticas é necessário para o início, promoção e progressão do câncer (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). Este modelo argumenta que a carcinogênese do CCR tem uma natureza clonal e que o p53 é geralmente inativado na transição do adenoma tardio para o carcinoma, e não em um estágio anterior (RIVLIN; BROSH; OREN; ROTTER, 2011). Contudo, apesar de ser possível determinar uma sequência para as alterações genéticas na carcinogênese colorretal, o acúmulo progressivo dessas alterações é a característica mais consistente da progressão clínica e experimental das neoplasias colorretais (VOGELSTEIN; FEARON, 1990). Mesmo assim, as mutações p53 são vistas em aproximadamente 60% dos tumores colorretais e podem levar a uma transição de adenoma para carcinoma CCR (RIVLIN; BROSH; OREN; ROTTER, 2011).

Os processos de iniciação, promoção e progressão do CCR foram melhor compreendidos devido as características do epitélio intestinal. A mucosa colorretal consiste em um grande número de invaginações chamadas de criptas de Lieberkühn. Essas criptas são compostas por uma variedade de células. No fundo das criptas, existem células-tronco colônicas de ciclo rápido que residem na base dessas criptas, formando algo conhecido na literatura como “nicho de células-tronco” e são sustentadas por miofibroblastos pericriptais que produzem fatores de sinalização que mantêm a haste do cólon (LI; MA; CHAKRAVARTI; SHALAPOUR; DEPINHO, 2021). As células-tronco colônicas geram células precursoras que se diferenciam em células com funções fisiológicas especializadas: enterócitos para absorção de nutrientes, células caliciformes para produção de muco e células enteroendócrinas para produção de hormônios (VERMEULEN; SNIPPERT, 2014). Algumas características das células-tronco colônicas são compartilhadas pelas células-tronco cancerígenas do CCR (DALERBA, 2011; LI et al., 2017; LI; MA; CHAKRAVARTI; SHALAPOUR; DEPINHO, 2021).

A progressão do CCR ocorre em estágios que variam de lesões de cripta única (por exemplo, focos de cripta aberrantes) a pólipos adenomatosos e carcinomas malignos. Acredita-se que a progressão desses estágios requer mutações em múltiplos oncogenes e genes supressores de tumor. Uma etapa molecular chave na tumorigênese colorretal é a perda da estabilidade genômica. A instabilidade genômica é a marca registrada do CCR e cria um ambiente adequado para alterações nos genes supressores de tumor e oncogenes. A identificação de agentes anti-inflamatórios que suprimam e/ou previnam as consequências das mutações genéticas que dão origem ao CCR é, portanto, de importância crítica. (VAN DE WETERING et al., 2002; FAJARDO; PIAZZA, 2015). O conceito de que o CCR pode se originar de células-tronco CCR surge da longevidade e autorrenovação das células-tronco, permitindo o acúmulo e a propagação de mutações oncogênicas (ZEKI et al., 2011).

Hoje entende-se que o processo de carcinogênese é multifatorial, complexo e que está relacionado a mecanismos que incluem instabilidade cromossômica (CIN), fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) e instabilidade de microssatélites (MSI) (DE ASSIS; COUTINHO; OYEYEMI; OYEYEMI; GRENFELL, 2022).

Na última década, o microambiente tumoral (MAT) ou estroma tumoral tornou-se relevante no estudo da carcinogênese do CCR. Evidências acumuladas indicam que vias não autônomas celulares, especialmente vias de sinalização do microambiente tumoral, estão significativamente envolvidas na progressão e metástase do CCR, seja promovendo ou inibindo esse processo (LI; CHEN; SHEN, 2022). O MAT refere-se a um ambiente biológico especial formado por células malignas, células não malignas e composto pela matriz extracelular (MEC), uma grande variedade de células estromais modificadas e vasculatura aberrante, as quais têm funções distintas, mas também colaboram entre si durante a progressão e metástase do câncer (WHITESIDE, 2008; YUAN; TAO; ZHANG X; ZHANG Y; SUN; WU, 2020; SHEN; KANG, 2018). As comunicações intercelulares entre as células tumorais e o MAT são estabelecidas principalmente por meio da sinalização parácrina. Essas comunicações e fatores são extrínsecos e podem afetar diretamente a

progressão do CCR pela via Wnt/ $\beta$ -catenina. Dessa forma, surge uma ampla gama de novos alvos terapêuticos, ampliando as possibilidades de obtenção de tratamentos eficazes para o CCR (NOVOA DÍAZ; MARTÍN; GENTILI, 2022).

Durante a gênese do CCR, o MAT e sua sinalização associada desempenham um papel fundamental no destino do tumor, uma vez que facilitam os processos de proliferação, invasão, metástase e quimiorresistência. Por exemplo, durante o estágio avançado de desenvolvimento do CCR, as células tumorais metastatizam para órgãos distantes. Essas células tumorais, juntamente com as células estromais, criam um microambiente para promover ou restringir o crescimento dos tumores metastáticos (LI; CHEN; SHEN, 2022).

Um dos eventos mais estudados e que podem gerar o microambiente tumoral favorável à carcinogênese do CCR é a inflamação. Esta, em si, é o fator chave que promove a progressão do CCR. Entre os pacientes com distúrbios inflamatórios, 10%-15% têm maior probabilidade de desenvolver CCR em comparação com pessoas normais (CHOI; BAKIR; HART et al., 2017). A desregulação do microbioma intestinal pode piorar o ambiente do trato intestinal e estimular as células epiteliais intestinais a ativar a via do fator nuclear *kappa-light-chain-enhancer* de células B ativadas (NF- $\kappa$ B) para conduzir a inflamação. Isso ocorre devido a superprodução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , como no CCR associado às doenças inflamatórias intestinais. Tal fenômeno pode desencadear cascatas de sinalização que constitutivamente regulam positivamente a sinalização inflamatória do (NF- $\kappa$ B) e do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) (MORAES; SUN; PELUZIO; ZHU, 2019). A ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B está intimamente associada à progressão do CCR, como proliferação celular, apoptose, angiogênese e metástase. Portanto, o NF- $\kappa$ B é geralmente considerado um alvo terapêutico (CAO; WANG; LU; QI; LI; DAI; LU, 2022).

NF- $\kappa$ B serve como um elo crítico entre a inflamação e o câncer por meio de sua capacidade de regular positivamente a expressão de citocinas promotoras de tumor, como IL6 e TNF $\alpha$ , e genes de sobrevivência, como BCL2L1 (BCLXL). Além do controle direto da proliferação/sobrevivência celular pelo NF- $\kappa$ B, a comunicação entre NF- $\kappa$ B e Wnt/ $\beta$ -catenina fornece outra base



intracelular importante para a tumorigênese induzida por inflamação. Uma vez que a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina demonstrou ser oncogênica em uma ampla gama de tipos de tumor, a regulação positiva de Wnt/ $\beta$ -catenina pela via NF- $\kappa$ B pode contribuir para o desenvolvimento do câncer (MA; HOTTIGER, 2016). Um exemplo convincente é a cooperação sinérgica entre NF- $\kappa$ B e  $\beta$ -catenina/TCF4 na expressão de um subconjunto de genes-alvo Wnt no CCR. (SCHWITALLA; FINGERLE; CAMMARERI; NEBELSIEK; GOKTUNA; ZIEGLER et al., 2013).

A hiperativação da sinalização Wnt induzida pela inativação mutacional da Polipose Adenomatosa Coli (APC) é responsável pela maioria dos casos de CCR em pacientes (FODDE, 2002). A proteína APC desempenha um papel regulatório chave na supressão da via oncogênica Wnt/ $\beta$ -catenina (SCHROR, 2011). Na PAF, mutações no gene APC por inserções, deleções ou mutações sem sentido resultam em uma proteína APC truncada. A proteína APC truncada está associada à perda de sítios de ligação de  $\beta$ -catenina, permitindo assim a ativação constitutiva da sinalização de  $\beta$ -catenina. Nos colonócitos, na ausência de sinalização Wnt, a  $\beta$ -catenina citoplasmática é normalmente degradada pelo complexo Axin. Este complexo consiste em APC, a proteína-esqueleto Axin, caseína quinase 1 (CK1) e glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). CK1 e GSK3 $\beta$  fosforilam a  $\beta$ -catenina, resultando na ubiquitinação e degradação proteossômica da  $\beta$ -catenina (FAJARDO; PIAZZA, 2015). Ademais, Ma e Hottiger também demonstraram que um microambiente com várias células inflamatórias é capaz de promover a carcinogênese, uma vez que a inflamação mediada por NF- $\kappa$ B demonstrou aumentar o potencial tumorigênico das células cancerígenas por meio da regulação positiva da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, fortalecendo a ideia de que o NF- $\kappa$ B pode ser um alvo terapêutico atraente para o câncer associado à inflamação. (MA; HOTTIGER, 2016).

A inflamação crônica no MAT é parte integrante do processo neoplásico; aumentando o crescimento do tumor, invasão, angiogênese e metástase. A inflamação no microambiente do tumor é uma característica do câncer e é reconhecida como uma característica chave dos carcinógenos. Carcinógenos humanos ambientais e químicos, incluindo aflatoxinas, amianto, nitrosaminas, álcool e tabaco, induzem inflamação promotora de tumor e podem interromper a resolução da inflamação, contribuindo para uma devastadora carga global de

câncer (FISHBEIN; HAMMOCK; SERHAN; PANIGRAHY, 2020). O álcool afeta a imunidade da mucosa intestinal através de vários mecanismos. Em particular, pode primeiro diminuir a resposta imune inata na mucosa, resultando em maior suscetibilidade a patógenos intestinais (ZHOU et al., 2013). Adicionalmente, como encontrado em estudos em culturas de células, o álcool pode desencadear uma resposta do sistema imunológico e regulação positiva de moléculas que promovem a resposta inflamatória, incluindo a liberação de células imunes inflamatórias, como leucócitos e mastócitos (FLEMING et al., 2001). O álcool afeta a imunidade da mucosa suprimindo uma das principais linhas de defesa do intestino contra bactérias, as células de Paneth que secretam compostos antibacterianos. As células de Paneth suprimidas secretam menos compostos antibacterianos, o que pode permitir o supercrescimento adicional de bactérias intestinais e permitir a entrada de seus subprodutos (isto é, endotoxinas) através da barreira intestinal (SCHNABL E BRENNER, 2014). e também, por meio da supressão de moléculas sinalizadoras e células T imunes e, assim, suprimindo a mucosa intestinal resposta imune e bacteriana depuração (Trevejo-Nunez et al. 2015).

Em contraponto, foi demonstrado que os polifenóis da uva diminuem a inflamação crônica, seja pela modulação das vias inflamatórias ou pela redução dos níveis de ERO's. Como compostos naturais, os flavonoides da uva e as proantocianidinas podem atingir vários caminhos para superar a inflamação crônica e, portanto, são mais eficazes em comparação com os anti-inflamatórios sintéticos monodirecionados (SUNG; PRASAD; GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2012). O extrato liofilizado de vinho da uva "Jacquez" (*Vitis aestivalis-cinerea* × *Vitis vinifera*), que contém principalmente flavonoides, antocianinas, proantocianidinas e derivados do ácido hidroxicinâmico, apresentou maior atividade anti-inflamatória quando comparado ao anti-inflamatório não esteroideal (AINE) indometacina (PANICO; CARDILE; AVONDO; GARUFI; GENTILE; PUGLIA; BONINA; SANTAGATI, 2006). Também foi demonstrado que as proantocianidinas nas sementes de uva têm alta ação anti-inflamatória, porque eliminam os radicais livres, previnem a peroxidação lipídica e inibem a formação de citocinas pró-inflamatórias. Os autores descobriram que o extrato de bagaço de uva vermelha suprime a ativação do fator de transcrição

inflamatório NF- $\kappa$ B e, portanto, pode ser usado como matéria-prima para extração de novos candidatos anti-inflamatórios ou como aditivo no processamento de alimentos funcionais (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014).

## 1.6 CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

A N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) é uma molécula usada como carcinógeno e mutagênico. O MNNG foi identificado como um possível carcinógeno humano listado como um carcinógeno do Grupo 2A da IARC (International Agency for Research on Cancer). Ele induz aberrações cromossômicas, trocas de cromátides-irmãs e quebras na fita de DNA. Desde sua introdução em estudos anteriores o MNNG tem sido um excelente modelo para a indução de câncer colorretal (BADR EL-DIN NK, ABDEL FATTAH SM, PAN D, TOLENTINO L, GHONEUM M. 2016).

O carcinógeno MNNG, utilizado em depósitos intrarretais para indução de lesões pré-neoplásicas de FCA, diferente de outros carcinógenos de ação indireta como o DMH, não é metabolizado pelos microsomas hepáticos para sua ativação e, portanto, não compete com etanol no metabolismo hepático. Entretanto, o MNNG é um agente alquilante que preferencialmente promove a metilação da posição O6 no DNA da desoxiguanidina e estudos epidemiológicos indicam sua importância no câncer humano (CARDOSO JFR et al., 2011). Neste trabalho nós utilizamos o MNNG para induzir lesões pré-neoplásicas. Além do que dito anteriormente, sua escolha se deu devido sua ação tópica diretamente na mucosa intestinal para a promoção da carcinogênese, tornando-o mais prático e seguro. (NARISAWA; MAGADIA; WEISBURGER; WYNDER, 1974). Assim, este é um bom modelo experimental para a carcinogênese química do cólon.

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A literatura traz resultados inconsistentes no que diz respeito à correlação entre o consumo de vinho tinto e seu potencial papel protetor contra o desenvolvimento de câncer colorretal (CCR). Alguns estudos forneceram evidências de que o vinho apresenta propriedades benéficas que independem da presença de álcool, e que deveriam ser atribuídas ao seu conteúdo polifenólico (RUF, 2003; ESTRUCH; LAMUELA-RAVENTOS, 2010). Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram que uma determinada quantidade de álcool presente no vinho tinto é capaz de oferecer mais benefício do que a ausência dele. Tal fato nos fez levantar o seguinte questionamento: realmente o vinho tinto é capaz de promover a quimioprevenção contra a carcinogênese envolvida no CCR ou outro composto derivado da uva - rico nos mesmos compostos fenólicos – apresentaria maior potencial protetivo contra a carcinogênese do CCR?

Esse questionamento levou em consideração o fato de que o álcool é capaz de induzir o processo inflamatório e que esse poderia contribuir para a iniciação da carcinogênese, uma vez que a inflamação está estritamente ligada ao CCR. Em contrapartida, sabe-se também que os derivados de uva possuem uma ação anti-inflamatória combatendo os radicais livres através de suas cadeias aromáticas. Dessa maneira, comparamos o vinho tinto, o suco de uva e uma solução alcóolica de suco de uva com o propósito de esclarecer quais composições derivadas da uva poderiam oferecer melhores resultados na quimioprevenção do CCR e qual papel o álcool poderia desempenhar na proteção ou na promoção da carcinogênese. Assim, através da análise de cada derivado da uva estudado nesse trabalho procuramos compreender quais mecanismos poderiam estar envolvidos na iniciação e na promoção da carcinogênese do CCR e, enfim, responder à pergunta sobre qual composto traria mais benefícios à saúde através de seu consumo.

### 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e compreender de que modo o consumo de suco de uva e vinho tinto podem influenciar na carcinogênese induzida por MNNG, em ratos *wistar*. Ademais, determinar quais mecanismos podem estar envolvidos no consumo desses agentes através da análise de estresse oxidativo, do estudo histopatológico do cólon e, também, por meio da avaliação da expressão de imunomarcadores relacionados à carcinogênese e inflamação.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO: Avaliar o efeito antioxidante dos diferentes compostos de uva e como isso pode impactar no desenvolvimento da carcinogênese nos animais experimentais. O estresse oxidativo será medido através da quantidade produzida de MDA e GSH no tecido colônico de ratos, por meio de espectrofotometria.

3.2.2 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COLÔNICO: Estudar como a presença de álcool pode afetar a arquitetura do tecido colônico dos animais experimentais através da formação e quantificação do número de Focos de Criptas Aberrantes e contagem de Corpúsculos Apoptóticos visualizadas em secções histológicas da parede colônica coradas pelo método de hematoxilina-eosina.

3.2.3 IMUNOMARCADORES DE CARCINOGENESE: Avaliar por meio de técnica de imunistoquímica como o tecido colônico se comporta frente ao insulto do carcinógeno e como os diferentes compostos de uva podem influenciar no desenvolvimento da carcinogênese. Para essa avaliação utilizou-se a marcação das criptas colônicas com os seguintes anticorpos primários: PCNA, CASP-3, Akt, Survivina e NFkB. Tais anticorpos permitiram avaliar os graus de proliferação celular, a apoptose, senescência, bem como a inflamação no tecido colônico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS



#### 4.1 ANIMAIS – CONSIDERAÇÃO GERAL

Todos os animais utilizados neste experimento (80) foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ( $22\pm 2$  °C), em caixas plásticas, com 55% de umidade e livre acesso de ração padrão Purina® para roedores e água de torneira filtrada, *ad libitum*. Foram mantidos no máximo 5 animais por caixa e todos os animais foram aclimatados por pelo menos 1 semana antes do início dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Protocolo 045/2019).

#### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação de 1 semana, os animais foram divididos em seus respectivos grupos, de acordo com o experimento em questão.

Para a realização do experimento foram utilizados 80 ratos machos da linhagem *Wistar*, subdivididos em 10 grupos com 8 animais em cada grupo, sendo: **C** – (controle) recebeu dieta sólida e líquida normal, sem adição do carcinógeno MNNG; **M** (controle com carcinógeno) recebeu dieta sólida e líquida normal, com adição do carcinógeno MNNG; **S** (suco de uva) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de suco de uva, sem adição de carcinógeno; **MS** (suco de uva + MNNG) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de suco de uva, com adição de carcinógeno; **SA** (suco de uva + álcool) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de solução de suco de uva com etanol, sem adição de carcinógeno; **MSA** (suco de uva + álcool + MNNG) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de solução de suco de uva com etanol, com adição de carcinógeno; **V** (vinho) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de vinho tinto, sem adição de carcinógeno. **VM** (vinho tinto + MNNG) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de vinho tinto, com adição de carcinógeno; **A** (álcool) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de

álcool, sem adição de carcinógeno; **MA** (álcool + MNNG) recebeu dieta sólida normal e líquida com adição de álcool e carcinógeno;

#### 4.2.1 DESENHO DO EXPERIMENTO

Figura 1.



### 4.3 PREPARO DO CARCINÓGENO QUÍMICO

O carcinógeno químico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) foi armazenado em geladeira a 4°C em frascos devidamente identificados. Foram preparadas pequenas quantidades da solução de MNNG (5mg/ml) por motivos de segurança e com os pesquisadores equipados adequadamente, utilizando aventais, máscaras, luvas e gorros. Após a manipulação da droga, os frascos utilizados foram imersos em solução saturada de permanganato de potássio que é uma solução neutralizante, e o restante do carcinógeno não utilizado foi encaminhado para incineração.

### 4.4 CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

A carcinogênese foi induzida nos ratos Wistar com 7 semanas (49 dias) de vida por meio de 4 depósitos intrarretais sucessivos (2 vezes/semana por 2 semanas – nos dias 49, 52, 56 e 59 dias de vida) de 0.5 ml da solução de MNNG (5 mg/ml) (60 mg/Kg; Sigma-Aldrich®, Louis, MO, USA). a 7 cm da margem anal utilizando-se uma agulha de ponta de lâmpada (bulb-tip needle), de acordo com o protocolo de Maurin et al. (2006). A soluções de MNNG foi preparada no momento da sua aplicação e diluídas em água destilada. Nos grupos controle houve a aplicação de água destilada em igual volume e repetições, utilizando-se o mesmo procedimento. O preparo das soluções, bem como a sua administração, foi realizado com equipamentos de proteção individual (aventais descartáveis, luvas, óculos de proteção e máscaras contra gases). Após a manipulação dos carcinógenos, os materiais de laboratório foram acondicionados em lixos hospitalares e encaminhados diretamente para incineração.

### 4.5 TRATAMENTO COM SUCO DE UVA, SOLUÇÃO DE SUCO DE UVA + ÁLCOOL E VINHO TINTO

Todos os cálculos das doses a serem administradas de vinho, etanol e suco com etanol foram feitas respeitando-se as recomendações preconizadas

pelo Código Europeu de Combate ao Câncer (BOYLE et al., 2003), que recomenda manter o consumo diário de álcool em 20 a 30 g de etanol/dia. Dentro dessa faixa, optou-se pela quantidade exata de 26,4g de etanol/dia, que corresponde à concentração de 0,377g de etanol/kg de peso vivo. Essa quantidade equivale à presente em 2 drinques/dia, reconhecida na literatura como a dose que produz mais efeitos benéficos à saúde.

Como a concentração de etanol no vinho utilizado (14°GL) é de 14%, os cálculos feitos seguiram as seguintes etapas:

#### **Volume de vinho administrado**

26,4 g etanol/dia = 0,337g etanol/kg p.v.

Vinho = 14°GL = 14% etanol

Volume (ml) = p.v.(kg) X 0,337 / 0,14

Exemplificando os cálculos utilizando um animal no início (Ex 1) e no final do experimento (Ex 2):

**Ex1:** 275g p.v. (início do experimento)

Volume (ml) = 0,275 X 0,337 / 0,14

Volume (ml) = 0,092675 / 0,14

Volume (ml) = 0,66 ml de vinho

**Ex2:** 430g p.v. (final do experimento)

Volume (ml) = 0,43 X 0,337 / 0,14

Volume (ml) = 0,14491 / 0,14

Volume (ml) = 1,035 ml de vinho

O cálculo das doses de etanol, suco de uva, suco de uva com etanol e solução salina foram feitos utilizando a mesma fórmula da dosagem de vinho, para padronizar os volumes e evitar possíveis interferências quanto ao volume utilizado, como excesso de volume e estresse que prejudicassem o animal nas gavagens.

Para isso, foram preparadas soluções de etanol a 14% e soluções de suco de uva com etanol a 14% também, "padronizando-se" volumes e concentrações de etanol.

Portanto, as fórmulas utilizadas para os cálculos dessas dosagens foram as mesmas.

**Volume de solução de etanol (Sol 14%)**

(Idem fórmula utilizada para o vinho)

$$26,4 \text{ g etanol/dia} = 0,337 \text{ g etanol/kg p.v.}$$

$$\text{Volume (ml)} = \text{p.v. (kg)} \times 0,337 / 0,14$$

**Volume de suco de uva integral**

(Idem)

$$\text{Volume (ml)} = \text{p.v. (kg)} \times 0,337 / 0,14$$

**Volume de sol. de suco c/ etanol (14%)**

(Idem)

$$\text{Volume (ml)} = \text{p.v. (kg)} \times 0,337 / 0,14$$

**Volume de solução salina**

(Idem)

$$\text{Volume (ml)} = \text{p.v. (kg)} \times 0,337 / 0,14$$

Tanto o vinho quanto o suco de uva vieram da mesma vinícola, chamada Casa Valduga®, do município de Bento Gonçalves/RS.

A administração dos tratamentos foi feita por gavagem gástrica, uma vez ao dia, todos os dias, durante quatro semanas, sendo iniciada quatro dias após a última aplicação do carcinógeno (CARDOSO; COHEN; JORDÃO JR; VANNUCHI; GARCIA; ZUCOLOTTO, 2011).

## 4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao final do período experimental, 13 semanas (91 dias) de vida, 6 semanas após o início do trabalho, todos os ratos foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono. Tempo suficiente para o aparecimento de lesões

inflamatórias, como criptas, nos animais tratados com MNNG (CHE et al., 2010). Ao longo do experimento não houve morte de animais nem variação significativa do peso dos mesmos.

#### 4.7 COLETA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

O sangue e o plasma foram coletados logo após o sacrifício dos animais através de punção cardíaca. O material foi coletado em tubos BD Vacutainer SST II Advance® amarelo de 5,0 ml. Os tubos foram então centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos. Retirou-se uma alíquota com pipeta armazenando-a em tubos eppendorfs® e mantidos congelados em freezer a uma temperatura de -70°C.

O cólon e o fígado foram, em seguida, cuidadosamente isolados e retirados. Os fígados foram armazenados em frascos coletores previamente identificados para que fossem, posteriormente, utilizados na forma de homogenatos para análises bioquímicas. Os cólons, por sua vez, foram limpos com solução salina (NaCl 0,9%) e abertos longitudinalmente pela borda mesentérica, cuidadosamente estendidos em uma placa de vidro e armazenados em cassetes (Labor Import®) para posterior realização das análises histopatológicas e imunoistoquímicas ou armazenados em criotubos de 2 mL (Corning®), para análise de estresse oxidativo. Para a realização das futuras análises histopatológicas e imunoistoquímicas, cerca de 10 centímetros do cólon distal foram estendidos em placas de papel filtro com a mucosa voltada para cima protegida com papel de seda e submerso em formalina tamponada a 10% (Merck® - Darmstadt, Alemanha) por um período mínimo de 24 horas. Após este período, os tecidos foram retirados da formalina, recortados e processados.

Já recortadas, as peças foram desidratadas por submersão em alcoóis com concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) por um período total de aproximadamente 5 horas. Posteriormente, para diafanização do material, as mesmas foram submersas em banhos de xilol 100% (Merck® - Darmstadt, Alemanha) por aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Em seguida as amostras foram submersas em banhos de parafina líquida (Histosec® - Merck® - Darmstadt, Alemanha), em temperatura de 60°C por um período de 4 horas, para a realização dos cortes histológicos para confecção das lâminas. Através de um

micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras colônicas foram cortados a uma espessura de 4-5  $\mu\text{m}$ , aderidos às lâminas silanizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina.

Anteriormente à técnica de imunoistoquímica ou coloração por H.E., as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra-corada com solução de Eosina Floxina alcoólica por 10 segundos. Para posterior desidratação, a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de alcoóis e em seguida diafanizadas em xilol que é meio miscível de Entelan (Merck & Co. Inc, SA) utilizado para montagem das lâminas.

Finalmente, a recuperação antigênica do material foi realizada através de método físico-químico, por exposição do material à vaporização em solução-tampão de citrato, com o pH 6,0.

#### 4.8 ANÁLISE BIOQUÍMICA PARA AS DOSAGENS DE GSH E MDA

A análise da presença de GSH foi feita de acordo com a metodologia utilizada por Sedlak e Lindsay (1968). Amostras de 100 mg de tecido foram adicionadas a tubos de ensaio de 10 ml, contendo 2 ml de EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) 0,02 M, colocados no gelo. A solução foi homogeneizada com um homogeneizador de tecidos portátil Marconi® (Piracicaba, Brasil), modelo MA-102 (Mini), 125W, adicionando-se mais 2 ml de EDTA 0,02M. Desse homogenato, 2,5 ml foram retirados e transferidos para um outro tubo de ensaio de 10 ml, adicionando-se 2 ml de água milli Q e 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) ao tubo. Este permaneceu 15 minutos em repouso, foi agitado na metade do tempo de espera e, então, centrifugados em centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Alemanha), modelo Universal 320 R, a 3000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Transferiu-se 1 ml do sobrenadante para um microtubo Eppendorf® de 5 ml, ao qual foi adicionado 2 ml de tampão TRIS-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 50  $\mu\text{L}$  de 5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico – DTNB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Após 5 minutos, a absorbância foi lida a 412 nm, contra um branco composto por 1 ml de EDTA 0,02 M, 2 ml de de TRIS -HCl 0,4 M (pH 8,9) e 50  $\mu\text{L}$  de DTNB.

A quantidade de MDA foi mensurada pelo método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998), com algumas adaptações. Amostras de 200 mg de tecido foram pesadas e homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato (PBS), 0,2 M pH 7.4, com auxílio do mesmo homogeneizador mecânico de tecidos. Desse homogenato, 200µl foram transferidos para um micro tubo Eppendorf® de 1,5 ml, adicionando-se 650µl de solução 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 2:1, v/v e 150 µL de ácido clorídrico (HCl) puro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) a 37%. Em seguida, os Eppendorfs® foram agitados em vortex (Phoenix Luferco®, Araraquara, Brasil - modelo AP 59/130W) e incubados em banho-maria (Marconi®, Piracicaba, Brasil - modelo MA-156) a 45°C por 40 minutos. Após o banho, as amostras foram resfriadas em gelo e os microtubos Eppendorf® foram centrifugados a 4000rpm em centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Alemanha), modelo Universal 320 R, por 10 minutos. A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita, em seguida, em comprimento de onda de 586 nm em um espectrofotômetro modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os valores de absorbância foram padronizados pela equação da curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e corrigidos pela concentração de proteínas de cada amostra.

#### 4.9 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

Após coloração com Hematoxilina e Eosina as lâminas foram analisadas em microscopia de luz para identificação e quantificação das criptas displásicas (CD) na mucosa colônica, caracterizadas pelo seu aumento de tamanho, lúmen com aspecto de dente de serra, células caliciformes hiperestendidas, redução nos focos de mucina, pseudoestratificação, espessamento da membrana da cripta, hipercelularidade e núcleo aumentado e estratificado, com perda de polaridade (BIRD, 1987; PERE; CERAR, 2014).

