

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DE DIETA MATERNA RICA EM CARBOIDRATOS
SIMPLES E GORDURA NAS FASES DE PRÉ E PÓS-
CONCEPÇÃO NA MUCOSA COLÔNICA APÓS
ADMINISTRAÇÃO DA 1,2- DIMETILHIDRAZINA NA
GERAÇÃO DE FÊMEAS F1: MODULAÇÃO PELA CARNOSINA

Vania Vasti Alfieri Nunes

Discente

Dr. Luís Fernando Barbisan

Orientador

BOTUCATU – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DE DIETA MATERNA RICA EM CARBOIDRATOS
SIMPLES E GORDURA NAS FASES DE PRÉ E PÓS-
CONCEPÇÃO NA MUCOSA COLÔNICA APÓS
ADMINISTRAÇÃO DA 1,2- DIMETILHIDRAZINA NA
GERAÇÃO DE FÊMEAS F1: MODULAÇÃO PELA CARNOSINA

Vania Vasti Alfieri Nunes

Discente

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Biologia Celular Estrutural e
Funcional*.

Nome do orientador: Dr. Luís Fernando Barbisan

BOTUCATU – SP

2023

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

Nunes, Vania Vasti Alfieri.

Efeitos de dieta materna rica em carboidratos simples e gordura nas fases de pré e pós-concepção na mucosa colônica após a administração da 1,2-dimetilhidrazina na geração de fêmeas F1 : modulação pela carnosina / Vania Vasti Alfieri Nunes. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan
Capes: 20603002

1. Expressão gênica. 2. Antioxidantes. 3. Carnosina.
4. Nutrição materna.

Palavras-chave: Antioxidante; Carnosina; Expressão gênica colônica; Má-nutrição materna.

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que me deu forças para seguir. Dedico aos meus pais Nancy e Benoni (*in memoriam*), meus maiores incentivadores e minha verdadeira inspiração. O exemplo de vocês é meu combustível diário. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação de toda a minha vida, sem vocês não seria possível continuar.

Agradecimentos

Agradeço meus irmãos Davison e Sarah, por todo apoio nos momentos mais difíceis, por alegrar meus dias e me escutar e aconselhar sempre. Minha cunhada Maíra, um presente que Deus colocou na minha vida para alegrar meu caminho. Meu cunhado Celso, pelos bons momentos vividos. À Manuella, minha sobrinha por fazer renascer a vida em nossos corações e trazer imensas alegrias.

Ao Gustavo, por ter chegado na minha vida e mudado o rumo de tudo. Por me apoiar e incentivar, além de toda a compreensão nos momentos que estive ausente. A convivência diária me faz mais forte e ilumina meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr Luís Fernando Barbisan pelos ensinamentos, paciência e compreensão dos momentos difíceis que passei. Obrigada por me ajudar a terminar esse trabalho.

Ao Prof. Luís Antonio Justulin pela parceria e pela porta sempre aberta. Por ter me oferecido ajuda da Ana Carolina em todo acasalamento no biotério. Obrigada pela parceria e por todas as manhãs no biotério. Além de cia, Ana Carolina já alegrava meu dia logo pela manhã.

Aos Prof. Kassandra Oliveira e Rafael Nóbrega, pela oportunidade de estar em sala de aula aprendendo com vocês. Kassandra, pelo o acompanhamento de toda a trajetória desde Assis, sendo uma inspiração para minha vida profissional. Dividir aulas com uma veterana foi um aprendizado e prazer inigualáveis.

À Nelci, por todo o tempo que estive comigo, nesse trabalho e na vida pessoal. Exemplo de profissional e amiga a ser seguido. Obrigada por todos os conselhos, choros e risadas. A minha vida por aqui não seria leve sem a sua presença, além da realização desse trabalho. Obrigada por cada dia compartilhado.

À Ketlin, por todo o amor e cuidado que sempre teve para comigo e pela ajuda de terminar esse trabalho. Uma profissional exemplar que trouxe alegria e parceria aos meus dias. Dias de choro, dias de riso e dias que somente a cia bastava para seguir um novo passo. A minha jornada foi mais leve contigo, sinto saudades.

À Joyce, por ter me ajudado nesse trabalho e pela amizade e companheirismo. Foram momentos que a sua cia fez toda a diferença para mim.

À Ariane, sua ajuda e amizade desde o primeiro dia que estive no LCQE, sua presença me fez mais forte. Admiro sua coragem e braveza.

Aos meus colegas do laboratório LCQE (Leandro, Luís, Gabriel, Sara, Simone, Thiago, Guilherme) pela convivência no dia-a-dia.

Ao Paulo César (PC) pela ajuda com meus animais no biotério. Foram tratamentos diários e nos finais de semana que sem você não seria possível, além de me fazer rir nos momentos mais inusitados (eutanásias).