Calculou-se o número total de focos de criptas aberrantes no corte histológico, de acordo com a área da lâmina analisada, em cm<sup>2</sup> (MCLELLAN; BIRD, 1988).

#### 4.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DE CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS



Para a análise dos corpúsculos apoptóticos (CoAp) foram montadas lâminas histológicas com secções da parede colônica, em seguida coradas por H&E, quantificadas em baixa magnificação ( $\times 200$ ) por microscopia óptica, usando meios cumulativos, em um total de 50 campos por animal. Os CoAp foram identificados por critérios bem estabelecidos dentro de áreas apresentando tecido normal e tecido com sinais de lesões pré-neoplásicas em todos os grupos do trabalho. Isto é, os CoAp foram avaliados tanto no tecido proveniente dos grupos não expostos ao MNNG quanto nos grupos que foram expostos ao carcinógeno. Em geral, esses CoAp consistiam em massas arredondadas de citoplasma contendo acentuada presença de fragmentos de cromatina.

A quantificação foi realizada através da contagem dos CoAp por cripta presentes em um campo aleatório delimitado por um centímetro quadrado. Todos os CoAp identificados neste campo foram contabilizados. A quantificação de corpúsculos apoptóticos foi expressa como a razão entre número de CoAp por cripta.

Detritos, incluindo fragmentos anfófilos que não puderam ser identificados com certeza como CoAp ou células mitóticas, não foram contabilizados.

#### 4.11 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunistoquímica foram feitas em cortes histológicos do cólon através da reação antígeno-anticorpo seguida da reação com marcador visível ao microscópio, conforme preconizado pelo fabricante. As lâminas desparafinadas e hidratadas passaram por um processo de recuperação antigênica através da incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio a 3% adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, foi utilizado soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados. As lâminas foram incubadas com seus

respectivos anticorpos primários: anti-Caspase-3 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK.®, clone JHM62), em diluição de 1:300; iPCNA (Novocastra ®, Novocastra Laboratories Ltd,UK, clone PC10) em diluição de 1:100; anti-NFKB p65 (RabMab® technology, Abcam Lab, UK, clone E379) em diluição 1:300 p-AKT 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnoly, Inc. USA, clone sc-7985-R) em diluição 1:300; survivin (D8) (Santa Cruz Biotechnoly, Inc. USA, clone sc-17779) em diluição 1:100, todos incubados por 12 horas (over night) em câmara úmida.

Seguinte à lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes foram disponibilizados com PicTure™ Max PolymerDetection Kit (ZYMED® Laboratories). As lâminas foram, então, contra-coradas com Hematoxilina de Harris por um minuto e montadas com Entelan para posteriores análises em microscopia de luz (Garcia et al., 2010).

A imunoreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração no citoplasma das células para marcação de Caspase 3, AKT, NFkB, Survivina e no núcleo celular para marcação do PCNA. A contagem das células positivamente marcadas que apresentaram coloração marrom oriunda da redução do cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina) foi feita manualmente com uso de microscópio óptico da marca Zeiss® (Jenamed - Oberkochen, Alemanha).

As contagens foram realizadas em objetiva de aumento de 400x, e foi considerada toda a extensão de cada corte. O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas ao longo de cada cripta no campo óptico. Todas as avaliações imunoistoquímicas foram realizadas nas células das criptas colônicas, variando conforme a localização do antígeno específico. Foram contadas 20 criptas por corte, sendo um corte para cada animal.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

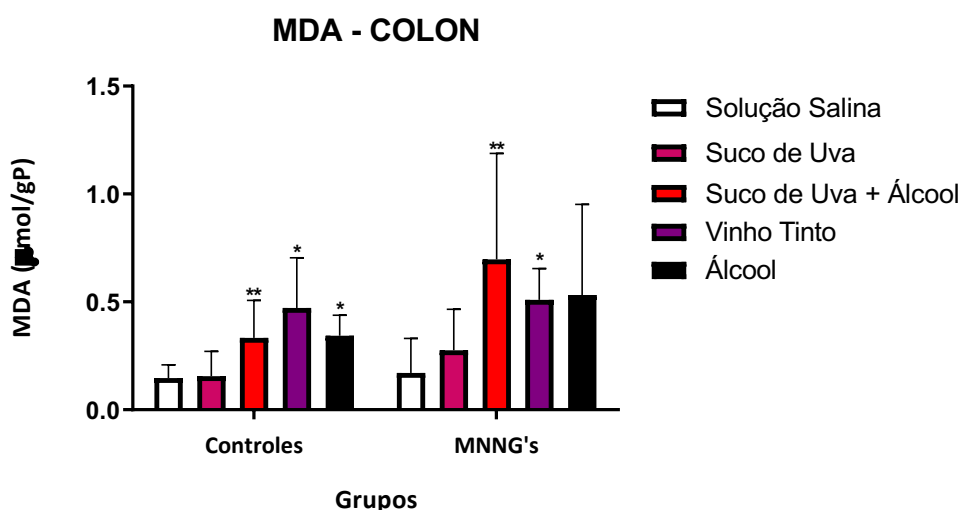
Os resultados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software Graph Pad Prism 8.0 (Graph Pad Software Inc. San Diego, Califórnia, US). As análises de variância de uma via (Teste One-way ANOVA) ou duas vias (Teste Two-way ANOVA) foram utilizadas para determinação das médias entre todos os grupos, com pós-teste de Tukey para confirmação das diferenças estatísticas encontradas. Foi adotado um nível de significância de  $P < 0,05$  e a média foi calculada  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

## 5.1 MDA E GSH - ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓLON

A análise dos níveis de MDA no colon dos animais demonstrou que a presença do álcool aumentou os níveis de MDA em todos os grupos de animais que receberam alguma solução contendo álcool, seja ele derivado do processo de fermentação da uva, como nos grupos que receberam vinho tinto (Grupo V e Grupo MV), seja ele na forma industrializada, isolado (Grupo A e Grupo MA) ou adicionado ao suco de uva (Grupo SA e Grupo MSA). Tais achados indicam a capacidade do álcool em gerar estresse oxidativo ( $P < 0,01$ ) (Gráfico 1A) em todos os grupos que o recebeu. Quanto ao GSH, os compostos do suco e do vinho foram capazes de aumentar a sua concentração, o que não ocorreu com o álcool puro. Os grupos controles que receberam suco de uva e vinho tinto apresentaram aumento na produção do GSH de maneira estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ), demonstrando o efeito antioxidante dos compostos presentes na uva. Nos grupos expostos ao carcinógeno observou-se uma tendência de aumento da produção de GSH no cólon daqueles que receberam soluções contendo os compostos de uvas, porém, não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (Gráfico 1B).

**Gráfico 1A.**

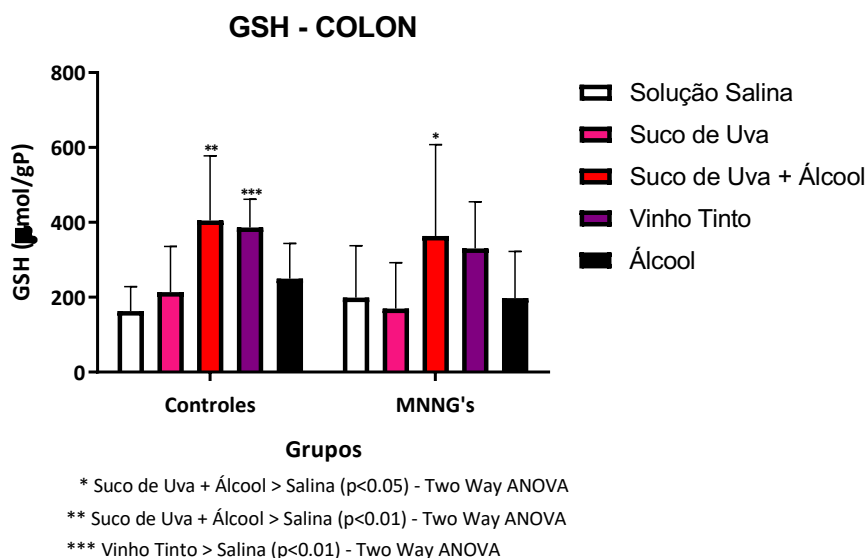


\* Álcool > Salina ( $p < 0.01$ ) - Two Way ANOVA

\*\* Suco de uva + álcool > Salina ( $p < 0.05$ ) - Two Way ANOVA

\* Vinho tinto > Salina ( $p < 0.01$ ) - Two Way ANOVA

**Gráfico 1B.**



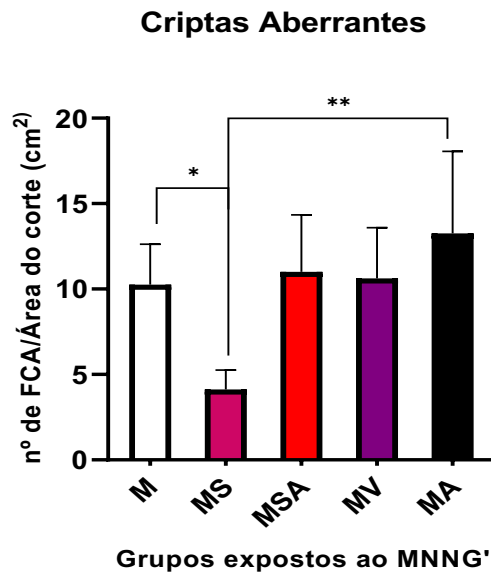
**Gráfico 1. Análise quantitativa de MDA e GSH em tecido colônico.**

**1A.** Presença de álcool promoveu maior produção de MDA em comparação com os grupos que não foram administradas soluções alcólicas (CxA; CxV P<0,01; CxSA P<0,05). **1B.** Grupos que receberam soluções contendo produtos derivados da uva demonstraram maior efeito antioxidante com aumento do GSH (CxSA; CxV P<0,01). Os dados são mostrados como média ± DP, two-way ANOVA.

## 5.2 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

A análise dos focos de criptas aberrantes (FCA) demonstrou que o carcinógeno MNNG foi capaz de induzir a formação de FCAs nos animais que receberam inoculação via retal do MNNG (GRÁFICO 2A). Observa-se que a presença de álcool, seja na forma do vinho tinto ou solução com suco de uva, seja de forma isolada, promoveu um aumento no número de FCAs em seus respectivos grupos quando comparados ao grupo MS (MSxMSA; MSxMV; MSxMA P<0.001). Nota-se que o grupo MS conseguiu diminuir o efeito do carcinógeno (Grupo M), apresentando a menor taxa de formação de FCA entre todos os tratamentos propostos (MxMS P<0,01). Não houve diferença estatística entre os grupos MSA, MV e MA (P>0,05) (Gráfico 2A). Os animais que não receberam carcinógeno não desenvolveram FCAs, sendo assim, não incluídos no gráfico de FCA's.

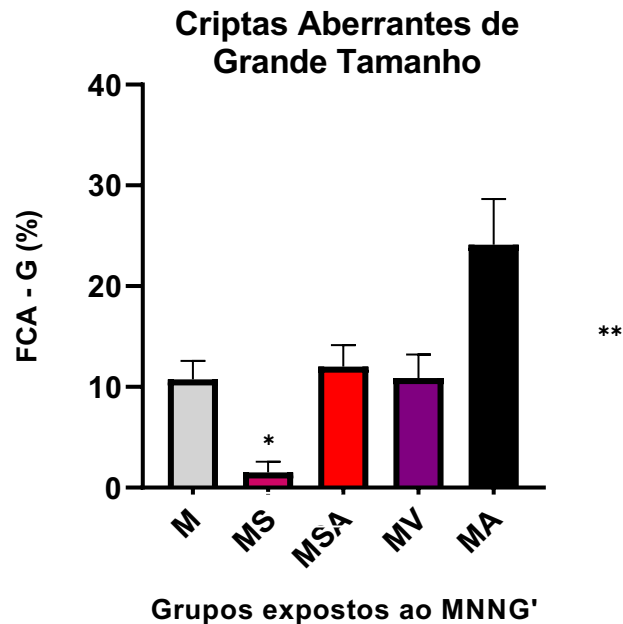
**Gráfico 2A.**



**Gráfico 2A. Número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA).** Análise do número de FCAs por  $\text{cm}^2$ , lâminas coloridas por H&E. O suco de uva apresentou o menor número de FCAs (MS). Os grupos contendo álcool em sua composição não apresentaram diferença estatística entre si (MSA×MV×MA -  $P > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, análise de um fator (one-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

Os focos de criptas aberrantes de grande tamanho (FCA-G) - definidas como FCA com três ou mais criptas – também foram avaliados neste trabalho. Nota-se que mais uma vez que o grupo MS apresentou menor nível de formação de FCA-G em relação aos demais grupos M, MSA, MV e MA ( $P < 0,01$ ) (Gráfico 2B). Além disso, o grupo MA apresentou, de forma estatisticamente significativa, a maior porcentagem de formação de FCA-G quando comparado aos demais grupos expostos ao MNNG ( $P < 0,01$ ).

**Gráfico 2B.**



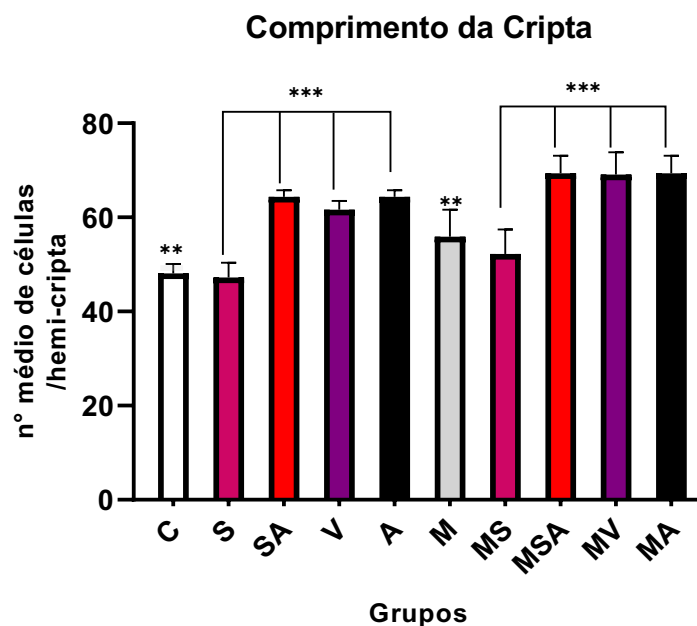
**Gráfico 2B. Focos criptas aberrantes (FCA) de grande tamanho.** Análise da porcentagem de FCA-G%, lâminas coloridas por H&E. O suco de uva reduziu significativamente a formação de FCA (MS). O grupo MA apresentou a maior porcentagem de FCA-G. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, análise de um fator (one-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,01$  \*\*  $P < 0,001$ .

### 5.3 AVALIAÇÃO DA DIMENSÃO DAS CRIPTAS COLÔNICAS APARENTEMENTE NORMAIS

Através da estimativa da hiperplasia epitelial observou-se que a exposição ao MNNG levou ao aumento do comprimento das criptas colônicas (CxM  $P < 0,01$ ) (Gráfico 3). Ademais, a presença do álcool foi um preditor capaz de gerar criptas maiores quando comparada aos grupos que não receberam administração de álcool ( $P < 0,001$ ), independentemente da exposição ao carcinógeno MNNG.



**Gráfico 3.**

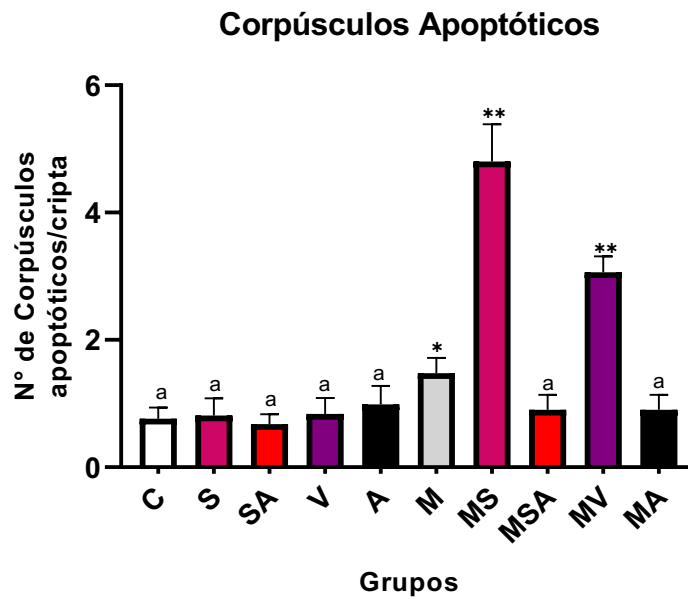


**Gráfico 3. Comprimento das criptas por contagem do número médio de células por hemi-cripta.** Análise do número de células hiperplásicas em tecido CCR e tecido de cólon normal, lâminas coloridas por H&E. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ .

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE ATRAVÉS DOS CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS

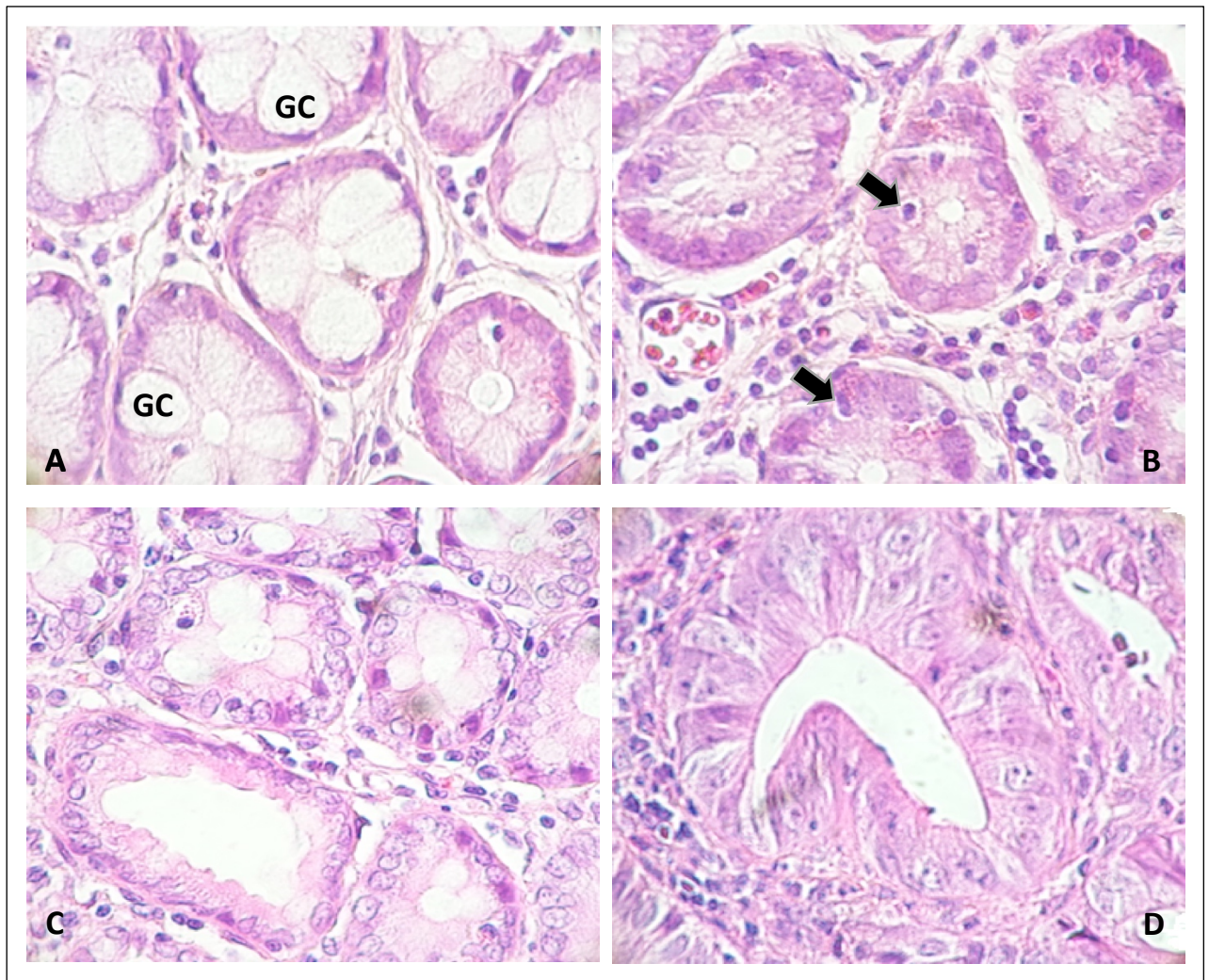
Realizou-se a análise dos corpúsculos apoptóticos (CoAp) para avaliar o grau de apoptose entre os diferentes grupos do trabalho. O grupo exposto ao MNNG (Grupo M) apresentou mais CoAp em relação ao grupo controle (CxM  $P < 0,01$ ). Observa-se que o grupo MS apresentou o maior número de CoAp por cripta entre todos os grupos ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 4), independentemente da exposição ao MNNG, sendo o grupo com o maior nível de apoptose avaliado no trabalho. Além disso, o grupo MV também gerou, de forma estatisticamente significativa, maior número de CoAp em comparação aos demais grupos ( $P < 0,001$ ), exceto em relação ao grupo MS. A figura 2 ilustra a presença de CoAp no tecido normal (A) e nas criptas displásicas (B,C e D). Observa-se que o grupo o suco de uva (Grupo MS) gerou maior quantidade de CoAp nas criptas displásicas. Além disso, a presença do álcool no grupo exposto ao MNNG promoveu uma maior distorção arquitetural na cripta displásica.

**Gráfico 4.**



**Gráfico 4. Corpúsculos apoptóticos expressos em tecido CCR e tecido normal.** Análise do número de corpúsculos apoptóticos por cripta, lâminas coloridas por H&E. O grupo M apresentou maior número de corpúsculos apoptóticos em relação ao grupo controle. O Suco de uva aumentou a apoptose quando exposta ao MNNG (MS). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, análise de um fator (one-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey \*\*\*  $P < 0,001$ . As barras que compartilham uma letra não são significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

Figura 2.



**Figura 2. Fotomicrografia. Coloração por Hematoxilina & Eosina exemplificando criptas normais (A) e criptas displásicas (B, C e D) sob diferentes efeitos do suco de uva (B) e álcool (D). A) Grupo controle (C) - evidenciando criptas normais com células caliciformes (GC), B) Grupo MS - apresentando corpúsculos apoptóticos (setas), C) Grupo M – exposição ao MNNG demonstrando formação de cripta displásica e; D) Grupo MA – demonstra efeito sinérgico entre álcool e exposição ao MNNG na formação de cripta displásica. GC: células caliciformes. Setas: corpúsculos apoptóticos. **Magnificação 400X.****

## 5.5 EXPRESSÃO DO PCNA NO CÓLON

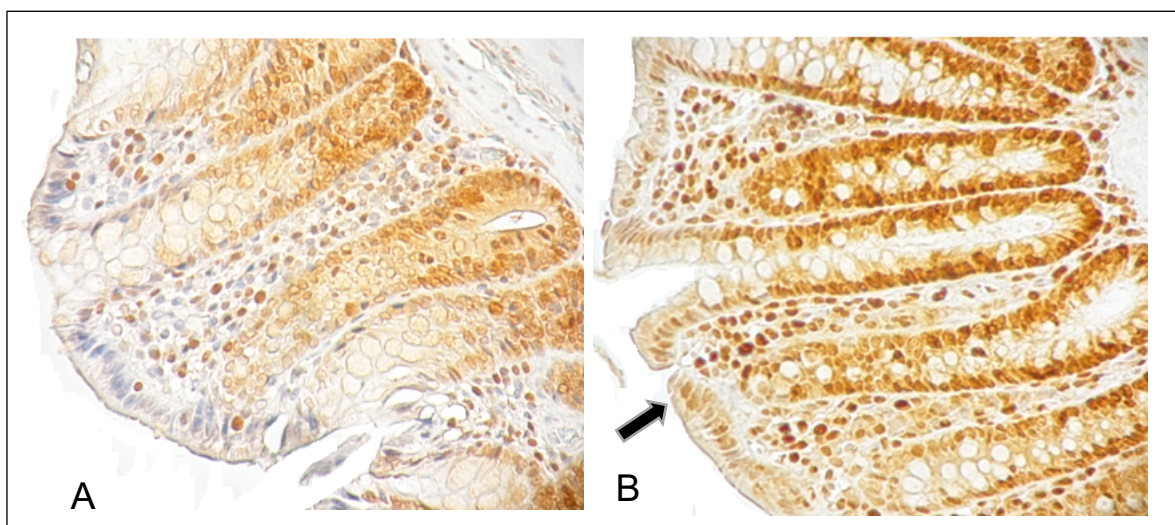
Todos os grupos contendo álcool na solução apresentou um maior número de células positivamente marcadas para o PCNA (Gráfico 5), demonstrando que a presença do álcool foi capaz de gerar maior crescimento descontrolado das células colônicas. O grupo C e o grupo S não apresentou diferença estatística entre si (CxS  $P > 0,05$ ), pode-se concluir, portanto, que o

suco de uva, não levou ao aumento da proliferação celular. O grupo M apresentou, de forma estatisticamente significativa, uma maior expressão de PCNA em comparação ao grupo C, corroborando o efeito carcinogênico do MNNG. A avaliação dos demais grupos mostra que a exposição ao carcinógeno e/ou o consumo do álcool levou ao aumento dos níveis de PCNA nos colons dos animais estudados.

Na análise restrita aos grupos não expostos ao carcinógeno, observa-se que a presença de álcool elevou de forma estatisticamente significativa a expressão de PCNA nas células colônicas ( $P < 0,001$ ). Através da análise do gráfico 5, nota-se que o grupo exposto ao carcinógeno e que também recebeu álcool apresentou o maior grau de proliferação celular ( $P < 0,001$ ), evidenciando um sinergismo entre esses dois preditores. E ainda, grupos que não foram expostos ao carcinógeno, mas que receberam álcool (SA e A) apresentaram níveis semelhantes de expressão de PCNA quando comparados ao grupo que foi exposto ao MNNG (grupo M), não havendo diferença estatística entre eles ( $P > 0,05$ ). Ao comparar o grupo M ao grupo MS, nota-se que o suco de uva apresentou menores níveis de produção de PCNA ( $M \times MS \ P < 0,001$ ). O mesmo fenômeno não é visualizado na análise entre o grupo M e o grupo MV ( $P > 0,05$ ).

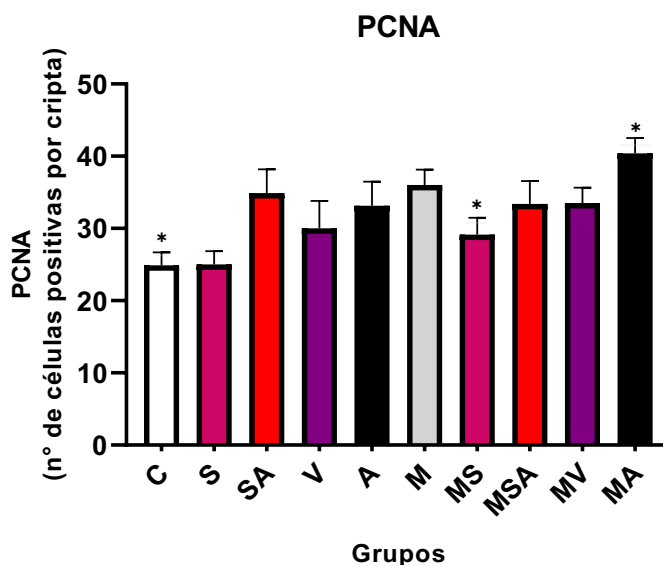
A figura 3 evidencia a diferença na marcação para PCNA nas criptas do grupo controle (Grupo C em 3A) com pouca positividade comparada ao grupo exposto ao MNNG (Grupo M em 3B), que chegou a alcançar o topo das criptas.

**Figura 3.**



**Fotomicrografia de imunomarcção para PCNA.** A) Criptas colônicas referentes ao grupo controle (C), apresentando pouca positividade para PCNA; B) Criptas colônicas referentes ao grupo exposto ao carcinógeno (M) altamente positivas para PCNA. Seta: núcleos marcados no epitélio do topo das criptas. **Magnificação 400X.**

**Gráfico 5.**



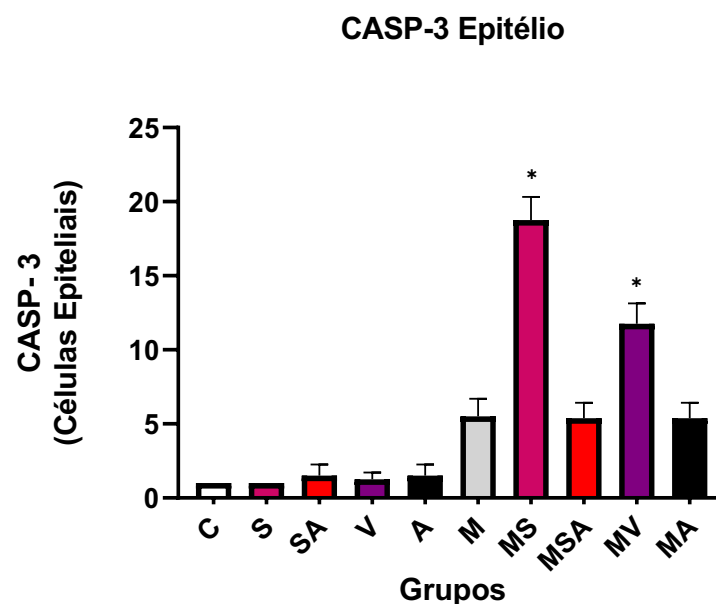
**Gráfico 5. Número de células com coloração imuno-histoquímica de PCNA por cripta da seção de tecido colônico.** A coloração positiva de PCNA representa células em proliferação. Os dados são apresentados como média ± DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*\*\*  $P < 0,0001$ .

### 5.6 EXPRESSÃO DE CASPASE-3 (CASP-3) NO EPITÉLIO

A avaliação da expressão da CASP-3 demonstrou diferenças nos tratamentos com suco de uva, solução suco de uva + álcool, vinho tinto e álcool. Nota-se através da análise dos gráficos 6A e 6B que o grupo M apresentou maior expressão de CASP-3 em comparado ao grupo C, de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ), tanto no estroma quanto no epitélio. Observa-se ainda que não houve diferença estatística entre os grupos que não foram expostos ao MNNG no estroma (Gráfico 6B). Não obstante, de acordo com a análise do gráfico 6A, que avalia as células epiteliais, o grupo ao qual foi induzido a carcinogênese e que recebeu o suco de uva (Grupo MS) apresentou um número mais elevado de células imunomarcadas para CASP-3, com significância estatística ( $P < 0,001$ ), quando comparado aos demais grupos expostos ao carcinógeno. Além disso, o grupo exposto ao carcinógeno e que recebeu vinho

tinto (MV) também apresentou aumento da atividade da CASP-3. Quando se compara o grupo MSA ao grupo MV nota-se que o vinho tinto foi mais efetivo na promoção da atividade da CASP-3 que a solução que fizemos para mimetizar o derivado alcoólico da uva. Ainda, observa-se que o grupo MS gerou maior expressão de CASP-3 em comparação ao grupo MV ( $P < 0,01$ ). Sendo assim, conclui-se, portanto, que o grupo exposto ao carcinógeno e que recebeu suco de uva apresentou maiores níveis de apoptose em comparação ao grupo exposto ao carcinógeno mas que recebeu vinho tinto ( $P < 0,001$ ) e que esses dois foram superiores aos demais na promoção da apoptose.

**Gráfico 6A.**



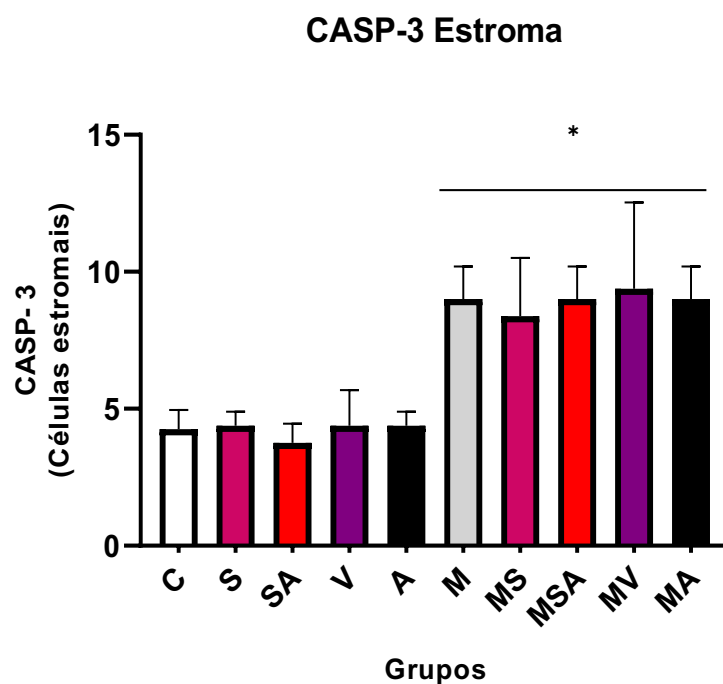
**Gráfico 6A. Expressão de caspase 3 (CASP-3) no epitélio de tecido CCR e tecido normal.** Análise de coloração imuno-histoquímica do número CASP-3 no epitélio do tecido colônico exposto ou não ao MNNG. O grupo suco de uva (MS) e o grupo vinho (MV) apresentaram maior índice de apoptose. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,001$ .

### 5.7 ATIVIDADE DA CASPASE-3 (CASP-3) NO ESTROMA

De maneira geral, os grupos expostos ao carcinógeno apresentaram maior número de células imonumarcadas com CASP-3 nas células estromais adjacentes ao epitélio colônico (Figura 6B) comparado aos grupos que não foram expostos ao MNNG. Observa-se tal efeito na comparação entre o grupo C e o grupo M ( $P < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $P > 0,05$ )

dentro de cada *cluster* de expostos ou não expostos ao carcinógeno. Demonstra-se, assim, que o efeito observado anteriormente no grupo tratado com suco de uva (MSA) não conseguiu atingir o estroma celular, atuando apenas ao nível do epitélio colônico.

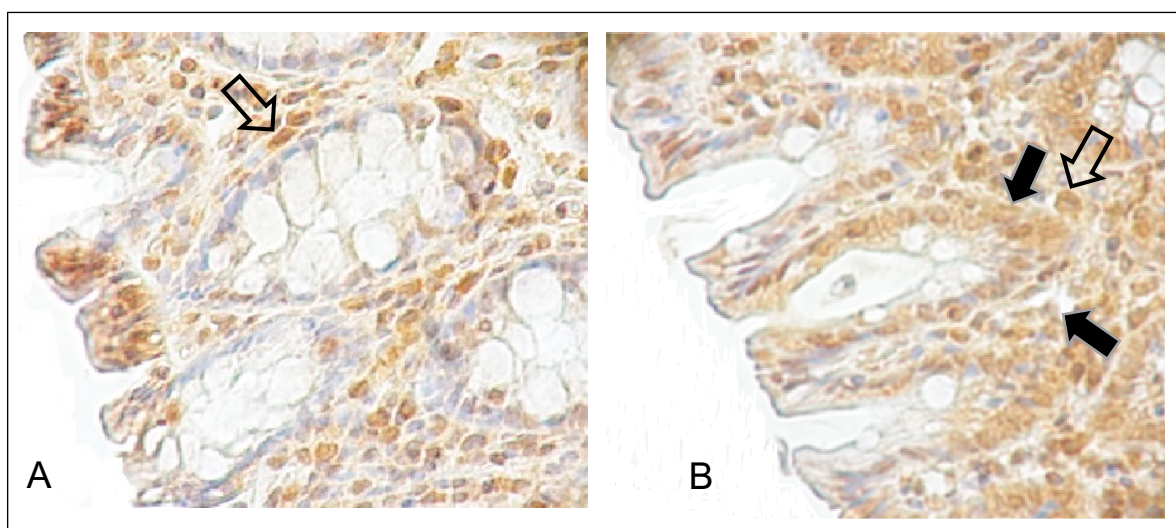
### Gráfico 6B.



**Gráfico 6B. Expressão de caspase 3 (CASP-3) em estroma de tecido CCR e tecido normal.** Análise imuno-histoquímica da expressão de CASP-3 no estroma de tecido colônico exposto ou não ao MNNG. Todos os grupos expostos ao MNNG apresentaram aumento estatisticamente significativo na atividade da CASP-3 (\*  $P < 0,01$ ). Não houve diferença estatísticas entre os grupos expostos ao MNNG entre si ( $P > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

A figura 4 ilustra a imunomarcção para CASP-3 demonstrando como o suco de uva foi capaz de aumentar a atividade da caspase-3 (Figura 4B) nas células epiteliais.

Figura 4.



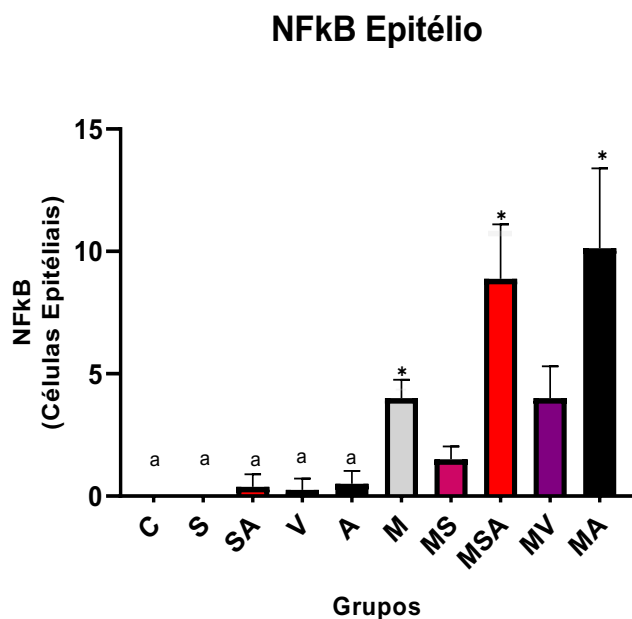
**Figura 4. Fotomicrografia de imunomarcção para Caspase-3.** A) Grupo Controle - menor número de células positivas para CASP-3. B) Grupo MS - aumento no número de células imunomarcadas para CASP-3 observado pela coloração marrom citoplasmática. Setas sem preenchimento: células estromais (pericriptas) marcadas. Setas negras: Células epiteliais marcadas. **Magnificação 400x.**

## 5.8 EXPRESSÃO DO NFkB NO EPITÉLIO

A expressão do fator de transcrição NFkB foi avaliada tanto no epitélio quanto no estroma das células colônicas. Na avaliação das células epiteliais houve um aumento da presença da imunomarcção nos grupos que foram expostos ao carcinógeno (M, MS, MSA, MV e MA), confirmando os dados da literatura, de que o NFkB tem seu papel na carcinogênese; nesse caso induzida pelo MNNG' ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7A). Ademais, tanto no grupo exposto ao carcinógeno que recebeu solução de suco de uva + álcool (Grupo MSA) quanto no grupo que recebeu apenas álcool (MA) observa-se um aumento estatisticamente significativo na expressão do NFkB ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7A). Ainda, o vinho tinto (Grupo MV) não demonstrou diferença estatística em relação ao grupo do carcinógeno (Grupo M) ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 7A). Em contrapartida, nota-se que o suco de uva exposto ao MNNG (Grupo MS), apresentou menor expressão de NFkB em relação aos outros grupos que foram expostos ao carcinógeno ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7A).



**Gráfico 7A.**

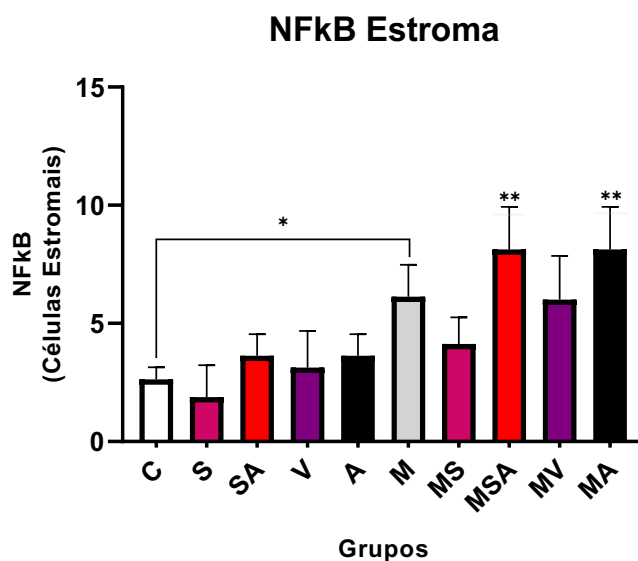


**Gráfico 7A. Expressão de NFkB em epitélio de tecido CRC e tecido normal.** Análise imuno-histoquímica do número células marcadas com NFkB no epitélio do tecido colônico exposto ou não ao MNNG. Os grupos expostos ao álcool (MAS e MA) apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão de NFkB comparado a todos os grupos. Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,001$ . As barras que compartilham uma letra não apresentaram diferença estatística entre si ( $P > 0,05$ ).

### 5.9 EXPRESSÃO DO NFkB NO ESTROMA

A avaliação do estroma apresentou a mesma tendência observada no epitélio. A exposição ao MNNG foi capaz de elevar a expressão de NFkB nas células estromais com significância estatística ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7B). Observa-se que o álcool presente nos grupos que foram expostos ao carcinógeno (MSA e MA) levou a uma expressão ainda maior de NFkB, de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7B). Não houve diferença estatística entre os grupos que não foram expostos ao carcinógeno ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 7B).

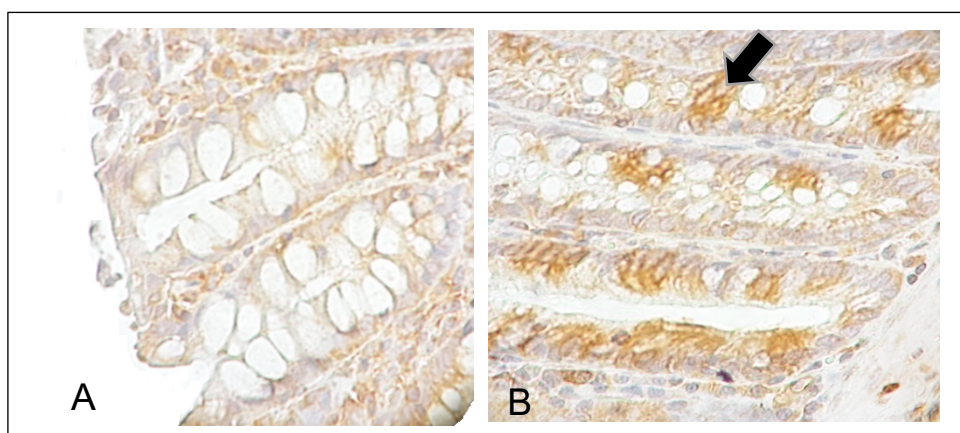
Gráfico 7B.



**Gráfico 7B. Expressão de NFkB em células estromais do tecido CCR e tecido normal.** Análise imuno-histoquímica da expressão de NFkB no estroma de tecido colônico exposto ou não ao MNNG. Todos os grupos expostos ao MNNG apresentaram maiores níveis de NFkB em relação aos grupos controle, sendo que a presença do álcool aumentou os níveis de NFkB em ambos os grupos (MSA e MA). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,001$ .

A figura 5 demonstra o aumento no número de células marcadas para NFkB, evidenciando o grau de inflamação nos tecidos expostos ao MNNG (Figura 5B).

Figura 5



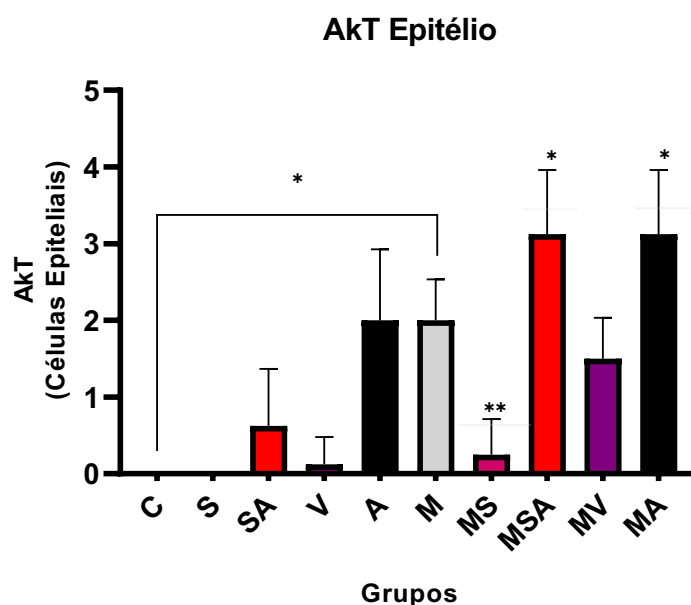
**Figura 5. Fotomicrografia de imunomarcção para NFkB.** A) Grupo Controle - menor número de células positivas para NFkB. B) Grupo MSA - aumento no número de células imunomarcadas para NFkB observado pela coloração marrom citoplasmática (seta). **Magnificação 400x.**

## 5.10 EXPRESSÃO DE AKT NO EPITÉLIO

O grupo exposto ao carcinógeno (M) apresentou um aumento da expressão de AKT de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) (Gráfico 8A) no epitélio das células colônicas em relação ao grupo controle. Além disso, os grupos que receberam álcool e que foram expostos ao MNNG apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de células imunomarcadas para AKT ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 8A).

Por outro lado, o grupo que recebeu suco de uva (MS) apresentou a menor expressão de AKT entre todos os grupos que foram expostos ao carcinógeno ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 8A). Destaca-se a diferença entre o grupo MS em relação ao grupo M, bem como em relação ao grupo MSA, onde houve acentuada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 8A). Nota-se, ainda, que o grupo exposto ao MNNG e que recebeu vinho tinto (Grupo MV) apresentou a mesma tendência de menor expressão de AKT, no entanto, não houve significância estatística ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 8A).

**Gráfico 8A.**



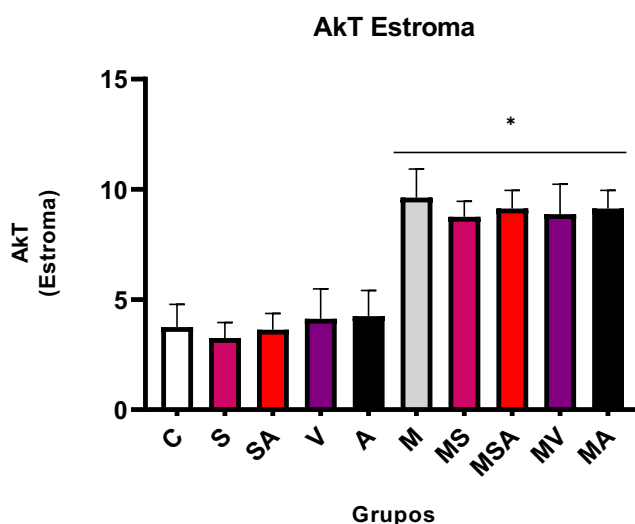
**Gráfico 8A. Expressão de Akt em epitélio de tecido CCR e tecido normal.** Análise imunohistoquímica da expressão de Akt no epitélio do tecido colônico exposto ou não ao MNNG. O grupo MS apresentou menores níveis de expressão de Akt entre os grupos expostos ao carcinógeno. O álcool aumentou a expressão de AKT nos grupos que receberam esse composto.

Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,001$ .

## 5.11 EXPRESSÃO DA AKT NO ESTROMA

A presença do Akt no estroma apresentou um maior número de células imonumarcadas nos grupos expostos ao carcinógeno em comparação aos controles ( $P < 0,01$ ) (Gráfico 8B). Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos expostos ao MNNG ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 8B).

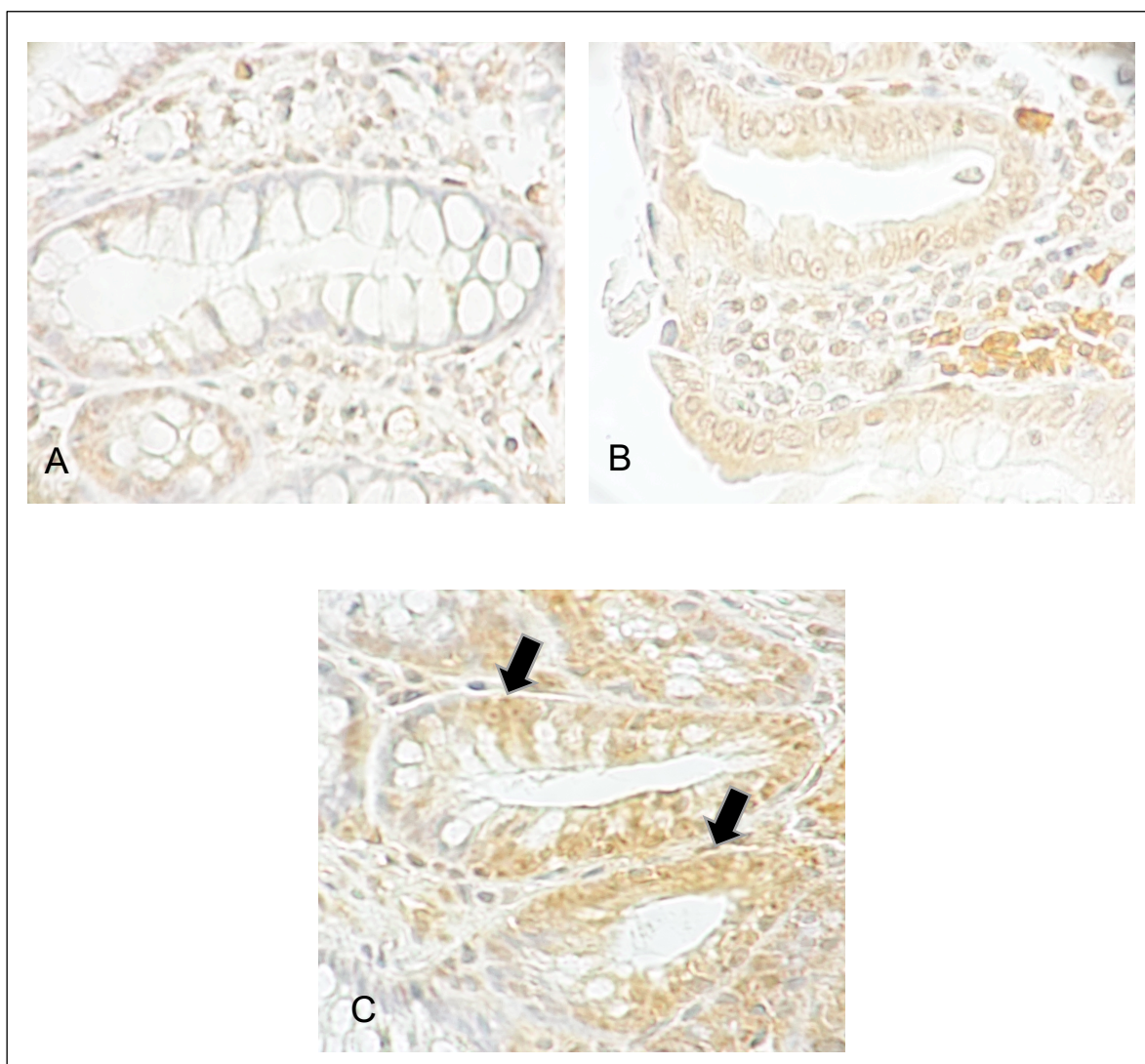
**Gráfico 8B.**



**Gráfico 8B. Expressão de Akt em estroma de tecido CCR e tecido normal.** Análise imunohistoquímica da expressão de Akt no estroma de tecido colônico exposto ou não ao MNNG. Todos os grupos expostos ao MNNG tiveram aumento da atividade de Akt em relação aos grupos que não receberam MNNG ( $p < 0,001$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

O estudo imunohistoquímico (Figura 6) demonstrou um aumento na expressão de AKT tanto no estroma quanto nas células epiteliais dos grupos M e MA quando comparados com o grupo controle. Ademais, observa-se que o grupo que além de ter sido exposto ao MNNG também foi exposto ao álcool apresentou uma expressão ainda mais acentuada dos imunomarcadores para AKT.

Figura 6.



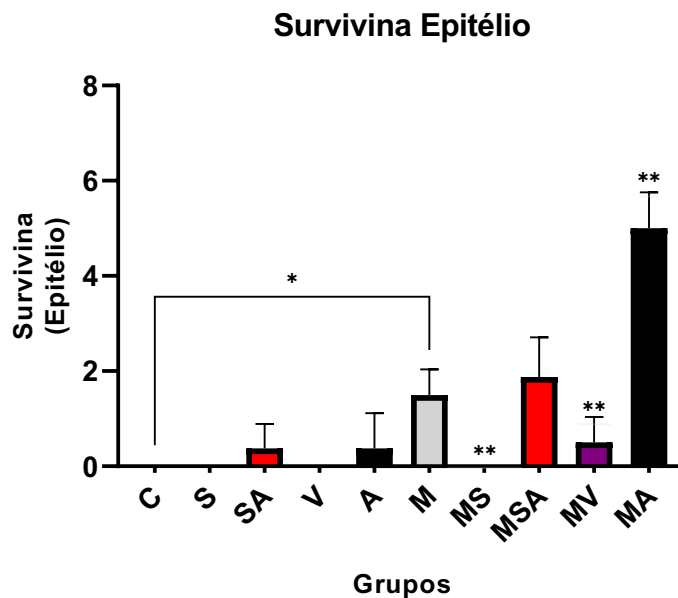
**Figura 6. Fotomicrografia de imunomarcção para AKT. A)** Grupo Controle - fraca positividade de células positivas para AKT. **B)** Grupo M – o carcinógeno MNNG' 60 mg/kg induziu um aumento no número de células positivas para AKT observado pela coloração marrom citoplasmática. **C)** Grupo MA – o álcool aumentou a imunomarcção para AKT (setas). **Magnificação 400x.**

### 5.12 EXPRESSÃO DA SURVIVINA (SURV) NO EPITÉLIO

A avaliação da expressão da SURV nas células epiteliais (Gráfico 9A) demonstrou que o grupo M apresentou aumento estatisticamente significativo do número de células expressando SURV no tecido colônico ( $P < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle (Grupo C). Observa-se que o grupo exposto ao MNNG e que recebeu suco de uva (Grupo MS) não apresentou imunomarcção para SURV nas células avaliadas ( $P < 0,001$ ). Ademais, a presença de álcool no

grupo exposto ao carcinógeno apresentou acentuada expressão de SURV de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ).

**Gráfico 9A.**

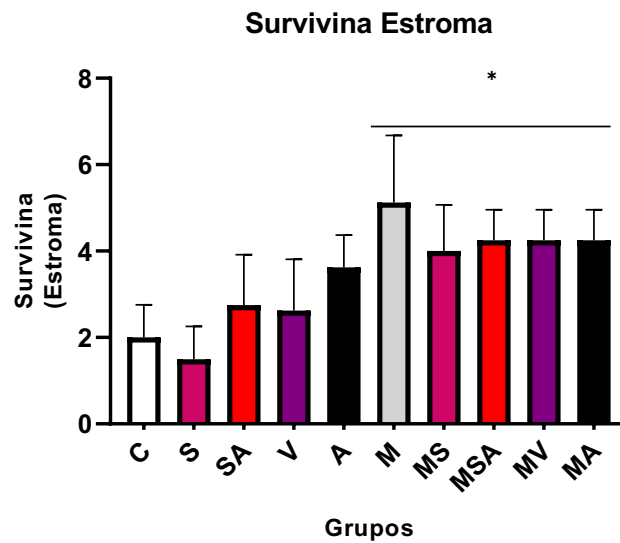


**Gráfico 9A. Expressão de survivina (SURV) no epitélio de tecido CCR e tecido normal.** Análise imuno-histoquímica do número de células expressando SURV no epitélio do tecido colônico exposto ou não ao MNNG. O MNNG presente no grupo M aumentou a produção de SURV em relação ao grupo controle (C). O grupo suco de uva (MS) e o grupo vinho (MV) apresentaram uma diminuição da atividade de SURV em ambos os grupos. O álcool presente nos grupos SA e MSA mostrou ser capaz de aumentar a produção de SURV e inibir a apoptose promovida pelo suco de uva e compostos do vinho. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey \*  $P < 0,01$  \*\*  $P < 0,001$ .

### 5.13 EXPRESSÃO DA SURVIVINA (SURV) NO ESTROMA

Assim como na análise da atividade da CASP-3 no estroma (Gráfico 6B) e da AkT no estroma (Gráfico 8B), a presença da SURV no estroma apresentou um aumento na sua expressão nos grupos que foram expostos ao carcinógeno ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 9B). Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos expostos ao MNNG ( $P > 0,05$ ).