As minhas vizinhas Rebecca e Emanuela, por todos os cafés e conversas intermináveis que completavam meus dias sombrios da pandemia. À Letícia e ao Lucas, casal sempre parceiro que deixou meus dias mais agradáveis e coloridos na minha jornada por aqui.

À Ariana, Vanessa e Paulo, Fernando, Sergio (Pei), Bruno (Pira), Luiz (Corote). Meus dias sem eles aqui em Botucatu não seriam os mesmos. Obrigada pela parceria, pelas risadas, pelos almoços, pelos inúmeros cafés e pelas noites festivas. Cada um teve sua participação para que eu prosseguisse, vocês foram tão importantes.

À Elaine e Ana, meu refrigerio diário. Agradeço o coração enorme, o carinho e cuidado que sempre tiveram comigo. Os dias com vocês foram alimentos para minha alma. Elaine, um carinho de Deus para comigo diário.

À Sheila, por dividir seus dias comigo e me ensinar a beleza dos simples momentos, reencontrá-la foi um uma ótima surpresa.

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

**A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em ter
novos olhos”**

Marcel Proust

Resumo

Dietas maternas, entre elas aquelas ricas em carboidratos simples e gorduras, ingeridas durante o período pré, pós-concepção e início de vida de seus descendentes, podem gerar estresse oxidativo e inflamação em diversos órgãos, incluindo o cólon. A carnosina (CAR) é um dipeptídeo que apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório. Dessa forma, este estudo visa avaliar o papel protetor da CAR sobre as alterações colônicas induzidas pela administração da 1,2-dimetilhidrazina (DMH) sob influência do consumo de dieta hipercalórica ou dieta normocalórica na geração F1 de ratas Sprague-Dawley (SD). Fêmeas (F0) com 3 semanas de idade foram alocadas em 2 grupos, um grupo recebeu a dieta hipercalórica (DHC) ou dieta normocalórica (DNC) por 90 dias. Após esse período, as fêmeas foram submetidas ao cruzamento e acompanhadas quanto ao consumo de ração e peso durante a pré, pós-concepção e lactação. A prole foi mantida com a mesma dieta das mães depois do desmame e até o dia pós-natal 31 (DPN31). A geração F1 de fêmeas foi subdividida em 4 grupos distribuídos em: G1 e G2, sendo que ambos ingeriram DNC e receberam duas doses de DMH (20 mg/kg) (DPN28 e DPN31); o G2 recebeu ainda uma dose diária de CAR (250 mg/kg) por 10 dias (DPN21 ao DPN31). Os grupos G3 e G4 receberam a DHC e duas doses de DMH (20 mg/kg) (DPN28 e DPN31) e o G4 recebeu também a CAR (250 mg/kg), por 10 dias (DPN21 ao DPN31). Em seguida, os animais foram eutanasiados (DPN32) e a mucosa colônica foi coletada para análise de alturas de criptas, imunohistoquímica, atividades antioxidantes e de expressão gênica, além de amostras de sangue para avaliação de glicose, triglicerídeos e colesterol. Observou-se diminuição de consumo de DHC em animais durante o período de pré, pós e lactação. Animais que receberam CAR, que foram os grupos G2 e G4 tiveram os níveis de colesterol e triglicerídeos normalizados. Do ponto de vista morfológico foi observado uma redução nas alturas médias das criptas colônicas do grupo G2 e G3, comparadas ao G1 e recuperação das alturas das criptas do grupo tratado com CAR associado à DHC (G4). O G2 teve uma diminuição dos níveis de proliferação celular (Ki-67). Quando avaliada a dosagem de glutationa oxidada (GSSG) na mucosa colônica observou-se uma diminuição no grupo que recebeu DHC+CAR (G4) em comparação ao grupo DHC (G3). Com base nos resultados de análises gênicas identificamos o cluster de proteínas com vias fortemente enriquecidas nas comparações realizadas e a participação de genes na via de câncer colorretal. Conclui-se que a ingestão de DHC materna e no período juvenil causou alterações na altura das criptas intestinais, estresse oxidativo e perfil bioquímico e de expressão gênica da mucosa colônica após insulto agudo da DMH. O tratamento da prole de fêmeas com a carnosina contribuiu para redução de respostas da predisposição à obesidade e doenças metabólicas, através da resposta antioxidante e diminuição de vias inflamatórias, reduzindo os efeitos citotóxicos de DMH e efeitos de alterações causadas pela ingestão materna de DHC.

Palavras-chave: Má-nutrição materna, carnosina, antioxidante, expressão gênica colônica.

Abstract

Maternal diets, including those rich in simple carbohydrates and lipids, ingested during the pre-, post-conception and early life offspring, can generate oxidative stress and inflammation in various organs, including the colon. Carnosine (CAR) is a dipeptide, it has antioxidant's and anti-inflammatories' potential. Thus, this study aims to evaluate the protective role of CAR on colonic changes induced by the administration of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) under the influence of the consumption of a hypercaloric diet, rich in simple carbohydrates and lipids and a normocaloric diet in the F1 generation of Sprague-Dawley rats (SD). Three weeks old females (F0) were allocated into 2 groups, one group received either a hypercaloric (DHC) or a normocaloric diet (DNC) for 90 days. After this period, the females mated and were analysed in terms of feed intake and weight during pre, post-conception and lactation. Offspring was maintained with same mother's diet after weaning and until postnatal day 31 (DPN31). Female F1 was subdivided into four groups distributed in: G1 and G2, both of which ingested a normocaloric diet and two DMH insults (20 mg/kg) (DPN28 and DPN31); G2 also received the daily dose of CAR (250mg/kg) for 10 days (DPN21 to DPN31). Groups G3 and G4 received DHC, two DMH (20mg/kg) insults (DPN28 and DPN31) and G4 received a CAR (250 mg/kg) for 10 days (DPN21 to DPN31). Then, the animals were euthanized (DPN32) and the colonic mucosa was collected for analysis of crypt height, immunohistochemistry assay, antioxidant activities and gene expression, in addition to a blood sample for biochemical analysis to evaluate glucose, triglycerides and cholesterol. Observed decrease in DHC consumption during the pre, post and lactation period. Females that received CAR, G2 and G4 had standardised cholesterol and triglyceride levels. From the morphological point of view, a reduction of average heights in colonic crypts in G2 and G3 groups was observed, recovery heights crypts in group treated with CAR associated with DHC (G4). G2 had a decrease in cellular proliferation levels (Ki-67). When evaluating the dosage of oxidized glutathione (GSSG) in the colonic mucosa, a decrease was observed in treated group (G4) compared to the DHC group (G3). Based on the results of genetic analysis, we identified the cluster of proteins highly enriched pathways in the comparisons made and the participation of genes in the colorectal cancer pathway. Our findings showed maternal and juvenile DHC causes alterations in the height of the intestinal crypts, oxidative stress and biochemical levels and gene expression profile of the colonic mucosa after an acute DMH insult. Offspring's females treated with carnosine contributed to reduced responses of predisposition to obesity and metabolic diseases, through the antioxidant response and decrease of inflammatory pathways, cytotoxic effects of DMH and consequences by the ingestion of DHC.

Keywords: Maternal malnutrition, carnosine, antioxidant, colonic gene expression

Lista de Abreviaturas

AOM-Azoximetano

AP-1-Proteína Ativadora-1

APC-Polipose Adenomatosa Coli

CA-Criptas Aberrantes

CAR-L Carnosina

CCHNP-Câncer Colorretal Hereditário Não-Poliposo

CCR-Câncer colorretal

CEMIB-Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CIMP-Metilação de Ilha de Nucleotídeos cpg

CLTA-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX-2-Ciclooxigenase-2

CQ-Ciclo de Quantificação

DAB-3-Diaminobenzidina

DBEF-Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

DG0-Dia Gestacional 0

DHC-Dieta Hipercalórica

DMH-1,2-Dimetilhidrazina

DNC-Dieta Normocalórica

DPN21-Dia Pós-Natal 21

ECRS-Espécies Carbonila Reativa

EROS-Espécies Reativas de Oxigênio

EO- Estresse Oxidativo

FCA-Focos de Criptas Aberrantes

G1-DNC+DMH

G2-DNC+DMH+CAR

G3-DHC+DMH

G4- DHC+DMH+CAR

GSH-Glutationa Reduzida

GSSG-Glutationa Oxidada

HE-Hematoxilina e Eosina

HPA – Human Protein Atlas

HRP-Peroxidase de Rábano

IBB-Instituto de Biotecnologia de Botucatu

INOS-Óxido Nítrico Sintase

MAM-Metilazoximetanol

MDA-Malondialdeído

MMP-Metaloproteinases de Matriz

MSI-Instabilidade de Microssatélites

OD-Densidade Óptica

PAF-Polipose Adenomatosa Familiar

PA-Pólipos Adenomatosos

PBS-Solução Salina Tamponada com Fosfato

PH-Polipose Harmartosa

PKB-Proteína Quinase B

RIN-RNA Integrity Number

RT-qPCR-Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa

SD-*Sprague-Dawley*

SL-Síndrome de Lynch

TBA-Ácido Ttiobarbitúrico

TLDA-Taqman® Low Density Array”