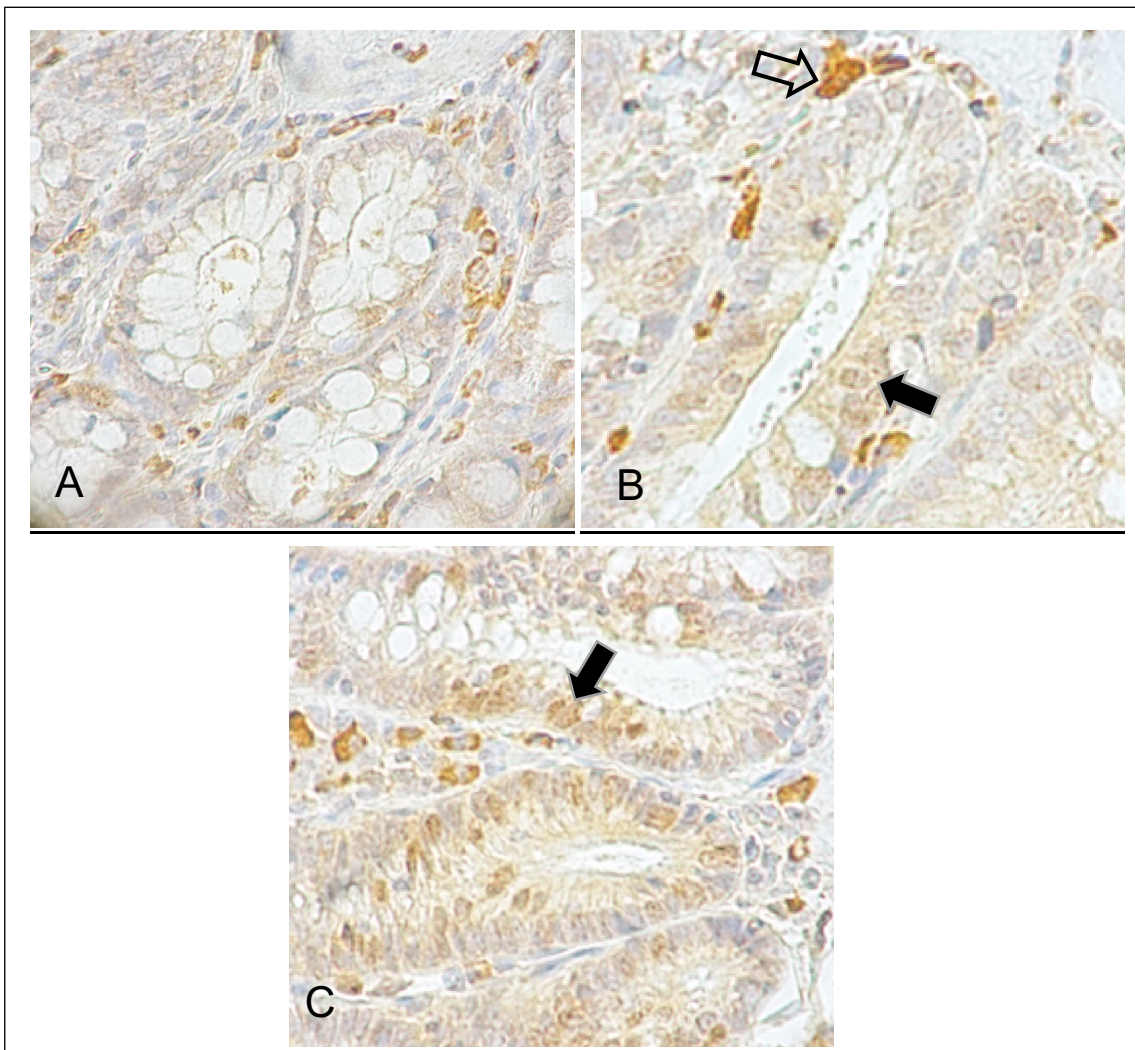
**Gráfico 9B.**



**Gráfico 9B. Expressão de survivina (SURV) em estroma de tecido CCR e tecido normal.** Análise imuno-histoquímica da expressão de SURV no estroma de tecido colônico exposto ou não ao MNNG. Todos os grupos expostos ao MNNG tiveram aumento da atividade de SURV em relação aos não tratados com o carcinógeno ( $p < 0,001$ ). Os dados são mostrados como média  $\pm$  DP, ANOVA de um fator seguido pelo pós-teste de Tukey.

O estudo imunohistoquímico (Figura 7) demonstrou um aumento na expressão de SURV tanto no estroma quanto nas células epiteliais dos grupos M e MA quando comparados com o grupo controle. Ainda, nota-se que o grupo que foi exposto ao MNNG e também foi exposto ao álcool apresentou uma expressão ainda mais acentuada dos imunomarcadores para SURV.

Figura 7.



**Figura 7. Fotomicrografia de imunomarcção para SURV. A. Grupo C – menor número de células positivas para SURV. B. Grupo M – o carcinógeno MNNG' 60 mg/kg induziu um aumento no número de células positivas para SURV marcadas pela coloração marrom citoplasmática (setas sem preenchimento: células estromais (peri-criptas). C. Grupo MA – o álcool aumentou a imunomarcção para SURV (setas negras: Células epiteliais marcadas). Magnificação 400x.**



## 6. DISCUSSÃO

O principal achado do nosso trabalho foi que o suco de uva concentrado se mostrou capaz de atenuar a progressão da carcinogênese induzida pelo carcinógeno MNNG' (60mg/kg) em ratos wistar. Além disso, nosso estudo destacou como a presença do álcool pode afetar as propriedades benéficas presentes nos compostos derivados da uva, tais como suco de uva e vinho tinto. Foi observado também que a associação entre suco de uva e álcool não foi capaz de mimetizar o mesmo efeito do vinho tinto. Observamos ainda que a presença do álcool aumentou os efeitos pró-carcinogênicos do MNNG, como ficou demonstrado na expressão aumentada de PCNA no grupo MA em comparação ao grupo M e também na expressão aumentada nesse grupo dos imunomarcadores NFkB, AKT e SURV. Diante do exposto e com base nas evidências presentes na literatura buscaremos nessa discussão tentar compreender os resultados do nosso trabalho.

## 6.1 IMPACTO DO SUCO DE UVA NO TECIDO COLÔNICO

O tecido colônico após exposição a um agente carcinógeno sofre alterações em seu arranjo. Essas alterações podem levar tanto ao aumento do número de células como ao aumento do tamanho dessas células, caracterizando a hiperplasia celular. GARCIA e colaboradores demonstraram que o processo de fissão de criptas bem como a distribuição do tamanho das criptas são uma indicação do comportamento das células-tronco neoplásicas e conseqüentemente, do comportamento do tumor. (GARCIA; PARK; NOVELLI; WRIGHT, 2000). Neste trabalho, nós adotamos o protocolo de carcinogênese de cólon de rato usando instilações intrarretais de Metil-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidina (MNNG) para estudar as lesões precoces que, por fim, dariam origem a tumores de cólon. A instilação intrarretal de MNNG, um carcinógeno de ação direta, é um método confiável para induzir tumores seletivamente na área exposta ao carcinógeno (NARISAWA; SATO; HAYAKAWA; SAKUMA; NAKANO, 1971; MAURIN et al., 2007). O MNNG não requer ativação ou alteração metabólica e atua na mucosa do cólon. Conseqüentemente, na área exposta ao MNNG, foi possível observar as lesões pré-malignas iniciais que levam à formação de tumores. Em ratos tratados por via intrarretal com MNNG não houve tumores adicionais em outros órgãos, em contraste com ratos injetados com DMH e AOM. Além disso, o MNNG representa um agente alquilante padrão que

metila preferencialmente a posição O6 dos resíduos de desoxiguanosina no DNA e há muitas evidências epidemiológicas indicando a relevância desse composto para o câncer humano (BARDELLI et Al., 2001).

Como esperado e de acordo com a literatura, a exposição ao MNNG foi capaz de promover a carcinogênese em todos os grupos que foram expostos ao agente (Gráfico 2A). Tal fato corrobora o poder alquilante do MNNG e como esse agente é capaz de nos fornecer um excelente biomarcador da efetividade da carcinogênese experimental. Ao analisar as imagens e os gráficos, notamos que o grupo do suco de uva (Grupo MS) foi o único capaz de diminuir a formação de FCA's nos grupos expostos à ação do MNNG. Esse achado corrobora os resultados encontrados por CAMPANHOLO e colaboradores que determinaram que o suco de uva foi capaz de gerar uma marcada redução no número de FCA na carcinogênese induzida pelo azoximetano em ratos (CAMPANHOLO et al, 2015).

Um dos mecanismos envolvidos na carcinogênese experimental com o MNNG, como visto anteriormente, é a metilação. Dentre as principais alterações epigenéticas que comumente ocorrem durante o desenvolvimento do CCR incluem: (1) metilação aumentada do DNA nos promotores de um painel selecionado de genes, denominada como fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) (LAO; GRADY, 2011), (2) mutações do gene da polipose adenomatosa coli (APC) que regula a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e (3) mutações no gene supressor de tumor p53 (MOJARAD; KUPPEN; AGHDAEI; ZALI, 2013). CIMP ocorre durante o estágio inicial do CCR e leva ao silenciamento de alguns genes de reparo do DNA que contribuem para a instabilidade genômica durante a progressão do câncer. Recentemente, TIAN e colaboradores demonstraram que suplementação com bagaço de uva foi capaz de inibir a carcinogênese e o desenvolvimento do câncer colorretal ao prevenir a ocorrência de hipermetilação nas regiões promotoras do marcador CIMP (TIAN et al, 2020). Apesar de não dispormos da análise genômica utilizada pelo grupo do trabalho citado anteriormente, acreditamos que o suco de uva avaliado no nosso trabalho também possa ter diminuído a formação de FCA através de mecanismo semelhante, haja vista o modelo de carcinogênese empregado. Discutiremos

mais a frente, através da avaliação de imunomarcadores, os mecanismos moleculares que podem elucidar o efeito responsável pela formação dos FCAs.

Ademais, a manutenção da estrutura do tecido colônico também depende em certo grau do tamanho das criptas. Assim, nós avaliamos, através de medida estimativa a hiperplasia das criptas. Como esperado, nota-se que o MNNG promoveu o aumento da hiperplasia de forma significativa ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 3). Em um estudo utilizando células de CCR foi demonstrado que as antocianinas, compostos flavonoides presentes no suco de uva, foram capazes de inibir a perda da coesão das células devido sua ação inibitória sobre metaloproteinases (SHIN et al., 2011). Contudo, embora seja possível observar que o suco de uva (MS) apresentou uma tendência de impedir o crescimento hiperplásico não houve diferença em relação ao grupo controle exposto ao carcinógeno (MSxM) ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, o que se destacou na análise é que a presença do álcool nos diferentes grupos tratados demonstrou maior grau de hiperplasia de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ). Sabe-se que mudanças nas propriedades de permeabilidade e perda da polaridade celular são marcas registradas da tumorigênese das células epiteliais, como é o caso do CCR (WONG; GARCIA; WRIGHT, 1999). As junções célula-célula (em inglês, *tight junctions*) são as estruturas cruciais para manter essas funções durante a carcinogênese. Sendo que a maior perda das *Tight Junctions* foi encontrada em câncer de cólon em comparação com o tecido normal (SUNDOV; TOMIC; VILOVIC; KUNAC; KALEBIC; BEZIC, 2009). A perda dessas junções e, conseqüentemente da arquitetura celular normal, pode contribuir para a regulação de genes envolvidos na proliferação, invasão e metástase. Isso ocorre pois o álcool sofre acoplamento químico aos fosfolipídios da membrana e interrompe a organização das junções celulares, levando à translocação nuclear de  $\beta$ -catenina (NA; LEE, 2017), dando início à toda cascata da carcinogênese.

Nosso trabalho, portanto, demonstrou que o álcool aumentou a deformação da arquitetura tecidual no cólon, indo ao encontro da literatura (Figura 2).

## 6.2 IMPACTO DO ÁLCOOL NO TECIDO COLÔNICO

A literatura nos mostra que o consumo de álcool pode ter efeitos benéficos ou prejudiciais, dependendo da quantidade consumida e do perfil do consumidor. As diretrizes de consumo de álcool variam substancialmente em todo o mundo. Nos EUA, por exemplo, um limite máximo de 196 g por semana (cerca de 11 copos de vinho padrão do Reino Unido ou canecas de cerveja por semana) é recomendado para homens, e um limite máximo de 98 g por semana é recomendado para mulheres. Por outro lado, as diretrizes na Itália, Portugal e Espanha recomendam limites de baixo risco quase 50% mais altos que esses. Por outro lado, as diretrizes do Reino Unido recomendam limites de baixo risco para homens quase metade do recomendado pelas diretrizes dos EUA. (WOOD ET AL., 2018).

Uma associação entre o consumo de álcool e um risco aumentado de CCR foi observada em vários estudos. Uma meta-análise de 27 estudos de coorte e 34 estudos de caso-controle concluiu que, em comparação com os que nunca beberam, houve um aumento significativo no risco de CCR de bebedores moderados (dois a três drinques por dia, resumo RR 1,21, IC 95% 1,13-1,28) e bebedores pesados ( $\geq 4$  drinques por dia, RR 1,52, IC 95% 1,27-1,81), mas não bebedores leves ( $\leq 1$  drinque por dia, RR 1,00, IC 95% 0,95-1,05) (FEDIRKO V, et al. 2011). Embora o etanol em si não seja uma substância com efeitos cancerígenos óbvios, seu produto de oxidação, o acetaldeído, é reconhecido como um forte cancerígeno, que pode ter uma série de efeitos no corpo, incluindo a degradação do folato vitamínico e danos ao DNA (HOMANN, 2001).

Os mecanismos pelos quais consumo de álcool exerce seu efeito cancerígeno não são totalmente compreendidos. Uma hipótese possível é que a metilação do DNA pode mediar os efeitos do álcool no risco de CCR. O álcool pode influenciar a metilação do DNA inibindo padrões a atividade e a expressão de enzimas envolvidos na metilação do DNA, como DNA metiltransferases (VARELA-REY et al., 2013). No nosso trabalho o álcool apresentou um incremento na progressão da carcinogênese nos animais que receberam a solução de álcool e também, nos animais que receberam vinho tinto. O fato de o

carcinógeno utilizado apresentar como principal mecanismo de ação a metilação (hiper e hipometilação) e o fato de o álcool influenciar em tais reações, acreditamos que tenha havido um sinergismo na iniciação e promoção da carcinogênese e, por conseguinte, da formação do maior número de FCA.

Além da avaliação do número de FCA, nossa análise histoquímica também avaliou e classificou as alterações no tamanho das criptas através da estimativa da hiperplasia (Gráfico 3). OTORI e colaboradores mostraram que o FCA hiperplásico (assim como a FCA displásico) também pode se transformar em microadenomas (OTORI; SUGIYAMA; HASEBE, 1995). De acordo com ORŁOWSKA e colaboradores o FCA hiperplásico desempenha um papel idêntico no processo de carcinogênese como o FCA displásico. Até o estudo de (ORŁOWSKA; KIEDROWSKI, 2009), os pesquisadores confirmaram a coexistência de diferentes tipos de FCA dentro de um único foco, porém não mostraram a progressão da FCA hiperplásica para displásica e microadenoma.

Da mesma forma, os pólipos hiperplásicos, considerados completamente benignos, foram subestimados até as descrições fornecidas por pesquisadores como, por exemplo, JASS, HAMILTON e outros, que ilustraram o potencial de transformação maligna dos pólipos hiperplásicos (JASS; YOUNG; LEGGETT, 1995; JASS; IINO; RUSZKIEWICZ et al., 2000; HAMILTON, 2001; KOWALCZYK; ORŁOWSKI; KLEPACKI et al., 2020).

Nossos resultados demonstraram que o MNNG induziu o aumento no tamanho das criptas ( $P < 0,001$ ) e que o álcool, quando presente, estimulou a hiperplasia das criptas ( $P < 0,001$ ), tanto nos grupos expostos ao MNNG (Grupos MSA e MA) quanto nos grupos que não foram expostos ao carcinógeno (Grupos AS e A). No trabalho de RAO ficou demonstrado que o acetaldeído, metabólito do etanol, medeia a ruptura da junção celular induzindo o aumento da permeabilidade paracelular (RAO, 2014). Tal fato denota que o álcool por si só é capaz de levar a hiperplasia celular, como visto no Gráfico 3 do nosso trabalho. Observamos comportamento semelhante quando olhamos para os dados obtidos dos grupos que receberam vinho tinto (Grupos V e MV) ( $P < 0,001$ ). Reiteramos, portanto, a partir dos nossos resultados e pelos dados da literatura que a presença do álcool, tanto na solução suco de uva com álcool, álcool

isolado quanto no vinho tinto, foi capaz de gerar crescimento hiperplásico que pode ter contribuído na iniciação e na promoção da carcinogênese.

A fim de complementar e elucidar nossos achados sobre o crescimento celular, procuramos analisar, através de imunohistoquímica, a expressão do PCNA. Uma vez que a inibição de PCNA foi proposta como uma estratégia anticancerígena promissora (CARDANO; TRIBIOLI; PROSPERI, 2020). Assim, seria possível ver qual o índice de proliferação celular em cada grupo do estudo. Descobrimos que em todos os grupos contendo álcool na composição houve um maior número de células positivamente marcadas para o PCNA (Gráfico 5). Ou seja, a presença do álcool permitiu um maior crescimento descontrolado das células colônicas. Podemos observar ainda na análise do Gráfico 5, que o grupo M e o grupo MA, apresentaram elevado número de células marcadas positivamente com PCNA, ilustrado na figura 3B. Tal fato demonstra o alto nível de proliferação celular durante a carcinogênese, e novamente, o papel do álcool de promover ainda mais esse processo. Interessantemente, constatamos que o suco de uva (Grupo S) apresentou o mesmo nível de proliferação celular que o grupo controle (Grupo C), sem diferença estatística entre os dois grupos ( $C \times S$   $P > 0,05$ ). Mais do que isso, quando comparamos o exposto ao carcinógeno (Grupo M) ao grupo que também foi exposto ao carcinógeno, mas que recebeu suco de uva (Grupo MS), notamos que o suco de uva foi capaz de mitigar a proliferação celular promovida pela carcinogênese de forma estatisticamente significativa ( $M \times MS$   $P < 0,001$ ). O vinho tinto (Grupo MV) não demonstrou significância estatística em relação ao grupo exposto ao carcinógeno (Grupo M) ( $P > 0,05$ ). Esses achados estão em concordância com os descritos na literatura. Como por exemplo no trabalho de TIAN; XU; SUN; DEAVILA; DU e ZHU, que demonstraram que os níveis de PCNA estavam diminuídos no grupo de animais suplementado com bagaço de uva e que haviam sofrido indução da carcinogênese, sugerindo a supressão da proliferação celular pelos compostos presentes no bagaço de uva (TIAN; XU; SUN; DEAVILA; DU; ZHU, 2020).

### 6.3 APOPTOSE: O DENOMINADOR COMUM DO SUCO DE UVA E DO VINHO TINTO

A apoptose, um processo programado de morte celular, é fundamental para manter a homeostase do tecido colônico. A apoptose colônica é um

mecanismo importante para a remoção de células senescentes (BAAR; BRANDT; PUTAVET; KLEIN; DERKS; BOURGEOIS, 2017). Quando ocorre a inibição da apoptose espera-se que haja uma redução da taxa de depuração das células senescentes, aumentando o número dessas últimas, o que pode aumentar o risco de mutação genética, uma vez que a apoptose colônica está inversamente associada ao risco de CCR. Quando a senescência funciona normalmente, ela age como um mecanismo supressor de tumor e também desempenha um papel importante na reparação de danos teciduais. No entanto, uma das características das células senescentes é sua capacidade de resistir à apoptose (HU; LI; ZI, 2022), como ocorre no desenvolvimento do CCR.

Recentemente as células senescentes têm se tornado objeto de estudo de diferentes grupos que atuam na investigação do câncer e do envelhecimento. Até agora, pequenas moléculas que podem matar seletivamente as células senescentes têm sido denominadas como *senolíticas* e foram desenvolvidas para atingir as proteínas nas vias anti-apoptóticas nas células senescentes (CHILDS ET AL., 2017; KIRKLAND E TCHKONIA, 2017; NIEDERNHOFER E ROBBINS, 2018). Dentre essas novas drogas senolíticas se encontram alguns compostos presentes na uva e em seus derivados, como por exemplo a quercetina. A quercetina é um flavonóide encontrado em muitas plantas e alimentos, como cebola, vinho tinto, chá verde e maçãs. É um composto natural conhecido por ter um papel na prevenção da carcinogênese em células de câncer de cólon por meio de mecanismos anti-inflamatórios e pró-apoptóticos (GAVRILAS et al., 2016). Vários estudos sugerem que componentes dietéticos bioativos, como curcumina, resveratrol ou quercetina atuam como agentes quimiopreventivos no CCR.

Nossos achados demonstram que o suco de uva e o vinho tinto foram capazes de estimular a apoptose celular. Conforme pode ser visto no Gráfico 4, entre os grupos do estudo que foram expostos ao carcinógeno (M, MS, MSA, MV, MA), o grupo MS e MV apresentaram, de forma muito significativa, um maior número de corpúsculos apoptóticos ( $P < 0,001$ ). Demonstrando que os compostos bioativos presentes nesses produtos podem promover apoptose em células pré-neoplásicas. Interessantemente, quando tentamos criar artificialmente uma solução próxima ao vinho tinto, observamos que o álcool



adicionado à solução impediu que os compostos bioativos do suco de uva pudessem promover a apoptose; e essa diferença foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). Além disso, quando confrontamos os grupos MSxMV observamos que o suco de uva ainda apresenta maior resposta pró-apoptótica em comparação ao vinho tinto ( $P < 0,05$ ). Uma outra análise realizada para avaliarmos o grau de apoptose dos grupos foi a imunomarcação do anticorpo anti-caspase-3. Realizamos a imunomarcação para CASP-3 tanto nas células epiteliais quanto nas células do estroma (Gráfico 6A e gráfico 6B, respectivamente). As proteases cisteína-aspárticas (Caspases) são enzimas proteolíticas que desempenham um papel-chave na morte celular e inflamação (TOULOU MIS; LAZARIS; GRINIATSOS, 2020). Elas são uma família de endoproteases que fornecem ligações críticas nas redes regulatórias celulares que controlam a inflamação e a morte celular. Eles são inativos até serem clivados em resíduos específicos de aspartato (MCILWAIN et al., 2013).

O gráfico representando a imunomarcação da CASP-3 nas células epiteliais (Gráfico 6A) apresentou um padrão extremamente semelhante ao encontrado na avaliação dos CoAp (Gráfico 4). Isto é, os grupos MS e MV, novamente, apresentaram maior número de células imunomarcadas para CASP-3 entre os grupos expostos ao MNNG ( $P < 0,001$ ). Corroborando os achados obtidos na análise dos CoAP. Mais uma vez o grupo suco de uva exposto ao carcinógeno (Grupo MS) apresentou maior expressão de células imunomarcadas para CASP-3. Reforçando o que havemos concluído até aqui neste trabalho, o suco de uva mostrou-se mais efetivo na inibição da carcinogênese colônica. Não obstante, quando avaliamos a imunomarcação de CASP-3 nas células estromais percebemos que não houve diferença entre os grupos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Há estudos na literatura que demonstram diferentes propriedades entre o estroma e as células epiteliais e que há evidências de que as alterações no tecido estromal contribuem para a carcinogênese e que as células epiteliais tumorigênicas podem induzir alterações nos fibroblastos estromais (RONNOV-JESSEN; PETERSEN; BISSELL, 1996). Na última década, o microambiente tumoral (MaT) ou estroma tumoral tornou-se relevante na progressão do CCR (LI; CHEN; SHEN, 2022). No imenso trabalho realizado por THOMAS; MAKAR e LI, foi demonstrado que entre

os 4.916 genes estatisticamente significativos, foram observados dois padrões distintos de tecidos específicos de genes relacionados a Wnt, com 21 genes expressos mais presentes no epitélio e 21 genes expressos mais prevalentes no estroma. Os genes expressos preferencialmente no epitélio codificavam proteínas citoplasmáticas associadas à via Wnt, enquanto as proteínas secretadas (por exemplo, DKK3, Wnt5A e Wnt5B) eram expressas preferencialmente no estroma (THOMAS; MAKAR; LI ET AL., 2015). Supomos que essas diferenças genéticas entre os epitélios, associado ao fato de a célula epitelial estar diretamente em contato e absorvendo os compostos do vinho tinto e do suco de uva, possam explicar a diferença encontrada entre as imunomarcações para CASP-3. Contudo, tais interpretações requerem novos estudos específicos para esse fim.

A fim de tentar compreender tal diferença resolvemos expandir nossas análises imunohistoquímicas. Desta vez, buscamos avaliar a imunexpressão de outra molécula envolvida na apoptose: a survivina (SURV). Para isso, realizamos novos estudos imunohistoquímicos com o anticorpo anti-survivina.

A SURV é uma importante proteína anti-apoptótica como já vimos anteriormente nesse trabalho. Ela é altamente expressa na maioria dos tumores, geralmente naqueles que surgem em células de indivíduos mais velhos (UNRUHE et al., 2016). A expressão da SURV nas células tumorais é regulada negativamente pelo gene supressor de tumoral p53 e é regulado positivamente pela via Wnt/ $\beta$ -catenina (TOULOUMIS; LAZARIS; GRINIATSOS, 2020). No trabalho publicado por CHEN e colaboradores com amostra de 100 espécimes de tecido colônico humano (52 adenomas e 48 tecidos normais) ficou demonstrado que a superexpressão de SURV não só inibe a morte celular, mas também reflete a presença de um maior número de células em proliferação. Concluíram que ao inibir a apoptose e promover a proliferação, a SURV desempenha um papel importante na tumorigênese colorretal. (CHEN; LIU; FU; KANG, 2004). A superexpressão da SURV é um evento precoce no desenvolvimento do adenocarcinoma colônico e parece aumentar durante a sequência mucosa-adenoma-carcinoma normal e com a perda progressiva da diferenciação tumoral (HERNANDEZ; FARMA; COPPOLA et al., 2011). Os níveis de SURV foram positivamente correlacionados com a resistência à

quimioterapia, aumento da recorrência do tumor e mau prognóstico em uma variedade de cânceres, incluindo câncer de cólon, pulmão e mama (UNRUHE, 2016; MOBAHAT; NARENDRAN; RIABOWOL, 2014; PARK et al., 2012; GUINDALINI; MACHADO; GARICOCHEA, 2013).

Como era esperado, o carcinógeno MNNG (Grupo M) apresentou um grande número de células expressando a SURV no tecido colônico tanto nas células epiteliais (Gráfico 9A) como nas células estromais (Gráfico 9B) ( $P < 0,001$ ). Ademais, a presença de álcool nos grupos expostos ao carcinógeno (Grupos MSA e MA) elevou de forma estatisticamente significativa a expressão de SURV ( $P < 0,001$ ). Verificamos, em contrapartida, a ação pró-apoptótica que o suco de uva (Grupo MS) foi capaz de exercer, pois, de forma bastante robusta, mesmo quando exposto ao carcinógeno, o grupo que recebeu o suco de uva não apresentou nem uma única célula imunomarcada para SURV ( $P < 0,001$ ), corroborando os achados de outros trabalhos e demonstrando que os compostos bioativos do suco de uva promovem a inibição da expressão de SURV nas células epiteliais exposta ao carcinógeno ( $P < 0,001$ ). Curiosamente, quando associamos álcool ao suco de uva houve um aumento na expressão de SURV ( $P < 0,001$ ). Retomando o que já discutimos acima sobre como o álcool impacta a arquitetura celular.

Quando analisamos as células estromais não encontramos o mesmo fator de proteção observado nas células epiteliais (Gráfico 9B). Assim como no epitélio, houve um aumento da imunexpressão de SURV nos grupos que sofreram exposição ao carcinógeno (M, MS, MSA, MV, MA x C,  $P < 0,001$ ), reforçando que um dos mecanismos presentes na iniciação da carcinogênese é a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a SURV. Entretanto, entre os grupos expostos ao MNNG não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Tal achado também foi observado na avaliação da CASP-3 vista anteriormente e veremos repetir esse padrão na análise imunohistoquímica da expressão de Akt em células estromais mais a frente neste trabalho. Talvez, além do fato das células epiteliais estarem envolvidas na absorção dos nutrientes e, portanto, sofrerem diretamente ação dos tratamentos através do trato gastrointestinal (TGI). Podemos associar essa diferença de ação nas células epiteliais em relação às células estromais devido uma eventual resistência à ação dos compostos

polifenólicos. Vários estudos indicaram que as mucinas medeiam a quimiorresistência através da população de células-tronco cancerígenas (CTCs) dentro do tumor (POTHURAJU; RACHAGAN; KRISHN et al, 2020). As mucinas estão implicadas no comportamento das células cancerígenas e nas vias de sinalização celular que resultam na progressão do tumor epitelial e na resistência a drogas quimioterápicas (JONCKHEERE; SKRYPEK; VAN SEUNINGEN, 2014). Além disso, esse trabalho também sugeriu que a presença de MUC5AC no secretoma da célula CCR regula a expressão de CD44, o que fornece uma forte relação entre MUC5AC e CD44 (POTHURAJU; RACHAGAN; KRISHN et al, 2020). A progressão da célula epitelial na sequência do adenoma-carcinoma pode envolver outros eventos celulares que levariam à expressão aumentada de CD44 como parte do processo gradual de tumorigênese e malignidade (FURUTA et al, 1996). Nesse trabalho, foi notável que a expressão aumentada de CD44 na neoplasia colorretal ocorreu não apenas em células epiteliais, mas também em linfócitos e macrófagos estromais e também na região extracelular estromal, em grande quantidade. Existem vários relatos de mecanismos imunológicos desencadeados pelo câncer células e a observação de que o CD44 é induzido e apresentado na superfície celular com ativação de células linfóides e mielóides do sangue, fornece uma explicação plausível para elevados níveis estromais de CD44 (FURUTA et al, 1996). Os pesquisadores POTHURAJU; RACHAGAN; KRISHN et al, demonstraram uma relação íntima entre MUC5AC e CD44 e que eles podem efetuar quimioresistência ao agente quimioterápico 5-FU. Diante do exposto, podemos inferir que a presença dessas proteínas no estroma possa estar impedindo a ação pró-apoptótica do suco de uva e do vinho no nosso trabalho. No entanto, serão necessários novos estudos para comprovar o que teorizamos nessa discussão (POTHURAJU; RACHAGAN; KRISHN et al, 2020).