UNICAMP-Universidade Estadual de Campinas

Lista de Imagens

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma* (INCA, 2021).	16
Figura 2. Representação ilustrativa do processo da carcinogênese colorretal (Barbisan, 2010).....	19
Figura 3. Delineamento experimental.	26
Figura 4. Imagem representativa e morfometria realizada em cortes histológicos de cólon.	36
Figura 5. Análise de proliferação celular em cortes histológicos de cólon.....	37
Figura 6. Análise de marcadores de estresse oxidativo em musoca colônica	38
Figura 7. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no <i>String</i> dos grupos G1 (DNC+DMH) x G3 (DHC+DMH) e os termos enriquecidos pelo cluster... 41	41
Figura 8. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no <i>String</i> dos grupos G1 (DNC+DMH) x G2 (DNC+DMH+CAR) e os termos enriquecidos pelo cluster.	42
Figura 9. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no <i>String</i> dos grupos G3 (DH+DMH) x G4 (DHC+DMH+CAR) e os termos enriquecidos pelo cluster.	43
Figura 10. Análises in silico dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G3.	44
Figura 11. Análises in silico dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G2.	45
Figura 12. Análises in silico dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G3 x G4.	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Formulações das rações experimentais. *	25
Tabela 2. Dados de evolução de peso corpóreo nas fases de pré e pós-concepção dos grupos de fêmeas SD (F0) que receberam dieta normocalórica (DNC) ou dieta hipercalórica (DHC) ¹	32
Tabela 3. Dados de evolução de peso corpóreo, pesos hepáticos e bioquímicos séricos dos diferentes grupos de fêmeas SD (F1) que receberam dieta normocalórica ou dieta hipercalórica ¹	34
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na mucosa colônica dos diferentes grupos de animais DN+DMH+CAR (G2), DH+DMH+CAR (G4), comparados ao controle DN+DMH (G1) e DH+DMH (G3).....	38

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura.....	14
1.1 Influências da alimentação nos períodos de pré-concepção e início da vida sobre o desenvolvimento e doenças na vida adulta.....	14
1.2 Câncer Colorretal: epidemiologia e fatores de risco	15
1.3 Carcinogênese Colorretal	17
1.4 Carcinogênese experimental de cólon	20
2. Justificativa, hipótese e objetivos:	24
3. Metodologia.....	24
4. Resultados.....	32
4.1. Peso (massa) corpóreo e consumo de ração das progenitoras (F0)	32
4.2. Peso (massa) corpóreo, consumo de ração, pesos (massas) hepáticos da prole de fêmeas SD (F1).....	34
4.3 Morfometria das criptas colônicas.....	35
4.4. Proliferação celular nas criptas colônicas.....	36
4.5 Marcadores de estresse oxidativo na mucosa colônica	37
4.6 Análise de expressão gênica	38
4.7 Análise de clusterização e de vias enriquecidas pelos genes diferencialmente expressos.....	40
4.8 Análises <i>in silico</i> dos genes diferencialmente expressos na iniciação da carcinogênese de cólon retal entre modelo de murinos e amostras humanas.....	43
5. Discussão.....	46
6. Conclusão	51
7. Referências Bibliográficas.....	52
ANEXOS	74

1. Revisão de Literatura

1.1 Influências da alimentação nos períodos de pré-concepção e início da vida sobre o desenvolvimento e doenças na vida adulta

Estudos tem indicado que padrões de dietas maternas e paternas influenciam diretamente na geração de seus descendentes (Lecomte et al., 2017; Sanchez-Garrido et al., 2018; Voerman et al., 2019; Hoffman et al., 2021). O momento de desenvolvimento intrauterino é de alta vulnerabilidade para o desenvolvimento do embrião/feto pois trata-se de fases onde ocorrem altas taxas de proliferação e diferenciação celulares, importantíssimas para o desenvolvimento dos tecidos e órgãos (Burton et al., 2016). Dessa forma, alguma perturbação que venha acontecer nessa fase crítica de desenvolvimento pode acarretar em alterações/anormalidades e doenças na vida adulta dos descendentes (Hoffman et al., 2021). Em 1986, Barker e colaboradores realizaram as primeiras pesquisas relacionadas à essa teoria sobre o papel da programação fetal.

Nesse contexto, destaca-se o conceito das origens desenvolvimentistas da saúde e doença (DOHaD), o qual defende a ideia de que eventos adversos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento humano sobre o padrão de saúde e doença ao longo da vida, como influencias maternas e paterna que podem começar na fase de pré-concepção (Li et al., 2017). Sendo assim, a exposição materna a diferentes ambientes/estímulos como estresse, baixa ingestão nutricional, consumo de drogas, exposição a agentes químicos e/ou hormônios, podem induzir modificações que geram alterações no desenvolvimento de órgãos e sistemas da prole (Desai et al., 2015; Goldstein et al., 2016; Ramírez-López et al., 2016). Alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nesses processos são: efeitos do ambiente sobre a expressão gênica, através de mecanismos epigenéticos; efeitos de sinais hormonais transmitidos ao feto através da placenta ou ao recém-nascido através da lactação (Desai et al., 2015; Goldstein et al., 2016; Ramírez-López et al., 2016).

O desenvolvimento fetal está intimamente relacionado também a nutrição materna (Bo Sun et al., 2012). No caso de mães que ingerem uma dieta hipercalórica (DHC), as alterações morfológicas e funcionais em diversos órgãos são observadas e manifestadas, na vida adulta dos descendentes (Pullar et al., 2019; Dalrymple et al, 2022; Peral-Sanchez et al, 2022). Para avaliação do papel da nutrição materna no fenômeno DOHaD, os modelos animais são

ferramentas essenciais, já que é possível realizar o controle da composição e da ingestão de diferentes tipos de dietas ao longo do desenvolvimento da prole nas fases pré e pós-natal (Litzenburger et al., 2020). É possível observar que uma DHC materna ocasiona obesidade, hipertensão, resistência à insulina, intolerância à glicose, esteatose hepática, aumento de massa visceral e aumento da susceptibilidade ao câncer na descendência (Masuyama, et al., 2012; Blackmore e Ozanne, 2013; Bianco-Miotto et al., 2017; Yamada e Chong, 2017; Ramírez-Alarcón et al., 2019; Zapaterini et al., 2022). Em roedores, estudos mostram que as proles de mães alimentadas com DHC apresentam menor peso (massa) corpóreo, crescimento e desenvolvimento muscular retardados e alterações em reflexos biológicos (Christians et al., 2019).

Dentre as possíveis alterações na descendência sobre influências da dieta materna e paterna, a obesidade se destaca no contexto mundial nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Hossain et al., 2007). Tal ocorrência se dá pelo estilo de vida sedentário do indivíduo, excesso de consumo de carboidratos simples e gordura além de uma baixa ingestão de frutas (Ng et al., 2014; Kominiarek e Peaceman, 2017; Şanlı e Kabaran, 2019). A obesidade materna afeta diretamente o embrião/feto durante toda a gestação e lactação promovendo o desenvolvimento de diversas doenças metabólicas e relacionadas ao estresse oxidativo (Sarker et al., 2019; Moraes-Souza et al., 2021; Tain e Hsu, 2022). Dentre elas, podemos citar a possível correlação da ingestão da DHC materna com a carcinogênese colorretal (Lopes et al., 2016).

1.2 Câncer Colorretal: epidemiologia e fatores de risco

O câncer colorretal (CCR) é caracterizado pela transformação maligna de criptas intestinais normais em adenocarcinomas, resultante do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas (Nguyen e Duong, 2018). As formas mais comuns do CCR são as hereditárias e esporádicas, sendo a maioria dos casos (70 a 85%) representadas pela forma esporádica da doença, em que não há fatores de risco genéticos identificados (Yamagishi et al., 2016; INCA 2018).

O CCR é a terceira neoplasia mais incidente e a segunda principal causa de morte por câncer no mundo, com uma estimativa de 1,9 milhões de novos casos e 935.000 mortes para o ano de 2020 (GLOBOCAN, 2020). Em 2020, no Brasil o CCR ocupou o segundo lugar entre as

neoplasias malignas em homens (9,1%) e mulheres (9,2%), com estimativa de 20.540 e 20.470 novos casos, respectivamente (Figura 1). A mortalidade observada para o CCR é de 8,4% em homens e 9,6% em mulheres (Bray et al., 2018; INCA, 2021; Hong et al., 2021). Estima-se que até o ano de 2035, o número total de mortes por câncer retal e de cólon aumentará em 60% e 71,5%, respectivamente (Araghi et al., 2019).

Além do mais, o CCR tornou-se um grande problema de saúde pública. Apesar do aprimoramento dos tratamentos na última década, a sobrevivência de pacientes com a doença já avançada permanece baixa e os custos do tratamento aumentaram (Wang et al., 2017).

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma* (INCA, 2021).

As principais causas do aumento de casos de CCR se devem a fatores diversificados, como o processo de envelhecimento, crescimento populacional e outros fatores relativos ao desenvolvimento socioeconômico, bem como os hábitos de vida modernos, tais como sedentarismo, uso abusivo de álcool, tabagismo prolongado, alto consumo de carne vermelha processada, carboidratos simples e de gorduras saturadas e baixa ingestão de cálcio, de frutas, verduras e fibras alimentares (Bray et al., 2018; Steck e Murphy, 2020; (INCA, 2021). Além dessas causas, tem-se o agravante da idade, que é um fator de risco significativo tanto para o câncer como para outras doenças crônicas (Farrelly, 2021). Os casos esporádicos de CCR não apresentam histórico familiar ou mutações genéticas herdadas, tendo os hábitos e estilos de vida como os fatores principais de risco modificáveis (Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020) Quanto aos fatores hereditários, a presença de Pólipos Adenomatosos

(PA), condições genéticas como Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), a Síndrome de Lynch (SL) ou Câncer Colorretal Hereditário Não-Poliposo (CCHNP), história de doença de Crohn, diabetes tipo 2 e exposições à radiação ionizante também são considerados fatores de risco para o esta neoplasia maligna (American Cancer Society, 2019; INCA 2019; GLOBOCAN 2020).