Quando o mecanismo de apoptose falha, ocorre ainda um outro processo com objetivo de evitar que ocorra mutação, esse processo é denominado autofagia. Trata-se de um processo fisiológico através do qual células normais degradam componentes intracelulares para manter a homeostase celular. É postulado como uma alternativa à morte celular quando a maquinaria apoptótica falha e está associada tanto ao CCR quanto ao MaT, com achados controversos (HUANG; FENG, 2017; JANJI; BERCHEM; CHOUAIB, 2018). Alguns dos

mecanismos moleculares envolvidos na modulação da autofagia são fosfoinosítídeo 3-quinases (PI3K) / proteína quinase B (também conhecida como Akt)/ alvo mamífero da rapamicina, TGF- $\beta$ , Notch e sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (JANJI; BERCHEM; CHOUAIB, 2018). A via PI3K/Akt então regula a expressão de survivina em resposta a citocinas e fatores de crescimento; e a via PI3K/Akt/survivina desempenha um papel central na proliferação celular.

A via de sinalização PI3K/AKT é uma importante via celular envolvida no desenvolvimento cancerígeno. A Akt inativa os fatores pró-apoptóticos Bad e procaspase-9 por fosforilação para regular a apoptose e inibe GSK3 para induzir a progressão do ciclo celular via regulação da hiperfosforilação e inativação de RB (FRESNO et al, 2004). Isso pode ativar sua proteína-alvo a jusante e promover a sobrevivência celular mediando fatores de crescimento e insulina (GAO et al, 2017). Para avaliar a correspondência dessa via recentemente descoberta e confirmar nossos achados, realizamos o estudo imunohistoquímico utilizando o marcador para Akt. Novamente, observamos que o grupo exposto ao carcinógeno (Grupo M) foi capaz de promover o aumento da expressão de Akt que corrobora os efeitos carcinogênicos do MNNG (Gráfico 8A;  $P < 0,001$ ). E outra vez descobrimos que o álcool (Grupo MSA e MA) apresentou um aumento no número de células imunomarcadas para Akt, evidenciando sua ação junto ao carcinógeno e sua capacidade de impedir que o suco de uva e seus compostos bioativos pudessem diminuir seu efeito pró-carcinogênico e pró-inflamatório ( $P < 0,001$ ). A figura 6 demonstra como o álcool foi capaz de aumentar a expressão de Akt nas células das criptas colônicas.

Nessa análise, o suco de uva também foi capaz de impedir a imunoexpressão de Akt (Grupo MS) de forma bastante significativa ( $P < 0,001$ ). O vinho tinto (Grupo MV) também apresentou a mesma tendência de mitigar a ação do carcinógeno, no entanto, não houve significância estatística ( $P > 0,05$ ).

Assim como vimos na atividade da CASP-3 e da SURV no estroma (Gráfico 6B; Gráfico 9B). A presença do Akt no estroma apresentou um maior número de células imonumarcadas com Akt nos grupos expostos ao carcinógeno ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 8B). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos expostos ao MNNG ( $P > 0,05$ ). Não obstante, uma vez mais observamos que

o efeito observado na Gráfico 8A com o grupo tratado com suco de uva (MSA) não conseguiu atingir o estroma celular, atuando apenas no nível do epitélio colônico.

Como vimos anteriormente nesse trabalho, a quercetina tem se apresentando como um potencial fármaco contra a senescência e a favor da promoção da apoptose. Em um estudo pré-clínico in vitro, a associação entre quercetina e dasatinib, foi efetiva em eliminar células senescentes (ZHU; TCHKONIA; PIRTSKHALAVA et al., 2015). Este último trabalho nos mostra como a medicina translacional pode atuar de forma a contribuir para a evolução da medicina. Estudos mostraram que a quercetina poderia exercer sua ação biológica em outros campos por meio da modulação da via de sinalização do NFκB (CHEN; ZHANG; ZHU et al., 2020). Outro composto fenólico presente nos derivados da uva é o Resveratrol (RESV). Nesse caso, trata-se de um Não-Flavonóide. O RESV ocorre em duas formas, cis-RESV e trans-RESV, nas quais as isoformas trans são facilmente convertidas em isoformas cis (cis-RESV) pelo calor e pela radiação ultravioleta (PENTEK; NEWENHOUSE; O'BRIEN; CHAUHAN, 2017) e altamente lipofílico (LIU, SUN, LI, JIN, 2019). O RESV modula a via do NFκB que regula a proteína responsável pela apoptose e progressão do ciclo celular. NFκB regula o gene antiapoptótico (VALLIANOU; EVANGELOPOULOS; GELADARI; KAZAZIS, 2015). Considerando que defeitos no NF-κB resultam em aumento da apoptose (KUMAR; KURMI; SINGH A; SINGH D, 2022) e que RESV é um dos principais componentes dos compostos bioativos nos derivados da uva. Dessa forma, resolvemos avaliar qual seria a resposta que nossos diferentes tratamentos teriam sobre a expressão do NFκB.

Na avaliação das células epiteliais encontramos resultados que corroboraram as análises anteriores. Os grupos que foram expostos ao carcinógeno (M, MS, MSA, MV e MA) apresentaram-se com índice de imunomarcagem aumentado em relação aos seus respectivos controles, sugerindo, e confirmando os dados da literatura, de que o NFκB tem seu papel na carcinogênese, nesse caso induzida pelo MNNG ( $P < 0,001$ ) (Gráficos 7A e 7B). Além disso, vimos que mais uma vez o suco de uva (Grupo MS), mesmo após exposição ao MNNG, foi capaz de diminuir os efeitos pró-carcinogênico do carcinógeno nos colons dos ratos do experimento ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7A). Em

contrapartida, no grupo exposto ao carcinógeno e que recebeu solução de suco de uva + álcool (Grupo MSA) ficou demonstrado que a simples presença do álcool diminui os efeitos anti-carcinogênicos dos compostos fenólicos que poderiam impedir o efeito do carcinógeno ( $P < 0,001$ ) (Gráfico 7A). Mais do que isso, o álcool agiu em sinergia com o carcinógeno, promovendo uma maior expressão do fator de transcrição NFkB ( $P < 0,001$ ) (Figura 5). Para entendermos melhor esse achado devemos recordar que a inflamação é uma via chave para a progressão do câncer em vários locais e é intensificada pelo uso de álcool. O consumo crônico de álcool pode recrutar glóbulos brancos específicos (monócitos e macrófagos) ao microambiente tumoral. Esses glóbulos brancos produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 que ativam enzimas geradoras de oxidantes levando a downstream formação de EROs (RATNA; MANDREKAR, 2017). O NFkB também é ativado por essas citocinas, estimulando outras enzimas produtoras de EROs. De fato, em nosso trabalho anterior descobrimos que o álcool prejudicou os efeitos anticancerígenos do RESV no cólon e que possivelmente isso ocorreu devido aos efeitos pró-inflamatórios do álcool, que superaram as propriedades anti-inflamatórias do RESV (CESAR; MINTO; GARCIA, 2022). Há ainda a hipótese de que o consumo de álcool possa ativar as vias de outros agentes cancerígenos; isso pode ocorrer através da atividade induzida pelo álcool do CYP2E1 que podem metabolizar pró-carcinógenos na fumaça do tabaco e produtos químicos industriais. Assim, também é possível que o etanol ajude esses carcinógenos a penetrar nas células, especialmente aquelas da mucosa do trato aerodigestivo superior onde o tabaco e o álcool têm efeito sinérgico sobre o risco de câncer (RUMGAY; MURPHY; FERRARI; SOERJOMATARAM, 2021).

O vinho tinto (Grupo MV) não demonstrou diferença estatística em relação ao grupo do carcinógeno (Grupo M), nos fazendo inferir que o álcool presente no vinho tinto pode, também, diminuir o efeito dos seus compostos bioativos ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 7A). Nas últimas décadas, vários fitoquímicos e seus análogos foram identificados e demonstraram ter efeitos inibitórios significativos na sinalização de NFkB, visando membros dessa cascata. Vimos até o momento que os resultados obtidos em nosso trabalho corroboram a literatura. Por

exemplo, em um estudo com células de câncer colorretal, o resveratrol atenuou a fosforilação, acetilação e translocação nuclear da forma ativa do NFκB. Além disso, o NFκB alterou a atividade da enzima da família das caspases, responsável pela maioria dos processos apoptóticos (RAJAGOPAL; LANKADASARI; ARANJANI; HARIKUMAR, 2018). Em nosso trabalho observamos houve uma relação inversa entre o NFκB e CASP-3. Ou seja, onde o NFκB esteve menos expresso, maior foi a expressão da CASP-3 e, conseqüentemente, maior o grau de apoptose no tecido avaliado.

#### 6.4 ÁLCOOL, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

Rudolf Virchow observou, no século XIX, pela primeira vez que as células inflamatórias estão presentes nos tumores e que os tumores surgem em locais de inflamação crônica (AGGARWAL; GEHLOT, 2009). Essa inflamação é agora considerada um “assassino secreto” para doenças como o câncer. Por exemplo, doenças intestinais inflamatórias, como doença de Crohn e colite ulcerativa, estão associadas a um risco aumentado de adenocarcinoma de cólon (REUTER; GUPTA; CHATUVERDI; AGGARWAL, 2010).

Virchow esteve certo o tempo todo. Mais de cem anos depois de sua constatação, a ligação entre inflamação e câncer foi sugerida por dados epidemiológicos e experimentais e, enfim, confirmada por terapias anti-inflamatórias que mostraram eficácia na prevenção e tratamento do câncer (GONDA; TU; WANG, 2009). A inflamação e a expressão de COX-2 têm sido diretamente ligadas à formação de FCA e à carcinogênese colônica (MARIANI et al., 2009).

O estresse oxidativo ativa vias inflamatórias levando à transformação de uma célula normal em célula tumoral. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são relatadas como tumorigênicas em virtude de sua capacidade de aumentar a proliferação celular, a sobrevivência e a migração celular. As EROs podem induzir dano ao DNA, levando a lesões genéticas que iniciam a tumorigenicidade e subsequente tumoração (REUTER; GUPTA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2010). Também foi relatado que EROs ativa Akt inibindo a fosfatase e o homólogo de tensina deletado do cromossomo 10 (PTEN), a fosfatase



neutralizando a ativação de Akt dependente de PI3K (AZAD; CHEN; GIBSON, 2009). O estresse oxidativo pode ativar uma variedade de fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF-1 $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -catenina/Wnt e Nrf2 ((REUTER; GUPTA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2010).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e reativos metabólitos, chamados oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (em inglês *ROS*), e sua eliminação por mecanismos protetores, conhecidos como antioxidantes (REUTER; GUPTA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2010). Com o intuito de entender se os tratamentos com suco de uva e vinho tinto, por si só, eram capazes de impactar no estresse oxidativo em tecidos normais. Avaliamos os níveis de GSH e MDA no colon dos animais do nosso trabalho.

Além da avaliação das criptas, agora sob o ponto de vista inflamatório, nosso trabalho também demonstrou que a via de sinalização Akt, envolvida na regulação de genes pró-inflamatórios como COX-2, iNOS e TNF- $\alpha$  via ativação de NF- $\kappa$ B (DAN; COOPER; COGSWEL; DUNCAN; TING; BALDWIN, 2008), ficaram inibidas devido a ação dos compostos fenólicos presentes no suco de uva. Em um estudo recente o TNF- $\alpha$ , que é uma citocina pró-inflamatória chave que atua para provocar inflamação, foi reduzida com tratamento à base de quercetina (CHEN T, ZHANG X, ZHU G, et al.2020). Nosso grupo também observou um aumento acentuado da expressão de COX-2 nos animais tratados com MNNG, demonstrando que a inflamação tem seu papel direto na carcinogênese. Além disso, descobrimos que o RESV inibiu o aumento da expressão de COX-2 induzida por MNNG (CESAR; MINTO; GARCIA, 2022).

No trabalho atual, o álcool demonstrou ser capaz de aumentar os níveis inflamatórios em todos os grupos que receberam esse composto, seja na solução de suco de uva com álcool, seja no álcool presente no vinho ou mesmo ele isolado, fato esse exemplificado através do aumento da expressão de NF $\kappa$ B e Akt (Figuras 5 e 6). Uma explicação plausível pode ser sugerida através da análise do Gráfico 1A. Nele, notamos através da avaliação quantitativa de MDA no colon, que todos os grupos contendo álcool na sua composição apresentaram uma produção elevada de MDA em comparação com os grupos que não

receberam álcool de nenhuma forma. Nota-se assim que o álcool foi um indutor de estresse oxidativo, o que pode explicar seu papel promotor da carcinogênese colônica de forma muito significativa em relação ao grupo controle (VxC; AxC -  $P < 0.01$ ) e significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparada ao grupo que recebeu suco de uva (Grupo S). Em consideração à análise dos grupos exposto ao MNNG' postulamos que o carcinógeno permitiu que o álcool atuasse de forma ainda mais efetiva na inflamação dos tecidos colônicos. Muito embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos que utilizaram álcool entre si. Tais achados reforçam o fato de que a presença do álcool impediu não somente a ação anti-carcinogênica e anti-apoptótica dos compostos presentes no suco de uva, como diminuiu muito significativamente suas propriedades anti-oxidantes, já bem fundamentadas na literatura científica. Desta maneira, logo percebemos que a inflamação segue sendo um ator importante no que diz respeito a iniciação da carcinogênese, envolvendo recrutamento de células, disruptura da resposta imune e formação de um microambiente tumoral favorável ao desenvolvimento do câncer.

Observou-se também que os grupos SA e V apresentaram aumento de concentração de GSH no cólon (Gráfico 1B), o que não ocorreu com o álcool puro. Tendo em vista que o GSH tem potente ação anti-oxidante, pode-se inferir que um possível mecanismo pelo qual os compostos bioativos, presentes tanto no suco de uva como no vinho, possam ter atuado no sentido de atenuar os efeitos pró-carcinogênicos do álcool através do aumento das defesas anti-oxidantes. Não se pode descartar que outros sistemas enzimáticos possam também ser estimulados tanto pelo suco de uva como pelo vinho, sendo que esse assunto deverá ser explorado em estudos futuros.

A literatura traz dados controversos em relação ao consumo de álcool. Em uma meta-análise conduzida pela WCRF encontrou um risco 7% maior de câncer colorretal (RR 1,07 (95% CI 1,05–1,08) por 10 g de álcool por dia. O WCRF também encontrou algumas evidências de um efeito de limiar em torno de 20 g por dia com uma associação mais fraca em níveis de ingestão mais baixos. A meta-análise de Bagnardi e colegas não encontrou efeito do álcool no risco de câncer entre bebedores leves, mas o RR aumentou para 1,17 (IC 95% 1,11–1,24) para consumo moderado e 1,44 (IC 95% 1,25–1,65) para consumo

excessivo. O álcool também pode aumentar o risco de lesões pré-cancerosas no cólon, com uma meta-análise relatando um aumento de 27% no risco de adenoma colorretal (RR 1,27 (95% CI 1,17–1,37)) por 25 g de álcool por dia (BEN et al., 2015), consumo considerado leve a moderado por vários órgãos de saúde ao redor do mundo. Nosso estudo utilizou aproximadamente essa mesma quantidade e o que descobrimos é que quantidade sugerida como benéfica, na verdade pode estar trazendo consequências maléficas. Concluimos, que apesar das propriedades medicinais do vinho, seu teor alcoólico limita seu consumo.

Nesse sentido, o suco de uva é uma alternativa por ser composto pelas mesmas substâncias como o vinho sem adição de álcool. Além disso, os antioxidantes do suco de uva permanecem no corpo por mais tempo do que os do vinho (BELL et al., 2000).

## 6.5 SUCO DE UVA OU VINHO TINTO: QUAL É O MELHOR?

Se considerarmos apenas os resultados deste trabalho não houve dúvidas de que o suco de uva se mostrou com maior capacidade de impedir a progressão tumoral nos nossos roedores do que o vinho tinto ou a solução de suco de uva com álcool. No entanto, a literatura é bastante controversa em relação a qual dos dois têm maior potencial anti-carcinogênico.

Sabe-se que suco de uva e vinho tinto, apesar de serem derivados do mesmo produto e possuírem muitos compostos em comum, como por exemplo o RESV, apresentam distintas propriedades. Isso depende de muitos fatores que vão desde o tipo de uva utilizado passando pelo potencial genético da planta, localização geográfica, o clima, a composição do solo, o regime hídrico, concentração de álcool etc. Além disso, existe o fato de ambos possuírem distintos modos de produção e, conseqüentemente, diferentes composições. O processo de pasteurização do suco de uva, por exemplo, induziu um aumento significativo na concentração de antocianina, e o tratamento com etileno e a pasteurização em sucos promoveram um aumento na capacidade antioxidante (DI GENOVA ET AL. 2014).

Os autores DIAS e MENEGON analisaram amostras de vinho e suco de uva e observaram que, embora os teores de compostos fenólicos totais não

apresentassem diferenças significativas entre as duas bebidas, o vinho tinto apresentou atividade antioxidante duas vezes maior que a determinada para o suco de uva (DIAS; MENEGON, 2012). Apesar da tendência observada do suco em apresentar menor teor fenólico do que o vinho, não existe uma correlação direta da atividade antioxidante in vitro com as concentrações de compostos fenólicos totais. Essa não concordância pode ser parcialmente explicada pela presença de açúcares redutores em sucos e vinhos (BARBALHO et al., 2020).

De acordo com a literatura, alguns açúcares interferem na avaliação do teor dos compostos fenólicos totais, resultando em maiores concentrações desses compostos de forma artificial, não refletindo a real concentração dos mesmos. Além disso, o conteúdo do vinho é majoritariamente influenciado pelo processo de fermentação, onde a cepa da levedura e o tempo de fermentação são os fatores mais influentes (FERNÁNDEZ-CRUZ; CEREZO; CANTOS-VILLAR; TRONCOSO; GARCÍA-PARRILLA, 2019). Importante dizer que tais fatores não foram controlados em nosso estudo, podendo haver, portanto, limitações em relação aos nossos achados. Entretanto, nossos resultados foram extremamente consistentes em demonstrar que o álcool, seja quando presente na solução com suco de uva, seja quando presente no vinho tinto, demonstrou impedir a proteção desses contra à carcinogênese induzida pelo MNNG no colon dos ratos.

## 7. CONCLUSÕES

Desta maneira, através de nossos achados, podemos levantar algumas conclusões importantes do nosso trabalho:

- i) o álcool aumentou o estresse oxidativo e contribuiu para o desenvolvimento da carcinogênese. Postulamos que isso tenha ocorrido devido sua ação pró-inflamatória, demonstrada pela expressão aumentada de NFkB e no aumento dos níveis de estresse oxidativo através da análise quantitativa de MDA no cólon dos animais;
- ii) o suco de uva demonstrou ser eficaz em impedir o crescimento e o desarranjo estrutural das células colônicas expostas ao MNNG, enquanto o vinho tinto não apresentou o mesmo efeito. Acreditamos que os fatores estimulatórios do álcool e os diversos inibidores da promoção da carcinogênese, presentes no vinho, neutralizaram-se mutuamente;
- iii) o suco de uva e o vinho tinto promoveram estímulo à apoptose, com maior ativação de CASP-3 e inibição da via Akt/Surv, portanto, demonstrando efeitos inibidores da promoção da carcinogênese.

## 8. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. **WHO**; 2020. Acessado em Dezembro, 2022.
2. SANTOS MO, LIMA FCS, MARTINS LFL, OLIVEIRA JFP, ALMEIDA LM, CANCELA MC. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2023; 69(1): e-213700 doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>
3. OLIVEIRA MM, LATORRE MDRDO, TANAKA LF, ROSSI BM, CURADO MP. Disparities in colorectal cancer mortality across Brazilian States. **Rev Bras Epidemiol**. 2018 Disponível em doi: 10.1590/1980-549720180012. PMID: 30156659.
4. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. Continuous update project expert report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer; **WCRF.**, 2018.
5. SUNG, H, FERLAY, J, SIEGEL, RL, LAVERSANNE, M, SOERJOMATARAM, I, JEMAL, A, BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**. 2021. Disponível em <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
6. ISLAMI F, GODING SAUER A, MILLER KD, SIEGEL RL, FEDEWA SA, JACOBS EJ, MCCULLOUGH ML, PATEL AV, MA J, SOERJOMATARAM I, FLANDERS WD, BRAWLEY OW, GAPSTUR SM, JEMAL A. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA Cancer J Clin**. 2018 Disponível em doi: 10.3322/caac.21440. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29160902.
7. COUGHLIN, S.S. Social determinants of colorectal cancer risk, stage, and survival: a systematic review. **Int J Colorectal Dis** 35, 985–995 (2020). Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03585-z>



8. KHARE, S., CHAUDHARY., BISSONNETTE, M., CARROLL, R. Aberrant Crypt Foci in Colon Cancer Epidemiology. In: Verma, M. (eds) Cancer Epidemiology. **Methods in Molecular Biology**, vol 472. (2009). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_17)
9. PAUL E GOSS, BRITTANY L LEE, TANJA BADOVINAC-CRNJEVIC, KATHRIN STRASSER-WEIPPL, YANIN CHAVARRI-GUERRA, JESSICA ST LOUIS, CYNTHIA VILLARREAL-GARZA, KARLA UNGER-SALDAÑA, MAYRA FERREYRA, MÁRCIO DEBIASI, PEDRO ER LIEDKE, DIEGO TOUYA, GUSTAVO WERUTSKY, MICHAELA HIGGINS, LEI FAN, CLAUDIA VASCONCELOS, EDUARDO CAZAP, CARLOS VALLEJOS, ALEJANDRO MOHAR, FELICIA KNAUL, HECTOR ARREOLA, REKHA BATURA, SILVANA LUCIANI, RICHARD SULLIVAN, DIANNE FINKELSTEIN, SERGIO SIMON, CARLOS BARRIOS, REBECCA KIGHTLINGER, ANDRES GELRUD, VLADIMIR BYCHKOVSKY, GILBERTO LOPES, STEPHEN STEFANI, MARCELO BLAYA, FABIANO HAHN SOUZA, FRANKLIN SANTANA SANTOS, ALBERTO KAEMMERER, EVANDRO DE AZAMBUJA, ANDRES FELIPE CARDONA ZORILLA, RAUL MURILLO, JOSE JERONIMO, VIVIEN TSU, ANDRE CARVALHO, CARLOS FERREIRA GIL, CINTHYA STERNBERG, ALFONSO DUEÑAS-GONZALEZ, DENNIS SGROI, MAURICIO CUELLO, RODRIGO FRESCO, RUI MANUEL REIS, GUISEPPE MASERA, RAÚL GABÚS, RAUL RIBEIRO, RENATA KNUST, GUSTAVO ISMAEL, EDUARDO ROSENBLATT, BERTA ROTH, LUISA VILLA, ARGELIA LARA SOLARES, MARTA XIMENA LEON, ISABEL TORRES-VIGIL, ALFREDO COVARRUBIAS-GOMEZ, ANDRÉS HERNÁNDEZ, MARIELA BERTOLINO, GILBERTO SCHWARTSMANN, SERGIO SANTILLANA, FRANCISCO ESTEVA, LUIS FEIN, MAX MANO, HENRY GOMEZ, MARC HURLBERT, ALESSANDRA DURSTINE, GUSTAVO AZENHA., Planning cancer control in Latin America and the Caribbean, **The Lancet Oncology**, Volume 14, Issue 5, 2013, Pages 391-436, ISSN 1470-2045, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70048-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70048-2).
10. FINLAY A., MACRAE R.M.G., SERES D., SAVARESE D.M.F. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Protective Factors. **UptoDate**. [(acessado em 24 Dezembro de 2018)]; Disponível em:

<https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>

11. THANIKACHALAM K, KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**. 2019 Jan 14;11(1):164. doi: 10.3390/nu11010164. PMID: 30646512; PMCID: PMC6357054.
12. FEDIRKO V, TRAMACERE I, BAGNARDI V, ROTA M, SCOTTI L, ISLAMI F, NEGRI E, STRAIF K, ROMIEU I, LA VECCHIA C, BOFFETTA P, JENAB M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Ann Oncol**. 2011 Sep;22(9):1958-72. Epub 2011 Feb 9.
13. SIMON K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clin Interv Aging**. 2016 Jul 19;11:967-76. Disponível em doi: 10.2147/CIA.S109285. PMID: 27486317; PMCID: PMC4958365.
14. CHOI C-HR, BAKIR IA, HART AL, et al. Clonal evolution of colorectal cancer in IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2017;14(4):218–229. Disponível em doi: 10.1038/nrgastro.2017.1
15. HOMANN N. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. **Addict Biol**. 2001;6(4):309–323.
16. FRESNO VARA JA, CASADO E, DE CASTRO J, CEJAS P, BELDA-INIESTA C, GONZÁLEZ-BARÓN M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev**. 2004; 30:193–204. 10.1016/j.ctrv.2003.07.007
17. GANESAN K., XU B. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: A critical review. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. 2017;1401:102–113. Disponível em doi: 10.1111/nyas.13446
18. KUPPUSAMY P., YUSOFF M.M., MANIAM G.P., ICHWAN S.J.A., SOUNDHARRAJAN I., GOVINDAN N. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: A review. **Acta Pharma. Sin. B**. 2014;4:173–181.

19. SINGH S.V., SINGH K. Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. **Carcinogenesis**. 2012;33:1833–1842. Disponível em doi: 10.1093/carcin/bgs216.
20. LUÍS FERNANDO DE SOUSA MORAES, XIAOFEI SUN, MARIA DO CARMO GOUVEIA PELUZIO & MEI-JUN ZHU. Anthocyanins/anthocyanidins and colorectal cancer: What is behind the scenes?, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, (2019) 59:1, 59-71, Disponível em DOI: 10.1080/10408398.2017.1357533
21. CAO M, WANG Y, LU G, QI H, LI P, DAI X, LU J. Classical Angiogenic Signaling Pathways and Novel Anti-Angiogenic Strategies for Colorectal Cancer. **Curr Issues Mol Biol**. 2022 Sep 26;44(10):4447-4471. doi: 10.3390/cimb44100305. PMID: 36286020; PMCID: PMC9601273.
22. LANCON A., DELMAS D., OSMAN H., THENOT J.P., JANNIN B., LATRUFFE N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: Involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 2004.
23. GOWDA V., KARIMA N., REZAUL ISLAM SHISHIRA M., XIE L., CHEN W. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. **Trends Food Sci. Technol**. 2019.
24. NOVOA DÍAZ MB, MARTÍN MJ, GENTILI C. Tumor microenvironment involvement in colorectal cancer progression via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: Providing understanding of the complex mechanisms of chemoresistance. **World J Gastroenterol**. 2022.
25. GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, DE REYNIÈS A, SCHLICHER A, SONESON C, MARISA L, ROEPMAN P, NYAMUNDANDA G, ANGELINO P, BOT BM, MORRIS JS, SIMON IM, GERSTER S, FESSLER E, DE SOUSA E MELO F, MISSIAGLIA E, RAMAY H, BARRAS D, HOMICKO K, MARU D, MANYAM GC, BROOM B, BOIGE V, PEREZ-VILLAMIL B, LADERAS T, SALAZAR R, GRAY JW, HANAHAHAN D, TABERNERO J, BERNARDS R, FRIEND SH, LAURENT-PUIG P, MEDEMA JP, SADANANDAM A, WESSELS

- L, DELORENZI M, KOPETZ S, VERMEULEN L, TEJPAR S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med.** 2015;21:1350–1356.
26. YUAN S, TAO F, ZHANG X, ZHANG Y, SUN X, WU D. Role of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. **Biomed Res Int.** 2020
27. MA BIN, HOTTIGER MICHAEL O. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway during Inflammation. **Frontiers in Immunology.** 2016
28. SCHWITALLA S, FINGERLE AA, CAMMARERI P, NEBELSIEK T, GOKTUNA SI, ZIEGLER PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. **Cell** (2013) 152(1–2):25–38. doi:10.1016/j.cell.2012
29. DE ASSIS JV, COUTINHO LA, OYEYEMI IT, OYEYEMI OT, GRENFELL RFEQ. Diagnostic and therapeutic biomarkers in colorectal cancer: a review. **Am J Cancer Res.** 2022
30. RIVLIN N, BROSH R, OREN M, ROTTER V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes Cancer.** 2011
31. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** 1990
32. WHITESIDE TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene.** 2008
33. SHEN M, KANG Y. Complex interplay between tumor microenvironment and cancer therapy. **Front Med.** 2018
34. LI J, CHEN D, SHEN M. Tumor Microenvironment Shapes Colorectal Cancer Progression, Metastasis, and Treatment Responses. **Front Med** (Lausanne). 2022

35. FODDE R. The Apc gene in colorectal cancer. **Eur J Cancer**. 2002
36. GUTIERREZ-ESCOBAR R., ALIANO-GONZALEZ M.J., CANTOS-VILLAR E. Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. **Molecules**. 2021
37. KENNEDY J.A., MATHEWS M.A., WATERHOUSE A.L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. **Am. J. Enol. Vitic**. 2002
38. VRDOLJAK J, KUMRIC M, TICINOVIC KURIR T, MALES I, MARTINOVIC D, VILOVIC M, BOZIC J. Effects of Wine Components in Inflammatory Bowel Diseases. **Molecules**. 2021
39. FAJARDO AM, PIAZZA GA. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2015
40. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767, 1990.
41. SCHROR K. Pharmacology and cellular/molecular mechanisms of action of aspirin and non-aspirin NSAIDs in colorectal cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 25: 473–484, 2011
42. DEKKER E, TANIS PJ, VLEUGELS JLA, KASI PM, WALLACE MB. Colorectal cancer. *Lancet* 394: 1467–1480. 10.1016/S0140-6736(19)32319-0. 2019.
43. International Agency for Research on Cancer. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1–42. IARC Monographs Supplement 7 <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/Suppl7.pdf> Acessado em 2018 e 2022.