Os casos de CCR com predisposição genética abrangem as poliposes, as não poliposes e doenças colônicas inflamatórias hereditárias. A PAF e a Polipose Hamartomatosa (PH) são caracterizadas pela formação de múltiplos pólipos que podem evoluir para lesões malignas, os adenocarcinomas (Valle, 2014; Keum e Giovannucci, 2019). Esse tipo de câncer pode ser prevenido pela detecção precoce em exames de colonoscopia, remoção de pólipos pré-cancerosos ou pela detecção de lesões malignas em estágios iniciais (Del Vecchio Blanco et al., 2015).

1.3 Carcinogênese Colorretal

O acúmulo progressivo de alterações genéticas é a principal característica da progressão clínica e experimental das neoplasias colorretais (Fearon e Vogelstein, 1990). O desenvolvimento dessa neoplasia inclui etapas caracterizadas por modificações genéticas (mutações pontuais, amplificações e deleções gênicas) e epigenéticas (metilação do DNA e metilação e acetilação de histonas) que são progressivamente acumuladas no genoma celular (Irigaray e Belpomme 2010; Singh et al., 2015). As células neoplásicas apresentam instabilidade genômica resultando em inúmeras alterações em genes (oncogenes e genes supressores de tumores) que regulam o crescimento, proliferação, morte e diferenciação celular, angiogênese, invasão tumoral e metástase (Nguyen et al., 2020).

As células iniciadas são aquelas que sobreviveram ao estímulo mutagênico agressor em seu DNA, sem um reparo adequado ou eliminação pela indução de morte celular (Nguyen et al., 2020). Estas mutações são fixadas no DNA da célula alvo após um ciclo de divisão celular, caracterizando as células iniciadas (Vincent e Gatenby, 2008).

Após a etapa de iniciação, as células apresentam expansão clonal seletiva, sendo os agentes promotores essenciais para acelerar o desenvolvimento de lesões proliferativas, anaplásicas e/ou displásicas subsequentes (Du et al., 2022). Os agentes promotores apresentam mecanismos de ação não genotóxicos (ou epigenéticos) ativando proteínas-quinases envolvidas

na fosforilação de substratos das vias de transdução de sinais de resposta a fatores de crescimento (Du et al., 2022). As respostas aos agentes promotores provocam o desenvolvimento de células anaplásicas e/ou malignas (Pitot, 2000, Vincent e Gatenby, 2008), direcionando a próxima etapa do processo de carcinogênese.

Na fase de progressão as lesões apresentam células neoplásicas com elevado grau de anaplasia e acentuado grau de desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose (Du et al., 2022). A partir dessa etapa, as células tumorais são autossuficientes e apresentam crescimento autônomo e resistência à indução apoptótica e às drogas quimioterápicas (Chen et al., 2022). Além de apresentam altas taxas proliferativas, aneuploidia e pleomorfismo celular e nuclear, gerando o fenótipo maligno. O acúmulo de novas mutações em genes específicos que controlam a transição epitélio-mesenquimal, produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e a invasão de tecidos adjacentes, levam as células transformadas a adquirirem o fenótipo maligno. O próximo evento celular é a infiltração linfática e vascular, promovendo a formação de metástases, que culminam muitas vezes em caquexia e fase terminal do paciente (Kroemer e Pouyssegur, 2008; Chen et al., 2022).

A carcinogênese colorretal tem como principais vias envolvidas as genéticas e epigenéticas como: instabilidade cromossômica, metilação de ilha de nucleotídeos CpG (CIMP) e instabilidade de microssatélites (MSI) (Fearon et al., 2011; Armaghany et al., 2012; Wright et al., 2017). Essa instabilidade ocorre devido a erros durante a mitose, resultando em anormalidades na estrutura do cromossomo ou no seu número de cópias (Bakhoum et al., 2014). A CIMP são várias alterações epigenéticas que tem como característica principal hipermetilações de regiões de repetição de dinucleotídeos CG (ilhas CpG) em regiões promotoras de genes supressores tumorais (Jia et al., 2016). A MSI normalmente inativa o sistema de reparo de bases mal pareadas (mismatches) de DNA por hipermetilação ou mutação dos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 levando ao acúmulo de erros de reparo no DNA, além de ser caracterizada pelo encurtamento ou alongamento de sequencias repetitivas de nucleotídeos de DNA (Vilar e Gruber, 2010).

Na literatura, a sequência adenoma-carcinoma é a via clássica para o desenvolvimento do CCR, desencadeada pela mutação do gene APC (Polipose Adenomatosa Coli), um gene que codifica uma proteína supressora de tumor e mutações em sua sequência de nucleotídeos. Essas

alterações estão associadas com o desenvolvimento de adenomas colorretais que podem evoluir para adenocarcinomas. O gene APC está envolvido com a degradação da β -catenina, uma proteína de adesão que atua na adesão célula-célula e comunicação celular, principalmente aquela relacionada com as proteínas Wnt (Parker e Neufeld, 2020). Quando mutada, a β -catenina é translocada para o citoplasma e, em alguns casos, para o núcleo promovendo o descontrole da proliferação celular epitelial. De 85–90 % dos pacientes com CCR apresentam a evolução do adenoma-carcinoma, os quais a proliferação celular e a apoptose são eventos essenciais (Figura 2) (Jamieson et al., 2012; Kim e Kim, 2013; Jaspersen e Burt, 2015).

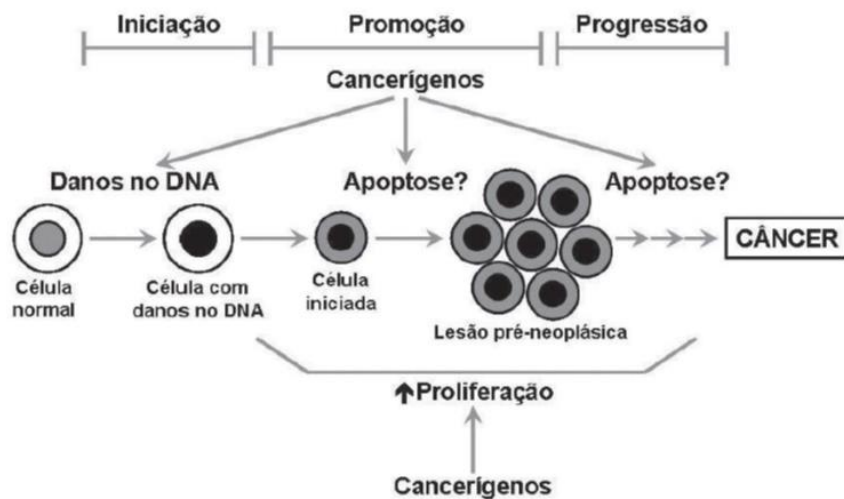


Figura 2. Representação ilustrativa do processo da carcinogênese colorretal (Barbisan, 2010).

Outra mutação relevante para os casos de CCR é a alteração do proto-oncogene K-RAS, a qual impede a ação de enzimas GTPases, sendo assim quando, constitutivamente, ativa a via de sinalização de RAS, diminui a apoptose e gera um aumento da proliferação celular (Rahman et al., 2021). No momento que um adenoma evolui para um adenocarcinoma, ocorre, com frequência, a perda do supressor tumoral TP53 que participa no controle do ciclo celular, indução de reparo de DNA e apoptose, contribuindo para a progressão do CCR (Grady e Carethers, 2008; Armaghanu et al., 2012). Outra forma de aparecimento dessa neoplasia ocorre pela lesão no DNA devido a produção de radicais livres pela via óxido nítrico sintase (iNOS), com posterior supressão de TP53, causando inflamação contínua da mucosa intestinal e desenvolvimento da displasia epitelial (Tanaka, 2012).

Considerada ainda outra mutação presente no CCR, cita-se a alteração oncogene BRAF que gera a formação de pólipos hiperplásicos, através da ativação da via MAPK que aumenta a proliferação celular (Kedrin e Gala, 2015). Todas as alterações genéticas citadas acima induzem um ambiente de instabilidade cromossômica, caracterizado por acúmulos de deleções e aneuploidias cromossômicas que aceleram o surgimento e progressão do CCR (Tanaka, 2009; Carethers e Jung 2015; Liu et al., 2015; Muller, 2016).

Por sua vez, a literatura notifica que a obesidade e sedentarismo podem promover o desenvolvimento neoplásico ao contribuir com o processo inflamatório intestinal (Rawla et al., 2019). Adicionalmente, encontram-se dados que alterações da microbiota intestinal causam inflamação e a carcinogênese por meio do metabolismo oxidativo (Kang et al., 2021).

1.4 Carcinogênese experimental de cólon

Para o estudo do CCR os modelos em roedores são os mais indicados na busca de potenciais agentes quimiopreventivos, pois permitem identificar os mecanismos, biomarcadores e vias envolvidas nas etapas de iniciação, promoção e progressão do adeno-carcinoma colorretal (Corpet e Pierre, 2005; Johnson e Fleet, 2012; Afrin et al., 2020). Os modelos experimentais são quimicamente induzidos em roedores para gerarem lesões neoplásicas, que apresentem semelhanças morfológicas, bioquímicas e genéticas, tais como em humanos. Além disso, observa-se que o CCR é precedido pelo desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas como os focos e/ou criptas aberrantes (FCA). Alguns FCA, em especial aqueles com características displásicas, podem evoluir para adenomas ou adenocarcinomas (Perse e Cera, 2011; Suzui et al., 2013; Clapper et al., 2020).