44. BADR EL-DIN NK, ABDEL FATTAH SM, PAN D, TOLENTINO L, GHONEUM M. Chemopreventive Activity of MGN-3/Biobran Against Chemical Induction of Glandular Stomach Carcinogenesis in Rats and Its Apoptotic Effect in Gastric Cancer Cells. **Integr Cancer Ther.** 2016. Disponível em doi:10.1177/1534735416642287
45. VAN DE WETERING M, SANCHO E, VERWEIJ C, DE LAU W, O Ving I, HURLSTONE A, VAN DER HORN K, BATLLE E, COUDREUSE D, HARAMIS AP, TJON-PON-FONG M, MOERER P, VAN DEN BORN M, SOETE G, PALS S, EILERS M, MEDEMA R, CLEVERS H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell** 111: 241–250, 2002.
46. LI J, MA X, CHAKRAVARTI D, SHALAPOUR S, DEPINHO RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes Dev.** 2021. Disponível em doi:10.1101/gad.348226.120
47. VERMEULEN L, SNIPPERT HJ. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. **Nat Rev Cancer.** 2014. Disponível em doi: 10.1038/nrc3744
48. DALERBA P, KALISKY T, SAHOO D, RAJENDRAN PS, ROTHENBERG ME, LEYRAT AA, SIM S, OKAMOTO J, JOHNSTON DM, QIAN D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. **Nat Biotechnol.** 2011. Disponível em doi: 10.1038/nbt.2038
49. LI H, COURTOIS ET, SENGUPTA D, TAN Y, CHEN KH, GOH J JL, KONG SL, CHUA C, HON LK, TAN WS, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. **Nat Genet.** 2017. Disponível em doi: 10.1038/ng.3818

50. ZEKI SS, GRAHAM TA, WRIGHT NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2011. Disponível em doi: 10.1038/nrgastro.2010.211
51. VARGAS AJ, THOMPSON PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. **Nutr Clin Pract** 27: 613–623, 2012.
52. BOGAERT J, PRENEN H. Molecular genetics of colorectal cancer. **Ann Gastroenterol** 27: 1–6, 2014.
53. HALF E, ARBER N. Chemoprevention of gastrointestinal neoplasia. **Curr Gastroenterol Rep** 15: 320, 2013.
54. TARAPORE RS, SIDDIQUI IA, MUKHTAR H. Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by bioactive food components. **Carcinogenesis**. 2012. Disponível em doi:10.1093/carcin/bgr305
55. RIBEIRO CCD, SILVA RM, CAMPANHOLO VMLP, RIBEIRO DA, RIBEIRO PAIOTTI AP, FORONES NM. Effects of Grape Juice in Superoxide Dismutase and Catalase in Colorectal Cancer Carcinogenesis Induced by Azoxymethane. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2018. Disponível em doi:10.22034/APJCP.2018.19.10.2839
56. H.C. DAN, M.J. COOPER, P.C. COGSWELL, J.A. DUNCAN, J.P. TING, A.S. BALDWIN. Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. **Genes Dev**. 2008
57. KANDYLIS P. Grapes and Their Derivatives in Functional Foods. **Foods**. 2021. Disponível em doi:10.3390/foods10030672
58. ALAM MN, ALMOYAD M, HUQ F. Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. **Biomed Res Int**. 2018. Disponível em doi:10.1155/2018/4154185

59. M. LÓPEZ-VÉLEZ , F. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ & C. DEL VALLE-RIBES. The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2003. Disponível em DOI: 10.1080/10408690390826509
60. CASTALDO, L., A. NARVÁEZ, L. IZZO, G. GRAZIANI, A. GASPARI, G. DI MINNO, AND A. RITIENI. Red wine consumption and cardiovascular health. **Molecules**. 2019.
61. SANDRA MARIA BARBALHO, ALDA MARIA M. BUENO OTTOBONI, ADRIANA MARIA RAGASSI FIORINI, ÉLEN LANDGRAF GUIGUER, CLAUDIA CRISTINA TEIXEIRA NICOLAU, RICARDO DE ALVARES GOULART & URI ADRIAN PRYNC FLATO. Grape juice or wine: which is the best option?, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020. Disponível em DOI: 10.1080/10408398.2019.1710692
62. DI GENOVA, A., A. ALMEIDA, C. MUÑOZ ESPINOZA, P. VIZOSO, D. TRAVISANY, C. MORAGA, M. PINTO, P. HINRI CHSEN, A. ORELLANA, AND A. MAASS. Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants. **BMC Plant Biology** . Disponível em doi: 10.1186/1471-2229-14-7.
63. DIAS, S. P., AND R. F. MENEGON. Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in industrialized grape juice and red wine. **Revista Univap**. 2012.
64. NIXDORF SL, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**. pp. 208-215. 2010.
65. TOALDO IM, FOGOLARI O, PIMENTEL GC, GOIS JS, BORGES DLG, BORDIGNON-LUIZ M. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT – Food Science and Technology**, 53 pp. 1-8. 2013.



66. VERNOUSFADERANI E.K., AKHTARI N., REZAEI S., REZAEI Y., SHIRANIRAD S., MASHHADI M., HASHEMI A., KHANKANDI H.P., BEHZAD S. Resveratrol and Colorectal Cancer: A Molecular Approach to Clinical Researches. **Curr. Top. Med. Chem**;21:2634–2646. 2021. Disponível em doi: 10.2174/1568026621666211105093658
67. PATEL K.R., BROWN V.A., JONES D.J., BRITTON R.G., HEMINGWAY D., MILLER A.S., WEST K.P., BOOTH T.D., PERLOFF M., CROWELL J.A., et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Res.**; 70:7392–7399. 2010. Disponível em doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2027.
68. HOWELLS L.M., BERRY D.P., ELLIOTT P.J., JACOBSON E.W., HOFFMANN E., HEGARTY B., BROWN K., STEWARD W.P., GESCHER A.J. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. **Cancer Prev. Res.**; 4:1419–1425. 2011. Disponível em doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148.
69. AIELLO NM, MADDIPATI R, NORGDARD RJ, BALLI D, LI J, YUAN S, YAMAZOE T, BLACK T, SAHMOUD A, FURTH EE, et al. EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. **Dev Cell.**;45:681–695.e684. 2018. Disponível em doi: 10.1016/j.devcel.2018.05.027.
70. DOU Y, LEI JQ, GUO SL, ZHAO D, YUE HM, YU Q. The CNPY2 enhances epithelial-mesenchymal transition via activating the AKT/GSK3 $\beta$  pathway in non-small cell lung cancer. **Cell Biol Int.**; 42:959–964. 2018. Disponível em doi: 10.1002/cbin.10961.
71. YUAN L, ZHOU M, HUANG D, et al. Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial- mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling pathway [published correction

appears in Mol Med Rep. 2022 Dec;26(6):]. **Mol Med Rep.** 20(3):2783-2795. 2019;. Disponível em doi:10.3892/mmr.2019.10528

72. PATEL VB, MISRA S, PATEL BB, MAJUMDAR AP. Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol. **Nutr Cancer** 62: 958–967, 2010.
73. ZHANG Y, LIU K, YAN C, et al. Natural Polyphenols for Treatment of Colorectal Cancer. **Molecules.** 27(24):8810. 2022. Disponível em doi:10.3390/molecules27248810
74. SHI R.X., ONG C.N., SHEN H.M. Luteolin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells. **Oncogene.** 23:7712–7721. 2004. Disponível em doi: 10.1038/sj.onc.1208046
75. PANDURANGAN A.K., DHARMALINGAM P., SADAGOPAN S.K., RAMAR M., MUNUSAMY A., GANAPASAM S. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$  signaling. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 32:131–139. 2013. Disponível em doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2013007522.
76. WANG X., YANG D.Y., YANG L.Q., ZHAO W.Z., CAI L.Y., SHI H.P. Anthocyanin Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. **J. Am. Coll. Nutr.** 38:470–477. 2019. Disponível em doi: 10.1080/07315724.2018.1531084
77. ANWAR S., FRATANTONIO D., FERRARI D., SAIJA A., CIMINO F., SPECIALE A. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation. **Mol. Med. Rep.** 14:1397–1403. 2016. Disponível em doi: 10.3892/mmr.2016.5397.
78. SHIN D.Y., LEE W.S., LU J.N., KANG M.H., RYU C.H., KIM G.Y., KANG H.S., SHIN S.C., CHOI Y.H. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells by anthocyanins through suppression of Akt and activation of p38-MAPK.

- Int. J. Oncol.** 35:1499–1504. 2009. Disponível em doi: 10.3892/ijo\_00000469.
79. SHIN D.Y., LU J.N., KIM G.Y., JUNG J.M., KANG H.S., LEE W.S., CHOI Y.H. Anti-invasive activities of anthocyanins through modulation of tight junctions and suppression of matrix metalloproteinase activities in HCT-116 human colon carcinoma cells. **Oncol. Rep.** 25:567–572. 2011. Disponível em doi: 10.3892/or.2010.1104.
80. CHUNG S.S., DUTTA P., AUSTIN D., WANG P., AWAD A., VADGAMA J.V. Combination of resveratrol and 5-fluorouracil enhanced anti-telomerase activity and apoptosis by inhibiting STAT3 and Akt signaling pathways in human colorectal cancer cells. **Oncotarget.** 9:32943–32957. 2018. Disponível em doi: 10.18632/oncotarget.25993.
81. COSTEA T, HUDIȚĂ A, CIOLAC OA, GĂLĂȚEANU B, GINGHINĂ O, COSTACHE M, GANEA C, MOCANU MM. Chemoprevention of Colorectal Cancer by Dietary Compounds. **Int J Mol Sci.** Nov 28;19(12):3787. 2018 . Disponível em doi: 10.3390/ijms19123787. PMID: 30487390; PMCID: PMC6321468.
82. ISLAM, B. U., SUHAIL, M., KHAN, M. K., ZUGHAIBI, T. A., ALSERIHI, R. F., ZAIDI, S. K., & TABREZ, S. Polyphenols as anticancer agents: Toxicological concern to healthy cells. *Phytotherapy Research*, 35( 11), 6063– 6079. 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1002/ptr.7216>
83. CESAR EF, MINTO SB, GARCIA SB. Alcohol hinders the Anti-Carcinogenic effect of Resveratrol in the Colon of rats: O álcool impede o efeito Anticancerígeno do Resveratrol no Cólon de ratos. **STUDIES IN HEALTH SCIENCES**, 3(3), 1508–1521. 2022. Disponível em <https://doi.org/10.54022/shsv3n3-018>
84. JAE KIM, JENNIE NG, AHSAN AROZULLLAH, RONALD EWING, XAVIER LLOR, ROBERT E. CARROLL, RICHARD V. BENYA. Aberrant Crypt Focus

Size Predicts Distal Polyp Histopathology. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. 17 (5): 1155–1162. 2008. Disponível em <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2731>

85. RODRIGUES MA, SILVA LA, SALVADORI DM, DE CAMARGO JL, MONTENEGRO MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**. 35(3):351-5. 2002. Disponível em doi: 10.1590/s0100-879x2002000300010. PMID: 11887213.
86. MINZER, S.; ESTRUCH, R.; CASAS, R. Wine Intake in the Framework of a Mediterranean Diet and Chronic Non-Communicable Diseases: A Short Literature Review of the Last 5 Years. **Molecules**. 25, 5045. 2020.
87. BENETOU V., LAGIOU A., LAGIOU P. Chemoprevention of cancer: Current evidence and future prospects. **F1000 Research**.;4:916. 2015. Disponível em doi: 10.12688/f1000research.6684.1.
88. WOOD AM, KAPTOGE S, BUTTERWORTH AS, WILLEIT P, WARNAKULA S, BOLTON T, PAIGE E, PAUL DS, SWEETING M, BURGESS S, BELL S, ASTLE W, STEVENS D, KOULMAN A, SELMER RM, VERSCHUREN WMM, SATO S, NJØLSTAD I, WOODWARD M, SALOMAA V, NORDESTGAARD BG, YEAP BB, FLETCHER A, MELANDER O, KULLER LH, BALKAU B, MARMOT M, KOENIG W, CASIGLIA E, COOPER C, ARNDT V, FRANCO OH, WENNBERG P, GALLACHER J, DE LA CÁMARA AG, VÖLZKE H, DAHM CC, DALE CE, BERGMANN MM, CRESPO CJ, VAN DER SCHOUW YT, KAAKS R, SIMONS LA, LAGIOU P, SCHOUFOUR JD, BOER JMA, KEY TJ, RODRIGUEZ B, MORENO-IRIBAS C, DAVIDSON KW, TAYLOR JO, SACERDOTE C, WALLACE RB, QUIROS JR, TUMINO R, BLAZER DG 2ND, LINNEBERG A, DAIMON M, PANICO S, HOWARD B, SKEIE G, STRANDBERG T, WEIDERPASS E, NIETERT PJ, PSATY BM, KROMHOUT D, SALAMANCA-FERNANDEZ E, KIECHL S, KRUMHOLZ HM, GRIONI S, PALLI D, HUERTA JM, PRICE J, SUNDSTRÖM J, ARRIOLA L, ARIMA H, TRAVIS RC, PANAGIOTAKOS DB, KARAKATSANI A, TRICHOPOULOU A,

KÜHN T, GROBBEE DE, BARRETT-CONNOR E, VAN SCHOOR N, BOEING H, OVERVAD K, KAUKANEN J, WAREHAM N, LANGENBERG C, FOROUHI N, WENNBERG M, DESPRÉS JP, CUSHMAN M, COOPER JA, RODRIGUEZ CJ, SAKURAI M, SHAW JE, KNUIMAN M, VOORTMAN T, MEISINGER C, TJØNNELAND A, BRENNER H, PALMIERI L, DALLONGEVILLE J, BRUNNER EJ, ASSMANN G, TREVISAN M, GILLUM RF, FORD I, SATTAR N, LAZO M, THOMPSON SG, FERRARI P, LEON DA, SMITH GD, PETO R, JACKSON R, BANKS E, DI ANGELANTONIO E, DANESH J; Emerging Risk Factors Collaboration/EPIC-CVD/UK Biobank Alcohol Study Group. Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies. **Lancet.** ;391(10129):1513-1523. 2018. Disponível em doi: 10.1016/S0140-6736(18)30134-X. Erratum in: *Lancet*. 2018 Jun 2;391(10136):2212. PMID: 29676281; PMCID: PMC5899998.

89. ELVAS F, VANDEN BERGHE T, ADRIAENSSENS Y, VANDENABEELE P, AUGUSTYNS K, STAELENS S, STROOBANTS S, VAN DER VEKEN P, WYFFELS L. Caspase-3 probes for PET imaging of apoptotic tumor response to anticancer therapy. **Org Biomol Chem.**;17(19):4801-4824. 2019. Disponível em doi: 10.1039/c9ob00657e. PMID: 31033991.
90. REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med.**; 49(11):1603-16. 2010. Disponível em doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20840865; PMCID: PMC2990475.
91. CHEN WC, LIU Q, FU JX, KANG SY. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, 2004.
92. HAN C, DAN, MATTHEW J. COOPER, PATRICIA C. COGSWELL, et al. Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. **Genes Dev**, 2008.

93. AGGARWAL BB, GEHLOT P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr Opin Pharmacol.**;9:351–369, 2009.
94. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2013). OIV WORLD VITINICULTURAL STATISTICS 2013-2014. Available from: <<http://www.oiv.int/oiv/info/esplublicationoiv>> Acesso em Dez, 2022.
95. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2021). STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021. Available from: <<http://www.oiv.int/oiv/info/esplublicationoiv>> Dijon. OIV 2022. Acesso em Dez, 2022.
96. Consumer Markets Insights of Grape Juice – Worldwide. Statista - The Statistics Portal, Statista, <https://www.statista.com/outlook/cmo/non-alcoholic-drinks/juices/grape-juice/worldwide#volume>. Acessado em Dez, 2022.
97. Uvibra/Consevitis-RS. <https://www.uvibraconsevitis-rs.com.br/pt/noticias/genuino-e-democratico-suco-de-uva-cresce-e-conquista-mercados#:~:text=A%20safra%202020%20coroa%20o,do%20suco%20pronto%20para%20beber>. Acesso em Jan, 2023.
98. FERNÁNDEZ-CRUZ, E.; CERESO, A.B.; CANTOS-VILLAR, E.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Time course of l-tryptophan metabolites when fermenting natural grape musts: Effect of inoculation treatments and cultivar on the occurrence of melatonin and related indolic compounds. **Aust. J. Grape Wine Res.** 25, 92–100. 2019.
99. BAAR MP, BRANDT RM, PUTAVET DA, KLEIN JD, DERKS KW, BOURGEOIS BR, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. **Cell.** 169: 132–147. 2017. Disponível em doi: 10.1016/j.cell.2017.02.031

100. MAURIN, N., FORGUE-LAFITTE, M.-E., LEVY, P., ZIMBER, A. AND BARA, J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, 120: 477-483. 2007. Disponível em <https://doi.org/10.1002/ijc.22302>
101. RUF J.C. Overview of epidemiological studies on wine, health and mortality. **Drugs Exp. Clin. Res.**;29:173–179, 2003.
102. ESTRUCH R., LAMUELA-RAVENTOS R.M. Alcohol, wine and cardiovascular disease, two sides of the same coin. **Intern. Emerg. Med.** 5:277–279, 2010. Disponível em doi: 10.1007/s11739-010-0391-8.
103. Editorial Nature. Focus Issue: The Future Of Cancer Research. **Nature Medicine volume 28**, page 601, 2022.
104. CARDOSO JFR., COHEN C., JORDÃO JR. AA, VANNUCHI H., GARCIA SB., ZUCOLOTTO S. Light and Moderate Doses of Ethanol in Chemical Carcinogenesis of the Colon in Rats. **Nutrition and Cancer**; 63 (7): 1029-1035, 2011.
105. HUANG Z, FENG Y. Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced  $\beta$ -Catenin Signaling in Endothelial Cells. **Oncol Res.**;25:651–661, 2017.
106. JANJI B, BERCHEM G, CHOUAIB S. Targeting Autophagy in the Tumor Microenvironment: New Challenges and Opportunities for Regulating Tumor Immunity. **Front Immunol**;9:887, 2018.
107. GARCIA SB, PARK HS, NOVELLI M, WRIGHT NA. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. **J Pathol**; 187(1):61-81. 1999. Disponível em doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<61::AID-PATH247>3.0.CO;2-I. PMID: 10341707.
108. YAMADA Y, YOSHIMI N, HIROSE Y, KAWABATA K, MATSUNAGA K, SHIMIZU M, et al. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations

of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res**, 2000.

109. MORI H, YAMADA Y, KUNO T, HIROSE Y. Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mutat Res**, 2004.
110. AKSHAY K. GUPTA, THERESA P. PRETLOW, and ROBERT E. SCHOEN. Aberrant Crypt Foci: What We Know and What We Need to Know. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, 2007.
111. NARISAWA T, SATO T, HAYAKAWA M, SAKUMA A, NAKANO H. Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Gann**, 1971.
112. MAURIN, N., FORGUE-LAFITTE, M.-E., LEVY, P., ZIMBER, A. AND BARA, J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, 120: 477-483. 2007. Disponível em <https://doi.org/10.1002/ijc.22302>
113. BARDELLI A, CAHILL DP, LEDERER G, SPEICHER MR, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, LENGAUER C. Carcinogen-specific induction of genetic instability. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001.
114. CAMPANHOLO VM, SILVA RM, SILVA TD, NETO RA, PAIOTTI AP, RIBEIRO DA, FORONES NM. Oral concentrated grape juice suppresses expression of NF-kappa B, TNF- $\alpha$  and iNOS in experimentally induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Asian Pac J Cancer Prev.**;16(3):947-52. 2015. Disponível em doi: 10.7314/apjcp.2015.16.3.947. PMID: 25735387.
115. V.V. LAO, W.M. GRADY. Epigenetics and colorectal cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 8 p. 686, 2011.



116. E.N. MOJARAD, P.J. KUPPEN, H.A. AGHDAEI, M.R. ZALI. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, 6. 2013
117. QIYU TIAN, ZHIXIN XU, XIAOFEI SUN, JEANENE DEAVILA, MIN DU, MEIJUN ZHU, Grape pomace inhibits colon carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing epigenetic modifications, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Volume 84, 2020
118. VARELA-REY M, WOODHOO A, MARTINEZ-CHANTAR ML, MATO JM, LU SC. Alcohol, DNA methylation, and cancer. **Alcohol Res**; 35(1):25-35, 2013.
119. OTORI K, SUGIYAMA K, HASEBE T, et al. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. **Cancer Res**;55:4743–4746, 1995.
120. ORŁOWSKA J, KIEDROWSKI M. Serrated adenomas, hyperplastic polyposis and carcinoma of the colorectum. **Borgis – Postępy Nauk Medycznych**. 2:111–117, 2009.
121. JASS JR, YOUNG J, LEGGETT BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. **Histopathology**.;37:295–301, 2000. Disponível em doi: 10.1046/j.1365-2559.2000.01028.x.
122. JASS JR, IINO H, RUSZKIEWICZ A, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathway in hyperplastic polyposis of the colorectum. **Gut**.;47:43–49, 2000. Disponível em doi: 10.1136/gut.47.1.43
123. HAMILTON SR. Origin of colorectal cancers in hyperplastic polyps and serrated adenomas: another truism bites the dust. **J Natl Cancer Inst**.;93(17):1282–1283, 2001. Disponível em doi: 10.1093/jnci/93.17.1282.
124. KOWALCZYK M, ORŁOWSKI M, KLEPACKI Ł, et al. Rectal aberrant crypt foci (ACF) as a predictor of benign and malignant neoplastic lesions in the

large intestine. **BMC Cancer**.;20(1):133. 2020. Disponível em doi:10.1186/s12885-020-6590-4

125. SUNDOV Z, TOMIC S, VILOVIC K, KUNAC N, KALEBIC M AND BEZIC J: Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Dukes' B colon cancer. **Croat Med J** 49: 636-642, 2008.
126. RAO R.K. Commentary: Acetaldehyde and epithelial-to-mesenchymal transition in colon. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**; 38:309–311, 2014. Disponível em doi: 10.1111/acer.12295.
127. NA HK, LEE JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. **Int J Mol Sci.**;18(6):1116, 2017. Disponível em doi: 10.3390/ijms18061116. PMID: 28538665; PMCID: PMC5485940.
128. HU L, LI H, ZI M, et al. Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. **Front Cell Dev Biol.**;10:822816, 2022. Disponível em doi:10.3389/fcell.2022.822816
129. CHILDS B. G., GLUSCEVIC M., BAKER D. J., LABERGE R.-M., MARQUESS D., DANANBERG J., et al. Senescent Cells: an Emerging Target for Diseases of Ageing. **Nat. Rev. Drug Discov.** 16, 718–735. 2017. Disponível em 10.1038/nrd.2017.116
130. KIRKLAND J. L., TCHKONIA T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. **EBioMedicine** 21, 21–28, 2017. Disponível em 10.1016/j.ebiom.2017.04.013
131. NIEDERNHOFER L. J., ROBBINS P. D. Senotherapeutics for Healthy Ageing. **Nat. Rev. Drug Discov.** 17, 377. 2018, Disponível em 10.1038/nrd.2018.44
132. LAURA I. GAVRILAS.; CORINA IONESCU.; OANA TUDORAN.; COSMIN LISENCU.; OVIDIU BALACESCU AND DOINA MIERE. The Role of Bioactive

Dietary Components in Modulating miRNA Expression in Colorectal Cancer. **Nutrients**, 8, 590, 2016. Disponível em doi:10.3390/nu8100590

133. ZHU Y, TCHKONIA T, PIRTSKHALAVA T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. **Aging Cell.**;14(4):644-658, 2015. Disponível em doi:10.1111/accel.12344
134. ZISIS TOULOUKIS, ANDREAS LAZARIS, JOHN GRINIATSOS. The prognostic significance of Caspase-3 and survivin expression in colorectal cancer patients. **JBUON**; 25(5): 2160-2170, 2020.
135. MCILWAIN D. R., BERGER T., MAK T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspect. Biol.** 5, a008656, 2013.
136. UNRUHE B., SCHRÖDER E., WÜNSCH D., KNAUER S. K. An Old Flame Never Dies: Survivin in Cancer and Cellular Senescence. **Gerontology** 62, 173–181. 2016. Disponível em doi: 10.1159/000432398
137. WEI-CHANG CHEN, QIANG LIU, JIAN-XIN FU, SU-YA KANG. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**;10(19):2886-2889, 2004.
138. RONNOV-JESSEN L, PETERSEN OW, BISSELL MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiol Rev.**; 76:69–125, 1996.
139. THOMAS SS, MAKAR KW, LI L, et al. Tissue-specific patterns of gene expression in the epithelium and stroma of normal colon in healthy individuals in an aspirin intervention trial. **BMC Med Genet.**;16:18. 2015 Disponível em doi:10.1186/s12881-015-0161-6
140. MOBAHAT M., NARENDRAN A., RIABOWOL K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. **Int. J. Mol. Sci.**; 15:2494–2516, 2014. Disponível em doi: 10.3390/ijms15022494.

141. PARK D.S., HWANG K.E., SHIM H., KIM B.R., CHOI K.H., PARK S.H., PARK S.D., JEONG E.T., KIM H.R. Elevated survivin is associated with a poor response to chemotherapy and reduced survival in lung cancer with malignant pleural effusions. **Clin. Exp. Metastasis**. 29:83–89, 2012.
142. SANTA CRUZ GUINDALINI R., MATHIAS MACHADO M.C., GARICOCHEA B. Monitoring survivin expression in cancer: Implications for prognosis and therapy. **Mol. Diagn. Ther.** 17:331–342, 2013. Disponível em doi: 10.1007/s40291-013-0048-1
143. WONG WM, GARCIA SB & WRIGHT NA. Origins and morphogenesis of colorectal neoplasms. **APMIS**; 107:535-44, 1999.
144. HERNANDEZ JM, FARMA JM, COPPOLA D, et al. Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. **Clin Colorectal Cancer**.;10(3):188-193, 2011. Disponível em doi:10.1016/j.clcc.2011.03.014
145. POTHURAJU R, RACHAGANI S, KRISHN SR, et al. Molecular implications of MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance. **Mol Cancer**. 2020;19(1):37, 2020 Disponível em doi:10.1186/s12943-020-01156-y
146. JONCKHEERE N, SKRYPEK N, VAN SEUNINGEN I. Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. **Biochim Biophys Acta**. 1846;:142–151, 2014.
147. KOH FURUTA, MARIANNA ZAHURAK, XIAO-LING YANG, CECILIA ROSADA, STEVEN N. GOODMAN, J. THOMAS AUGUST, AND STANLEY R. HAMILTON. Relationship between CD44 Expression and Cell Proliferation in Epithelium and Stroma of Colorectal Neoplasms. **American Journal of Pathology**, Vol. 149, No. 4,1996.
148. PENTEK T, NEWENHOUSE E, O'BRIEN B, CHAUHAN AS. Development of a topical resveratrol formulation for commercial applications using

- dendrimer nanotechnology. **Molecules**.; 22:137, 2017. Disponível em doi: 10.3390/molecules22010137
149. LIU Q, GUAN J, SUN Z, SHEN X, LI L, JIN L, et al. Influence of stabilizer type and concentration on the lung deposition and retention of resveratrol nanosuspension-in-microparticles. **Int J Pharm.**;569:118562, 2019.
150. VALLIANOU NG, EVANGELOPOULOS AA, GELADARI EV, KAZAZIS CE. Resveratrol and cancer. **Hosp Chron.** 2015;
151. CHITRA RAJAGOPAL, MANENDRA BABU LANKADASARI, JESIL MATHEW ARANJANI, K.B. HARIKUMAR, Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: A novel approach for cancer therapy, **Pharmacological Research**, Volume 130, Pages 273-291, 2018.
152. KUMAR A, KURMI BD, SINGH A, SINGH D. Potential role of resveratrol and its nano-formulation as anti-cancer agent. **Explor Target Antitumor Ther.**;3(5):643-658, 2022. Disponível em doi:10.37349/etat.2022.00105
153. RATNA, A.; MANDREKAR, P. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. **Biomolecules**, 7, 61, 2017.
154. RUMGAY, H.; MURPHY, N.; FERRARI, P.; SOERJOMATARAM, I. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. **Nutrients**, 13, 31, 2021. Disponível em [https://doi.org/ 10.3390/nu13093173](https://doi.org/10.3390/nu13093173)
155. MIRIANA CARDANO, CARLA TRIBIOLI AND ENNIO PROSPERI. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as an Effective Strategy to Inhibit Tumor Cell Proliferation. **Current Cancer Drug Targets**, 20, 240-252, 2020,
156. QIYU TIAN, ZHIXIN XU, XIAOFEI SUN, JEANENE DEAVILA, MIN DU, MEIJUN ZHU. Grape pomace inhibits colon carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing epigenetic modifications, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Volume 84, 2020.

157. GAO Y, XIAO X, ZHANG C, YU W, GUO W, ZHANG Z, LI Z, FENG X, HAO J, ZHANG K, et al: Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B/iNOS signaling pathways. **J Pineal Res.** 62:e12380, 2017.
158. CHEN T, ZHANG X, ZHU G, et al. Quercetin inhibits TNF- $\alpha$  induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathway in vitro. **Medicine** (Baltimore).;99(38):e22241, 2020. Disponível em doi:10.1097/MD.00000000000022241
159. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective; Continuous Update Project Expert Report; 2018. Disponível em <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Summary-of-Third-Expert-Report-2018.pdf> (acessado em Dez/2023).
160. BEN, Q.;WANG, L.; LIU, J.; QIAN, A.;WANG, Q.; YUAN, Y. Alcohol drinking and the risk of colorectal adenoma: A dose–response meta-analysis. **Eur. J. Cancer Prev.**, 24, 286–295, 2015.
161. REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radic Biol Med.**;49(11):1603-1616, 2010. Disponível em doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
162. AZAD MB, CHEN Y, GIBSON SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. **Antioxid Redox Signal.**;11:777–790, 2009.
163. GONDA TA, TU S, WANG TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. **Cell Cycle.** 2009.

164. SHUKLA P.K., CHAUDHRY K.K., MIR H., GANGWAR R., YADAV N., MANDA B., MEENA A.S., RAO R. Chronic ethanol feeding promotes azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colonic tumorigenesis potentially by enhancing mucosal inflammation. **BMC Cancer.** ;16:189, 2016. Disponível em doi: 10.1186/s12885-016-2180-x.
165. NA HK, LEE JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. **Int J Mol Sci.**;18(6):1116, 2017. Disponível em doi: 10.3390/ijms18061116. PMID: 28538665; PMCID: PMC5485940.
166. WEERASINGHE A, SCHOUERI-MYCHASIW N, VALLANCE K. Improving knowledge that alcohol can cause cancer is associated with consumer support for alcohol policies: findings from a real-world alcohol labelling study. **Int J Environ Res Public Health.**;17:398, 2020.
167. PUROHIT V, BODE JC, BODE C, BRENNER DA, CHOUDHRY MA, HAMILTON F, KANG YJ, KESHAVARZIAN A, RAO R, SARTOR RB, SWANSON C, TURNER JR. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. **Alcohol**; 42: 349- 361, 2008.
168. SCHERNHAMMER ES, GIOVANNUCCI E, BABA Y, FUCHS CS, OGINO S. B vitamins, methionine and alcohol intake and risk of colon cancer in relation to BRAF mutation and CpG island methylator phenotype (CIMP). **PLoS One**; 6: e21102, 2011.
169. X.-Y. DIAO , T. PENG , F.-G. KONG , J.-G. HUANG , S. HAN , Y.-S. SHANG , H. LIU. Alcohol consumption promotes colorectal cancer by altering intestinal permeability. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences.** 2020.
170. RUMGAY, H.; SHIELD, K.; CHARVAT, H.; FERRARI, P.; SORNPAISARN, B.; OBOT, I.; ISLAMI, F.; LEMMENS, V.E.P.P.; REHM, J.; SOERJOMATARAM, I. Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol

consumption: A population-based study. **Lancet Oncol.**, 22, 1071–1080, 2021.

171. WANG M., MCINTEE E.J., CHENG G., SHI Y., VILLALTA P.W., HECHT S.S. Identification of DNA Adducts of Acetaldehyde. **Chem. Res. Toxicol.**;13:1149–1157, 2000. Disponível em doi: 10.1021/tx000118t.
172. BROOKS P.J., THERUVATHU J.A. DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol.**; 35:187–193, 2005. Disponível em doi: 10.1016/j.alcohol.2005.03.009.
173. YOUNGYO KIM, YOUJIN JE, EDWARD L. GIOVANNUCCI. Association between Alcohol Consumption and Survival in Colorectal Cancer: A Meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers.**; 28 (11): 1891–1901, 2019.
174. ZELL JÁ, MCELIGOT AJ, ZIOGAS A, HOLCOMBE RF, ANTON-CULVER H. Differential effects of wine consumption on colorectal cancer outcomes based on family history of the disease. **Nutr Cancer.** 2007
175. YOO JE, HAN K, SHIN DW, KIM D, KIM BS, CHUN S, JEON KH, JUNG W, PARK J, PARK JH, CHOI KS, KIM JS. Association Between Changes in Alcohol Consumption and Cancer Risk. **JAMA.**; 5(8):e2228544, 2022. Disponível em doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.28544. PMID: 36001313; PMCID: PMC9403779.
176. SCHNEIDER Y, VINCENT F, DURANTON B, BADOLO L, GOSSE F, BERGMANN C, ET AL. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters.**; 158:85–91, 2000.
177. YI W, FISCHER J, KREWER G, AKOH CC. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. **J Agric Food Chem**; 53:7320–9, 2005.



178. CARDOSO JFR; COHEN C; JORDÃO JR AA; VANNUCCHI H; GARCIA SB; ZUCOLOTO S. Light And Moderate Doses Of Ethanol In Chemical Carcinogenesis Of The Colon In Rats. **Nutrition And Cancer**. 2011.
179. MCLELLAN KR; BIRD RP. Aberrant crypts: Potential preneoplastic lesions in the murine colon. **Cancer Research**, 48: 6187-6192. 1988.
180. FISHBEIN A, HAMMOCK BD, SERHAN CN, PANIGRAHY D. Carcinogenesis: Failure Of Resolution Of Inflammation? **Pharmacol Ther**. 2021 Feb;218:107670. Doi: 10.1016/J.Pharmthera.2020.107670. Epub 2020.
181. SUNG B., PRASAD S., GUPTA S.C., PATCHVA S., AGGARWAL B.B. Regulation of Inflammation-Mediated Chronic Diseases by Botanicals. In: Shyur L.-F., editor. **Advances in Botanical Research: Recent trends in Medicinal Plants Research**. Volume 62. Academic Press; Oxford, UK: 2012.
182. PANICO A.M., CARDILE V., AVONDO S., GARUFI F., GENTILE B., PUGLIA C., BONINA F., SANTAGATI N.A., RONSISVALLE G. The in vitro effect of a lyophilized extract of wine obtained from jacquez grapes on human chondrocytes. **Phytomedicine**. ;13:522–526, 2006.
183. GEORGIEV V, ANANGA A, TSOLOVA V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**.;6(1):391-415, 2014 . Disponível em doi: 10.3390/nu6010391. PMID: 24451310; PMCID: PMC3916869.
184. NISHIUMI S., MUKAI R., ICHIYANAGI T., ASHIDA H. Suppression of lipopolysaccharide and galactosamine-induced hepatic inflammation by red grape pomace. **J. Agric. Food Chem**. 2012;
185. LI W.G., ZHANG X.Y., WU Y.J., TIAN X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. **Acta Pharmacol. Sin**. 2001;

## 9. ANEXOS

## 9.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### AUTORIZAÇÃO

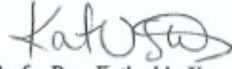
Certificamos que o projeto intitulado "*Efeitos do vinho, suco de uva e etanol no desenvolvimento de câncer de cólon em ratos*", registrado com o número do protocolo **045/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Sergio Britto Garcia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 30 de setembro de 2019.

Colaboradora: Stefania Bovo Minto

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07/12/2019 a 07/06/2020
Espécie/Linhagem	Rato / Wistar-OLD
Nº de animais	112
Peso/Idade	225g / 02 meses
Sexo	Macho
Origem	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2019

  
**Prof. Dra. Katiuchia Uzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

## 9.2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **EFFECTS OF WINE, GRAPE JUICE AND ALCOHOL ON EXPERIMENTAL COLONIC CARCINOGENESIS: A COMPARATIVE STUDY**

Cesar EF, Minto SB, Jordão A, Garcia SB

## ABSTRACT

The consumption of alcoholic beverages occurs on large scale in most countries of the world, despite ample evidence that alcohol intake leads to increased risk for various diseases. Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and there is strong evidence that its risk is increased by alcohol consumption. On the other hand, chemopreventive grape products and by-products have great health promoting properties mainly due to its polyphenolic compounds. These compounds may modulate multiple signaling pathways involved in cell proliferation, apoptosis and inflammation. However, it is still unclear whether presence of alcohol in wine could hinder the beneficial properties of the grape compounds or not. We the aim of contributing to the understanding of this issue have induced colon carcinogenesis in rats by rectal application of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and treated groups of animals with wine, grape juice, alcohol and grape juice plus alcohol. In sequence, we evaluated the carcinogenesis process by quantifying the preneoplastic lesions called aberrant crypt foci and estimating their size. The analysis of oxidative by evaluation of MDA and GSH in the colon was also evaluated as well as immunohistochemical markers of cell proliferation, apoptosis and inflammation parameters. As results we found that grape juice potently was associated with a reduction in the number and size of aberrant crypt foci, while alcohol increased them. Alcohol also caused an increase in oxidative stress parameters that was not counterbalanced by grape juice or wine compounds. Furthermore, grape juice inhibited the increase in cell proliferation induced by the MNNG, promoted apoptosis through CASP-3 activation and inhibition of the Akt/Surv pathway, as well as reduced the expression of the inflammatory molecule NFkB. Alcohol alone presented opposite effects and avoided the anti-carcinogenic roles of the grape-derived compounds either present in the grape juice or in the wine. We postulate that this occurred due to its pro-inflammatory action, demonstrated by the increased expression of NFkB. In conclusion, alcohol increased oxidative stress and promoted carcinogenesis, while grape juice had opposite effects. Both red wine and grape juice added to alcohol presented neutral effects on colonic carcinogenesis.

**Keywords:** Wine Juice, Red Wine, Carcinogenesis, Colorectal Carcinoma, Chemoprevention, Inflammation, Apoptosis

## INTRODUCTION

The consumption of alcoholic beverages occurs on large scale in most countries of the world, despite ample evidence that alcohol intake leads to increased risk for various diseases. For example, a cross-sectional study estimates that 1 in 8 total deaths among US adults aged 20 to 64 years were attributable to excessive alcohol use, including 1 in 5 deaths among adults aged 20 to 49 years (Esser et al., 2022). The World Health Organizations (WHO) has recently stated that “the harmful use of alcohol causes approximately 3 million deaths every year and the overall burden of disease and injuries attributable to alcohol consumption remains unacceptably high”. Alcohol consumption is associated with increased risk for various types of cancer, including colon cancer, as observed both in epidemiological (Roswall & Weiderpass, 2015; Vanella et al., 2019) and experimental studies (Hayashi et al., 2007; Roy et al., 2002).

Wine is one of the most consumed drinks that contains alcohol and its consumption has strong and spread cultural roots, making it important to deep the understanding of its biological and health effects. There are various studies indicating that the wine consumption could present general beneficial health effects and reduced mortality from all causes (Arranz et al., 2012; Hrelia et al., 2022; Renaud et al., 1999; Ruf, 2003). Some studies have associated the wine consumption to a possible reduction of the risk for various types of cancer, including the colonic cancer (Bianchini & Vainio, 2003). These beneficial effects of wine have been attributed to its large content of polyphenols, mainly the resveratrol (Vernousfaderani et al., 2021). Polyphenols have a broad spectrum of biological actions such as reduction of DNA oxidative damage (Giovannelli et al., 2000), anti-inflammatory and anti-angiogenic activities which can help with an anti-carcinogenic effect (Yang et al., 2001; Soleas et al., 2001). However, an eventual chemopreventive of wine against colonic carcinogenesis remains controversial, with a number of studies showing opposite results (Xu et al., 2019).

In fact, the main scientific question regarding to the effects of wine in cancer risk seems to be whether the known increase in cancer risk linked to alcohol outweighs or not the also known benefits of the polyphenols present in wine. The objective of this study is to contribute to appropriately answering of this question with new experimental data. Thus, we have induced colon carcinogenesis in rats by rectal application of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). In sequence, we treated groups of animals with wine, grape juice, alcohol and grape juice plus alcohol and evaluated the carcinogenesis process by quantifying the preneoplastic lesions called aberrant crypt foci. The analysis of oxidative by evaluation of MDA and GSH in the colon was also evaluated as well as immunohistochemical markers of cell proliferation, apoptosis and inflammation parameters.

## **MATERIAL AND METHODS**

Eighty male Wistar rats ( $150 \pm 20$ g) were housed in controlled environment within plastic cages (55% humidity, 12-h light/dark cycle, and  $22^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), in a number of eight rats per cage and were acclimated for 1 week before starting the experiments. Then, they were randomly divided into the ten experimental groups of study. All the rats were fed a standard Purina® diet for rats and mice and tap water ad libitum. All experiments were performed according to the protocol approved by the Ethical Committee in Animal Care and Use at the Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (#045/2019).

### **Chemical experimental model of colonic carcinogenesis**

The chemical carcinogen N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) was used to induce the colonic carcinogenesis process due to its topical administration and for not being metabolized by the liver, avoiding any possible side effect. The MNNG was diluted in distilled water at the day of the experiment, avoiding its oxidative process. The male Wistar rats received a singlerectal instillation of MNNG (60 mg/Kg; 1mL - enema)<sup>(23)</sup>.

## **Collection and processing of colonic samples**

At the end of the experimental period, all the rats were euthanized in a carbon dioxide chamber. Median laparotomy was performed, with further isolation and removal of the distal colon. Then, the colon samples were opened by their mesenteric border, cleaned up with 0.9% NaCl solution and laid out gently on a glass petri dish. Samples were divided into snap-frozen (liquid nitrogen,  $-196^{\circ}\text{C}$ ) and fixed (4% paraformaldehyde), for further oxidative stress and histopathological/immunohistochemical analysis. Thus, to perform the histological cuts the samples were placed between two filter papers inside histological cassettes and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde (72 hours). Once fixed, samples were exposed to an increasing dehydration process by using crescent alcohol concentrations. Then, the colons were immersed into 100% xylol baths for diaphanization. After that process, colonic samples were embedded in paraffin baths, so the histological cuts could be performed. By using a microtome, the paraffin blocks containing the samples were cut at  $4\mu\text{m}$  thickness and adhered to silanized slides posteriorly storage at 60 Celsius degree to optimize the material adhesion to the slide. Prior the H.E. staining or IHC technique, the slides were deparaffinized and hydrated. Finally, the material was exposed to vaporization in a Citrate buffer solution (pH 6.0), so the antigenic recovery could occur.

## **Histopathological analysis**

The carcinogenesis process in the colon was inferred by the estimation of dysplastic crypts in *en face* preparations of colon samples. Thus, the samples were stained with hematoxylin and eosin according to our previous description<sup>(8)</sup>. To avoid observer bias, all slides were coded before microscopic analysis (Leica DM 2500; Leica Mikrosysteme Vertrieb, Germany; equipped with Leica DC 300 FX camera).

Aberrant crypt foci (ACF) were identified at  $20\times$  magnification and their morphometry was performed with Leica Application Suite (LAS) version 3.7 software, which determined colonic area automatically. Relative values for ACF were calculated as their total number per colonic sample areas ( $\text{cm}^2$  or  $\text{mm}^2$ ).



The normal crypts length and the mean number of apoptotic bodies were also evaluated in H&E sections and 100 crypts were evaluated per animal.

### **Colonic oxidative stress analysis**

The colonic oxidative stress was evaluated by the measurement of malondialdehyde (MDA) levels by spectrophotometry, as proposed by literature<sup>(28)</sup>, with some adaptations. For MDA dosage, colonic sample (200mg) was homogenized with 0.2M phosphate buffer pH 7.4 (1mL). Then, 200µL was transferred to an Eppendorf® tube, together with 1-methyl-phenylindole solution (650µL) and 150 µL of 37% hydrochloric acid (HCl). After shaking, the tubes were incubated in water-bath (45°C; 40 minutes). Then, the colonic samples were centrifuged (4000 rpm; 10 minutes).

The absorbance was read from the supernatant at a wavelength of 586nm in a SpectraMax® M5 with SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). The absorbance values were standardized by the equation of the reaction curve. Then, all the values were corrected for the protein concentration rate, with result being expressed in nmol/mg.

### **Immunohistochemistry analysis**

The immunohistochemical technique was performed through the antigen antibody reaction, followed by DAB (diaminobenzidine) reaction. All the slides were deparaffinized and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol to water. Antigen retrieval was performing by using citrate buffer pH 6.0 during 20 minutes. To inhibit tissue peroxidases, 3% hydrogen peroxide was added on the slides. Normal horse serum was used to block nonspecific immunostaining. Then, all the slides were incubated with the following primary antibodies: anti-Caspase-3 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK.®, clone JHM62 - 1:300); iPCNA (Novocastra®, Novocastra Laboratories Ltd,UK, clone PC10 - 1:100); anti-NFKB p65 (RabMab® technology, Abcam Lab, UK, clone E379 - 1:300); p-AKT 1/2/3

(Santa Cruz Biotechnoly, Inc. USA, clone sc-7985-R - 1:300); survivin (D8) (Santa Cruz Biotechnoly, Inc. USA, clone sc-17779 - 1:100), todos incubados por 12 horas (over night) em câmara úmida. Proliferation was determined as the ratio between stained and unstained cells in colonic crypts.

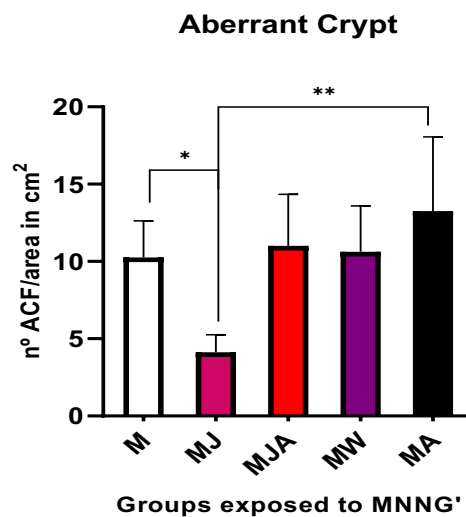
### **Statistical Analysis**

Data were analyzed using a GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). One-way ANOVA test (Tukey's post hoc test) was applied for comparisons between all the groups of study. The T test (Mann-Whitney) was applied to calculate the difference between two groups.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. All values are expressed as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS

As expected, we have found that the carcinogen MNNG induced the formation of aberrant crypt foci (ACF). The MS group presented the lowest rate of ACF formation among all groups that received carcinogen, with statistical significance ( $P < 0.01$ ). The treatments with wine or alcohol, added or not to the grape juice did not induce statistically differences in the formation of ACF in comparison with the control MNNG-treated group (Figure 1).

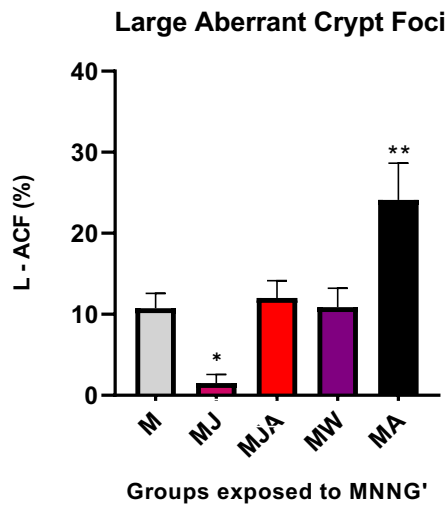
**Figure 1.**



**Figure 1. Number of Aberrant Crypt Foci (ACF).** The groups containing alcohol in their composition showed no statistical difference between them (MJAxMWxMA -  $P > 0.05$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SD, one-way analysis (one-way ANOVA) followed by Tukey's post-test \*  $P < 0.01$ ; \*\*  $P < 0.001$ .

It was noted that the MJ group showed a lower level of formation of large aberrant crypt foci (L-ACF) in relation to the other groups treated with MNNG (groups M, MJA, MW and MA ( $P < 0.01$ )) (Figure 2). On the other hand, the treatment with alcohol alone (MA group) caused a statistically significant increase in number of L-ACF when compared to all the other groups exposed to MNNG ( $P < 0.01$ ).

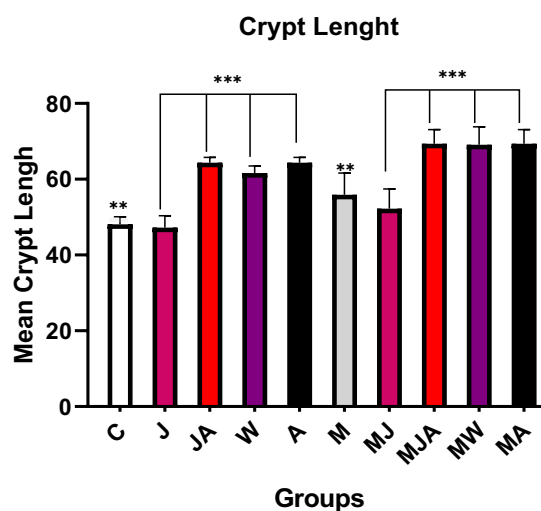
Figure 2.



**Figure 2. Large aberrant crypt foci (L-ACF).** Quantitative analysis of large ACF (L-ACF), that were defined as ACF with three or more crypts or with one or more crypts with the diameter bigger than the mean size of two crypts. Grape juice significantly reduced the formation of ACF (MJ). The MA group had the highest percentage of FCA-G. Data are presented as mean  $\pm$  SD, one-way analysis (one-way ANOVA) followed by Tukey post-test \*  $P < 0.01$  \*\*  $P < 0.001$ .

Separately, both the exposure to MNNG or alcohol have led to an increase in colonic crypt length (CxM  $P < 0.01$ ) but no summatory effect of them was observed (Figure 3).

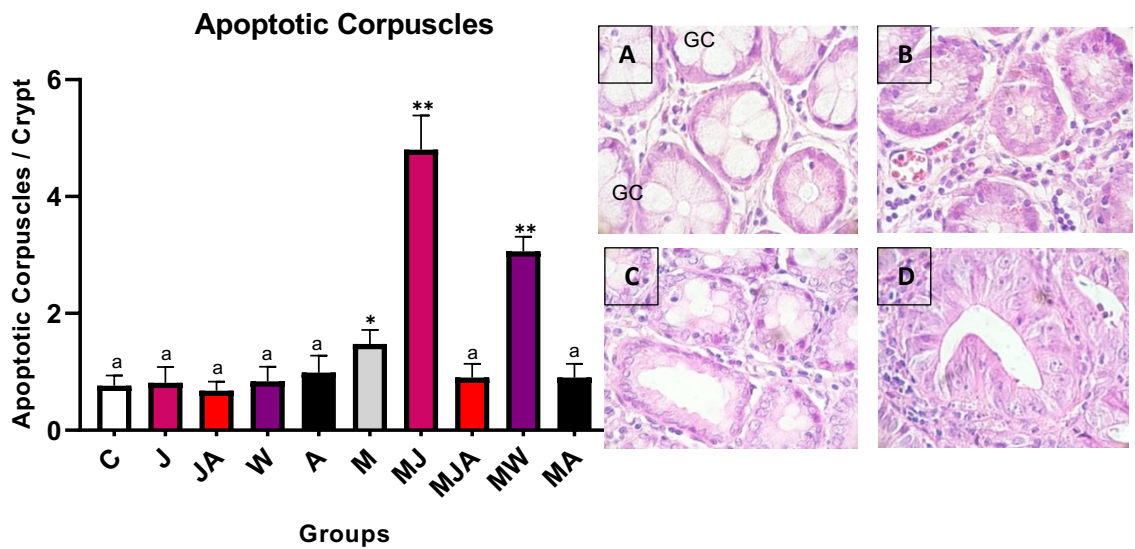
Figure 3.



**Figure 3. Crypt length measured by the mean number of cells per hemi-crypt.** Data are presented as mean  $\pm$  SD, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ .

As shown in figure 4, both grape juice and red wine generated a statistically significant higher number of apoptotic bodies (AB) in those groups exposed to MNNG. The MJ group had the highest number of CoAp per crypt among all groups ( $P < 0.001$ ).

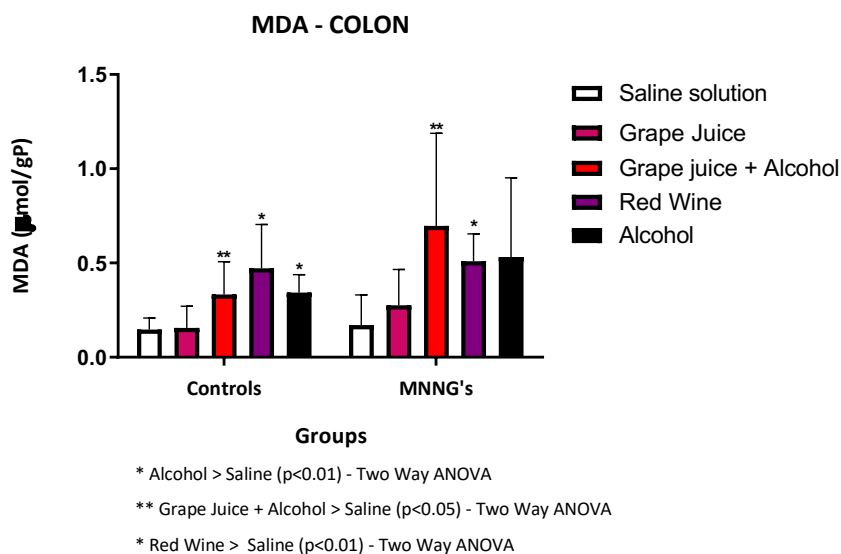
**Figure 4.**



**Figure 4. Apoptotic corpuscles expressed in CRC tissue and normal tissue.** Hematoxylin & Eosin staining exemplifying normal crypts (A) and dysplastic crypts (B, C and D) under different effects of grape juice (B) and alcohol (D). A) Control group (C) - showing normal crypts with goblet cells (GC), B) MJ group - showing apoptotic bodies (arrows), C) M group showing aberrant crypt formation and; D) MA group - demonstrates synergistic effect between alcohol and exposure to MNNG in the formation of large aberrant crypt.

There was statistically significant increased levels of MDA in all groups of animals that received alcohol, either pure, added to grape juice or as a component of red wine (Groups A, JA and Group W) as shown in Figure 5 in all groups that received it.

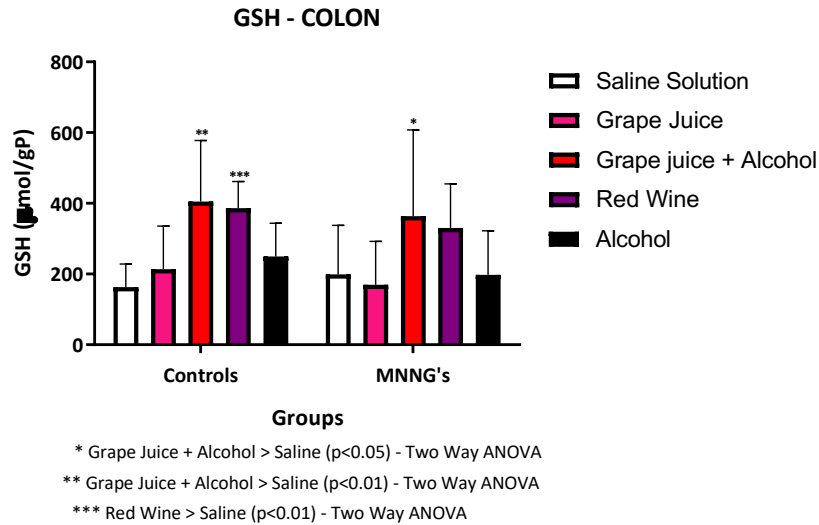
Figure 5.



**Figure 5. Quantitative analysis of MDA in colonic tissue.** Presence of alcohol promoted greater production of MDA compared to groups that not received alcoholic solutions (CxA; CxW P<0.01; CxJA P<0.05).

Regarding GSH production, both the grape juice and red wine were able to increase its concentration, what did not occur with the alcohol alone treatment. The control groups that received grape juice and red wine showed a statistically significant increase in GSH production (Figure 6) (P<0.01), demonstrating the induction of antioxidant capability of the compounds present in the grape. In the groups exposed to the carcinogen, there was a trend towards an increase in the production of GSH in the colon of those who received solutions containing grape compounds, however, there was no statistically significant difference (P>0.05) between the groups (Figure 6).

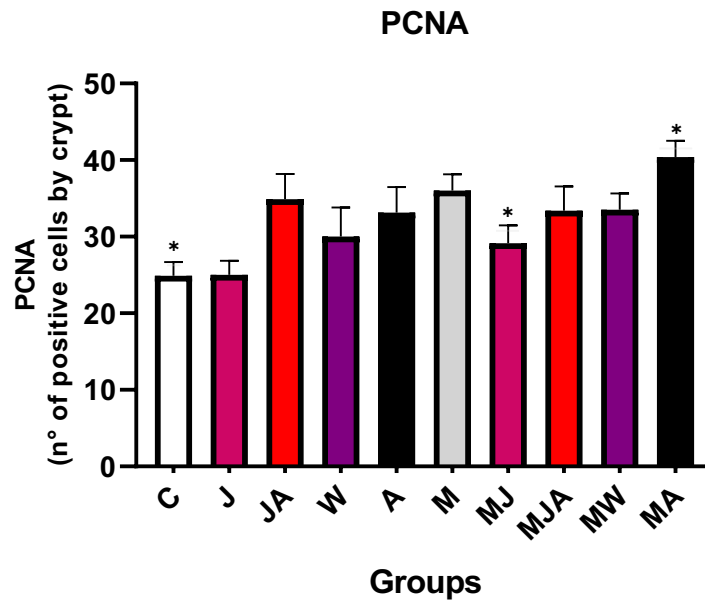
Figure 6.



**Figure 6. Quantitative analysis of GSH concentration in colonic tissue.** Groups that received solutions containing grape-derived products showed a greater antioxidant effect with an increase in GSH (CxJA; CxW P<0.01). Data are shown as mean  $\pm$  SD, two-way ANOVA.

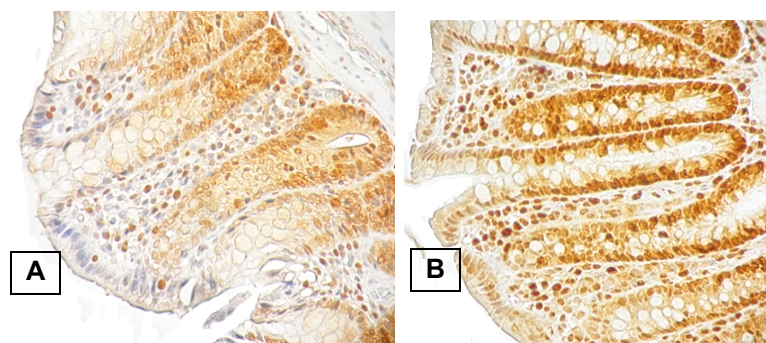
All the groups that received alcohol showed a greater number of cells positively stained for PCNA (Figure 7). Group M showed a statistically significant higher expression of PCNA compared to group C, corroborating the carcinogenic effect of MNNG. When comparing the M group to the MJ group, it is noted that the grape juice had lower levels of PCNA staining (MxMJ P<0.001). The group exposed to the carcinogen and that also received alcohol showed the highest degree of cell proliferation (P<0.001), showing a synergism between these two chemical agents.

**Figure 7.**



**Figure 7. Number of cells with PCNA.** Immunohistochemical staining per crypt of colonic tissue section. Positive PCNA staining represents proliferating cells. Data are presented as mean  $\pm$  SD, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test \*  $P < 0.001$

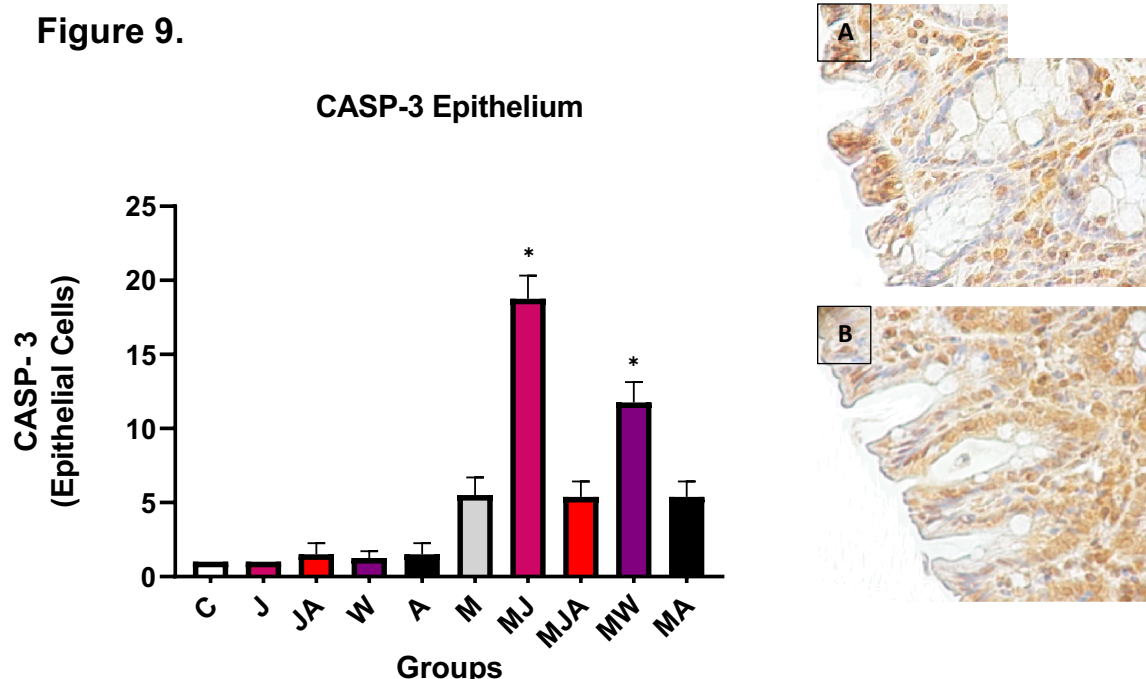
Figure 8 shows the difference in the PCNA staining in the crypts of the control group (Group C in 8A) with little positivity compared to the group exposed to MNNG (Group M in 8B), which reached the top of the crypts.



**Figure 8. PCNA staining in the colon of rats.** Immunohistochemical staining per crypt of colonic tissue section. Positive PCNA staining represents proliferating cells. Data are presented as mean  $\pm$  SD, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test \*  $P < 0.001$



The evaluation of CASP-3 expression showed that the MJ Group had a higher number of cells immunostained for CASP-3 ( $P < 0.001$ ), when compared to the other groups exposed to the carcinogen (Figure 9). Immunohistochemical analysis shows control group with a lower number of positive epithelial cells for CASP-3 (9A) and the MJ group with an increase in the number of epithelial cells positively marked for CASP-3 (9B).

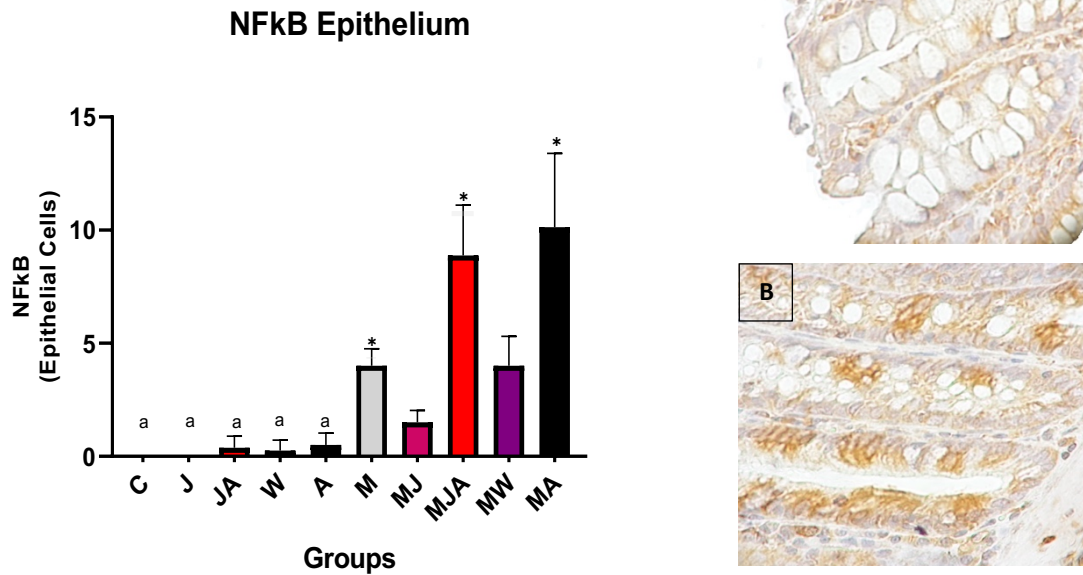


**Figure 9. Caspase 3 (CASP-3) expression in CRC tissue epithelium and normal tissue. Photomicrograph: Caspase-3 immunostaining. A) Control Group - lower number of positive cells for CASP-3. B) MJ group - increase in the number of cells immunostained for CASP-3 observed by cytoplasmic brown staining.**

There was an evident marked immunostaining for NFkB in the groups that were exposed to the carcinogen (M, MJ, MJA, MW and MA) ( $P < 0.001$ ). Moreover, both in the group exposed to the carcinogen that received a solution of grape juice + alcohol (MJA Group) and in the group that received only alcohol (MA), a statistically significant increase in NFkB expression was observed (Figure 10) ( $P < 0.001$ ). Furthermore, red wine (Group MW) showed no statistical difference in relation to the carcinogen group (Group M) ( $P > 0.05$ ). On the other hand, it is noted that the grape juice exposed to MNNG (MJ Group) showed lower NFkB

expression compared to the other groups that were exposed to the carcinogen ( $P < 0.001$ ).

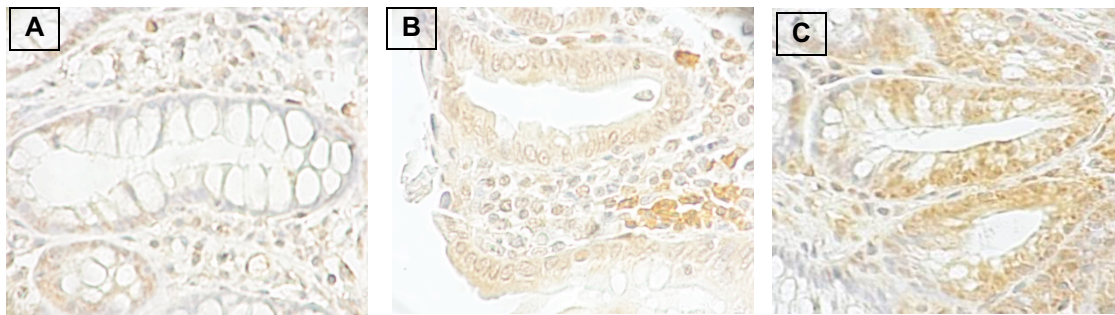
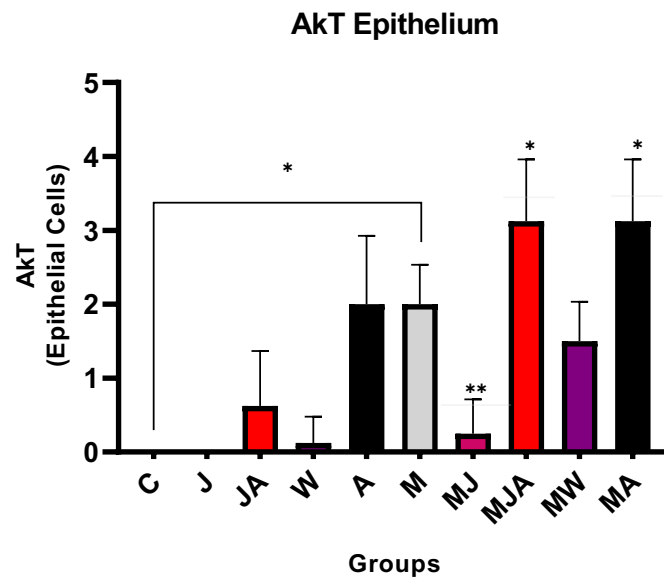
**Figure 10.**



**Figure 10. NFkB expression in CRC tissue epithelium and normal tissue Photomicrograph:** Immunostaining for NFkB. A) Control Group - lower number of positive cells for NFkB. B) MJA group - increase in the number of cells immunostained for NFkB.

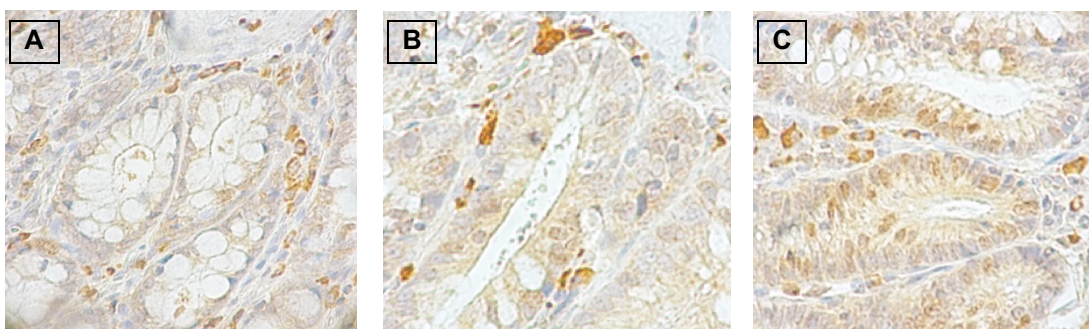
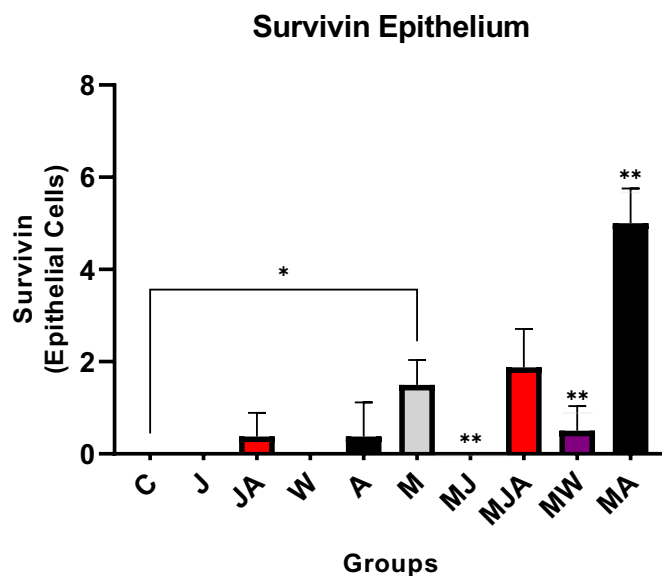
We observed that grape compounds both grape juice and red wine inhibited the expression of Akt and Survivin (Figures 11 and 12). This inhibition was more pronounced in the group MJ ( $P < 0,001$ ). On the other hand, alcohol, especially when isolated, enhanced the expression of Akt and Survivin ( $P < 0,001$ ). The photomicrographs show group control (11A) with no staining while group M exposed to MNNG shows epithelial cells positively marked (11B) and in (11C) alcohol increased the epithelial cells positively marked for Akt.

Figure 11.



**Figure 11. AkT expression in CRC tissue epithelium and normal tissue. Photomicrograph of immunostaining for AKT.** A) Control Group - weak positivity of AKT-positive cells.;B) Group M - the carcinogen MNNG' 60 mg/kg induced an increase in the number of AKT-positive cells; C) MA group – alcohol increased immunostaining for AKT.

**Figure 12.**



**Figure 12. Survivin (SURV) expression in CRC tissue epithelium and normal tissue Photomicrograph of immunostaining for SURV.** A) Control Group - weak positivity of SURV-positive cells; B) Group M - the carcinogen MNNG' 60 mg/kg induced an increase in the number of SURV-positive cells; C) MA group – alcohol increased immunostaining for SURV.

## **DISCUSSION**

We have observed that the treatment of the rats with alcohol caused a stimulation of the colonic carcinogenesis process, noted by the increased in the size of preneoplastic lesions induced by the MNNG, as well as hyperplasia of the colonic normal mucosa observed by the increased crypt length and PCNA staining of cells. This is in accordance with most of the literature, both in humans (Park et al., 2018; Rossi et al., 2018) and in animals (Hayashi et al., 2007; Niwa et al., 1991; Seitz et al., 1984; 1985; Wimberly et al., 2013). On the other hand, the grape juice ingestion caused an opposite effect, inhibiting both the formation

and size of ACF, what is also in accordance with the literature (Silva et al., 2015; Tian et al., 2020).

The treatment with red wine or grape juice with alcohol did not impact either positively or negatively the carcinogenesis process. Thus, it may be interpreted that, in our experimental model, the well known anti-carcinogenic effects of grape compounds were counterbalanced by the also known pro-carcinogenic effects of alcohol. Our findings are in accord with a recent meta-analysis study which found null association between wine consumption and colorectum cancer risk both in men and women (Xu et al., 2019)

Our study provided insights on three main mechanisms that could be involved in the complex relationship between grape compounds, alcohol and carcinogenesis: the modulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis induction.

Regarding to the oxidative stress, all the groups treated with alcohol presented increased MDA concentration, regardless the presence of grape compounds either in the grape juice or in the wine. This means that the grape compound in this specific situation were not able to counterbalance the pro-oxidant effects of alcohol. Our results confirm the findings of Oshima et al (2015) that also did not find a modulation of oxidative stress by grape juice concentrate in rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane (Oshima et al, 2015). Our experimental evidence corroborates the Lachenmeier et al (2014) affirmation that the grape component resveratrol cannot avoid the pro-oxidant effects of alcohol. These authors vehemently criticized the common suggestion for the use of wine as a healthy orientation in public health. Our current findings are also coherent with our previous observation that the chemopreventive effects of RESV are hindered when it is associated to alcohol in experimental colonic carcinogenesis (Cesar et al., 2022).

Both the treatment with grape juice and red wine increased GSH concentration in the colon meaning that there are grape compounds able to increase this anti-oxidant defense.

It has been observed that, among other mechanisms, alcohol promotes the chemical carcinogen-induced colonic tumorigenesis potentially by enhancing mucosal inflammation (Shukla et al., 2016; Johson et al., 2021). Our findings are in accordance with this proposed mechanism because we found that alcohol was

associated to increase in NFκB expression. On the other hand, it is known that grape compounds inhibit colonic carcinogenesis and simultaneously colonic inflammatory molecules (Sanchez-Tena et al., 2013) such as Cyclo-oxygenase-2 (Silva et al., 2015) and NF-kappa-B (Campanholo et al., 2015). We also found an inhibition of the expression of the inflammatory molecule NFκB by the grape juice.

The role of apoptosis in colon carcinogenesis is well known for decades (Kishimoto et al., 2002; Sun et al., 2004). Interestingly, the grape compounds have been observed to stimulate apoptosis in colon carcinogenesis (Oshima et al., 2015) and in colon cancer stem cells (Reddivari et al., 2016). The grape compound resveratrol is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells (Liu et al., 2019). We have observed that the grape juice induced a potent apoptotic response in animals treated with MNNG. Red wine also presented an apoptosis induction in our experimental model, albeit less potent. It has also been reported that alcohol inhibits apoptosis during the colonic carcinogenesis process (Diao et al., 2020). We have observed that in the alcohol treated animals the apoptosis induction by grape juice or wine was abrogated. Furthermore, our findings regarding the expression of Akt and survivin are coherent with the apoptosis markers, indicating that this signalling pathway may be involved in the modulation of apoptosis by grape compounds and alcohol.

We have found lower expression of NFκB, Akt and Survivin with the treatment with red wine in comparison with the grape juice and alcohol. This indicates that possibility the vinification process could have added to the grape juice eventual beneficial chemical components that deserves further investigation.

Finally, taking into account the complexity of colonic carcinogenesis, it can not be ruled out that other mechanisms besides the ones evaluated in this study could also explain our findings. In summary, the main findings of the present study are that alcohol stimulates, grape juice inhibits and both the association of alcohol with grape juice or the red wine presented null effects in the chemically-induced colon carcinogenesis in rats. These findings can be at least partially explained by modulation of oxidative stress, inflammatory parameters and apoptosis induction or inhibition. The results of the present study do not corroborate the view of red wine as a chemopreventive agent against cancer. On

the other hand, considering the devastating effects of the alcohol in relation to the carcinogenesis process, the eventual capability of the grape compounds in red wine in order to neutralize the alcohol effects seems not neglectable and deserves further investigation.

## REFERENCES

- Aires V, Delmas D1. Common pathways in health benefit properties of RSV in cardiovascular diseases, cancers and degenerative pathologies. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(3):219-44.
- Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012 Jul;4(7):759-81.
- Bianchini F, Vainio H. Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention? *European Journal of Cancer Prevention* 12(5): 417-425 (2003).
- Campanholo VM, Silva RM, Silva TD, Neto RA, Paiotti AP, Ribeiro DA, Forones NM. Oral concentrated grape juice suppresses expression of NF-kappa B, TNF- $\alpha$  and iNOS in experimentally induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(3):947-52. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.3.947.
- Cesar EF, Minto, SB, Garcia, SB. Alcohol hinders the Anti-Carcinogenic effect of Resveratrol in the Colon of rats. *Studies in Health Sciences*, v.3,n.3, p.1508-1521, jul./sep., 2022
- Diao XY, Peng T, Kong FG, Huang JG, Han S, Shang YS, Liu H. Alcohol consumption promotes colorectal cancer by altering intestinal permeability. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Sep;24(18):9370-9377. doi: 10.26355/eurrev\_202009\_23020.Esser et al. *JAMA Network Open*. 2022;5(11):e2239485. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.39485
- Hayashi N, Tsutsumi M, Fukura M, Yano H, Tsuchishima M, Takase S. Effect of chronic dietary ethanol consumption on colonic cancer in rats induced by

- 1,1-dimethylhydrazine. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Jan;31(1 Suppl):S72-6. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00290.x.
- Hrelia S, Di Renzo L, Bavaresco L, Bernardi E, Malaguti M, Giacosa A. Moderate Wine Consumption and Health: A Narrative Review. *Nutrients*. 2022 Dec 30;15(1):175. doi: 10.3390/nu15010175.
- Johnson CH, Golla JP, Dioletis E, Singh S, Ishii M, Charkoftaki G, Thompson DC, Vasiliou V. Molecular Mechanisms of Alcohol-Induced Colorectal Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 31;13(17):4404. doi: 10.3390/cancers13174404
- Kishimoto Y, Yashima K, Morisawa T, Ohishi T, Marumoto A, Sano A, Idobe-Fujii Y, Miura N, Shiota G, Murawaki Y, Hasegawa J. Effects of long-term administration of sulindac on APC mRNA and apoptosis in colons of rats treated with azoxymethane. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002 Nov;128(11):589-95. doi: 10.1007/s00432-002-0384-8.
- Lachenmeier DW1, Godelmann R, Witt B, Riedel K, Rehm J. Can resveratrol in wine protect against the carcinogenicity of ethanol? A probabilistic dose-response assessment. *Int J Cancer*. 2014 Jan 1;134(1):144-53.@@@
- Niwa K, Tanaka T, Sugie S, Shinoda T, Kato K, Tamaya T, Mori H. Enhancing effect of ethanol or saké on methylazoxymethanol acetate-initiated large bowel carcinogenesis in ACl/N rats. *Nutr Cancer*. 1991;15(3-4):229-37. doi: 10.1080/01635589109514131.
- Oshima CT, Landman G, Paiotti AP, Artigiani Neto R, Silva RM, Campanholo VM, Gollucke AP, Ribeiro DA, Forones NM. Grape juice concentrate (G8000™) modulates apoptosis but not oxidative stress following rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *Toxicol Mech Methods*. 2015 Feb;25(2):91-7. doi: 10.3109/15376516.2014.989556.
- Park, S.-Y., Wilkens, L. R., Setiawan, V. W., Monroe, K. R., Haiman, C. A., & Le Marchand, L. (2018). Alcohol Intake and Colorectal Cancer Risk in the Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 188(1), 67-76.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016 Apr;8(4):603-19. doi: 10.18632/aging.100934.



- Reddivari L, Charepalli V, Radhakrishnan S, Vadde R, Elias RJ, Lambert JD, Vanamala JK. Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Aug 9;16:278. doi: 10.1186/s12906-016-1254-2. PMID: 27506388;
- Rossi M, Jahanzaib Anwar M, Usman A, Keshavarzian A, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption-Populations to Molecules. *Cancers (Basel)*. 2018 Jan 30;10(2):38. doi: 10.3390/cancers10020038.
- Roswall N, Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *J Prev Med Public Health*. 2015 Jan;48(1):1-9. doi: 10.3961/jpmph.14.052.
- Roy HK, Gulizia JM, Karolski WJ, Ratashak A, Sorrell MF, Tuma D. Ethanol promotes intestinal tumorigenesis in the MIN mouse. Multiple intestinal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Nov;11(11):1499-502.
- Ruf JC. Overview of epidemiological studies on wine, health and mortality. *Drugs Exp Clin Res*. 2003;29(5-6):173-9.
- Renaud SC, Guéguen R, Siest G, Salamon R. Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. *Arch Intern Med*. 1999 Sep 13;159(16):1865-70. doi: 10.1001/archinte.159.16.1865.
- Sánchez-Tena S, Lizárraga D, Miranda A, Vinardell MP, García-García F, Dopazo J, Torres JL, Saura-Calixto F, Capellà G, Cascante M. Grape antioxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in *ApcMin/+* mice: relation to cell cycle and immune response. *Carcinogenesis*. 2013 Aug;34(8):1881-8. doi: 10.1093/carcin/bgt140.
- Shukla PK, Chaudhry KK, Mir H, Gangwar R, Yadav N, Manda B, Meena AS, Rao R. Chronic ethanol feeding promotes azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colonic tumorigenesis potentially by enhancing mucosal inflammation. *BMC Cancer*. 2016 Mar 7;16:189. doi: 10.1186/s12885-016-2180-x. PMID: 26951793;
- Silva RM, Campanholo VM, Paiotti AP, Artigiani Neto R, Oshima CT, Ribeiro DA, Forones NM. Chemopreventive activity of grape juice concentrate (G8000TM) on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane.

- Environ Toxicol Pharmacol. 2015 Nov;40(3):870-5. doi: 10.1016/j.etap.2015.09.012.
- Sun SY, Hail N, Jr., Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 2004 May 5;96(9):662–72.
- Tian Q, Xu Z, Sun X, Deavila J, Du M, Zhu M. Grape pomace inhibits colon carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing epigenetic modifications. *J Nutr Biochem.* 2020 Oct;84:108443. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108443.
- Vernousfaderani EK, Akhtari N, Rezaei S, Rezaee Y, Shiranirad S, Mashhadi M, Hashemi A, Khankandi HP, Behzad S. Resveratrol and Colorectal Cancer: A Molecular Approach to Clinical Researches. *Curr. Top. Med. Chem;*21:2634–2646. 2021. doi: 10.2174/1568026621666211105093658
- Wang H, Tian Q, Xu Z, Du M, Zhu MJ. Metabolomic profiling for the preventive effects of dietary grape pomace against colorectal cancer. *J Nutr Biochem.* 2023 Jun;116:109308. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109308.
- West NJ, Courtney ED, Poullis AP, Leicester RJ. Apoptosis in the colonic crypt, colorectal adenomata, and manipulation by chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jun;18(6):1680-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0006.
- Wimberly AL, Forsyth CB, Khan MW, Pemberton A, Khazaie K, Keshavarzian A. Ethanol-induced mast cell-mediated inflammation leads to increased susceptibility of intestinal tumorigenesis in the APC  $\Delta$ 468 min mouse model of colon cancer. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013 Jan;37 Suppl 1(01):E199-208. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01894.x.
- WHO Global alcohol Action Plan 2022–2030 to Strengthen Implementation of the Global Strategy to Reduce the Harmful Use of Alcohol—First Draft. [(accessed on 18 November 2022)]. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/global-action-plan-on-alcohol-1s...>
- Xu W, Fan H, Han Z, Liu Y, Wang Y, Ge Z. Wine consumption and colorectal cancer risk: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev.* 2019 May;28(3):151-158. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000444.
- Zhao J, Stockwell T, Naimi T, Churchill S, Clay J, Sherk A. Association Between Daily Alcohol Intake and Risk of All-Cause Mortality: A Systematic Review

and Meta-analyses. JAMA Netw Open. 2023;6(3):e236185.  
doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.6185