Pesquisas sugerem que a exposição recorrente a um agente químico específico inicia e/ou promove o desenvolvimento de lesões proliferativas, através de mutações e falha de reparo do DNA, levando à proliferação celular e formação de cripta aberrante (CA). Preferencialmente, utiliza-se um agente carcinogênico que pode levar a lesões no DNA, de forma direta ou indireta, e através da via de resposta ao estresse oxidativo e/ou toxicidade, sendo um gatilho para desenvolvimento de FCA e sua evolução para o CCR (Greenfield et al., 1984; Tomasetti et al., 2017).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito a azoximetano (AOM) são os agentes químicos mais utilizados para o estudo desta neoplasia experimental. A DMH é um membro da classe das hidrazinas, constituída de dois isômeros que podem ser administrados por via subcutânea, intraperitoneal ou intrarretal, levando ao aparecimento de tumores malignos (Laqueur, 1965). O DMH é metabolizado no fígado, formando o AOM, e depois o metilazoximetanol (MAM). Como este último é instável à temperatura corporal, se decompõe em formaldeído, água e nitrogênio e um íon alquilante (metildiazônio). Este último, por sua vez, gera um íon carbônico reativo que promove a alquilação das macromoléculas de DNA, RNA e proteínas dos colonócitos, processo bastante crítico na mutagênese e carcinogênese (Bekusova et al., 2021).

A efetividade do DMH como carcinógeno é observada por meio da identificação de displasia epitelial e lesões pré-cancerosas em 100% dos animais, quando administrada por via subcutânea em roedores (Karaca et al., 2012). Observa-se o desenvolvimento de adenoma e adenocarcinoma após administração de dose subcutânea única ou múltipla de DMH em modelos experimentais (Pozharisski, 1975; Venkatachala et al., 2020). Em roedores, assim como nos tumores de cólons humanos, as enzimas óxido nítrico sintase (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas ficam aumentadas no cólon após a indução da carcinogênese em ratos pela AOM (Takahashi e Wakabayashi, 2004; Venkatachala et al., 2020).

Dentre os fatores promotores do adeno-carcinoma colorretal, estudos evidenciam a dieta hipercalórica (DHC) como um fator relevante, visto que favorecem a formação de altas concentrações de ácidos biliares no lúmen do intestino grosso, o que leva a citotoxicidade e hiperproliferação de colonócitos, aumentando o risco de desenvolvimento tumoral (Ocvirk et al., 2019). Destaca-se também que a DHC, associada ou não a administração de DMH/AOM, promove o desenvolvimento neoplásico, com modulação nas vias de sinalização celular relacionadas à proliferação celular e apoptose em roedores (Yang et al., 2022). Além disso, a DHC está relacionada ao aumento da multiplicidade de FCA induzidos pela DMH (Chen e Huang, 2015). Lopes e colaboradores (2016) mostraram que a ingestão de dieta hiperlipídica durante as fases de gestação, lactação e fase juvenil aumenta a susceptibilidade da prole de ratos machos a carcinogênese de cólon induzida pela DMH.

Por fim, devido à grande incidência de CCR na população humana, cresce a importância de estudos pré-clínicos, utilizando diferentes modelos de carcinogênese de cólon em roedores (Corpet e Pierre, 2005). Tais modelos são ferramentas importantes para a análise da influência de fatores ambientais e da dieta, com o objetivo de se buscar novas opções terapêuticas e de sua prevenção (Roncucci e Mariani, 2015; De Souza e Costa-Casagrande, 2018). Observa-se em diversos estudos experimentais, o aumento de FCA e proliferação celular no cólon de roedores que receberam uma DHC (Caderni et al, 1996; Poulsen et al, 2001; Dragsted et al., 2002).

1.5 Quimioprevenção do câncer

A pesquisa de agentes quimiopreventivos aumentou devido ao crescente número de informações sobre os mecanismos de desenvolvimento e detecção de alvos moleculares que impedem ou retardam o processo de carcinogênese (George e Chandran, 2021). Os quimiopreventivos são compostos naturais ou sintéticos usados para evitar/retardar o aparecimento da neoplasia, seu desenvolvimento ou recidiva (Steward e Brown, 2013). Esses agentes são relevantes para pacientes geneticamente predispostos, para aqueles que são sensíveis às causas ambientais do CCR e para aqueles que apresentam uma lesão precursora (George e Chandran, 2021). Dessa forma, o quimiopreventivo pode ser bloqueador da ação do carcinógeno no DNA celular ou supressor das vias de proliferação e progressão do tumor colorretal; deve demonstrar pouca ou nenhuma toxicidade, ter boa eficácia em múltiplos alvos; administrado preferencialmente por via oral e apresente mecanismos de ação conhecidos. Esses agentes deverão permitir a administração por longos períodos em pacientes saudáveis e idosos, bem como para outros com comorbidades (Manzano e Pérez-Segura 2012; Benetou et al., 2015; George e Chandran, 2021). O quimiopreventivo pode atuar através de diferentes mecanismos associados à modulação de cascatas de sinalização e expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular e na supressão da inflamação, metástase ou angiogênese (Pan et al., 2011).

Atualmente a prevenção do câncer tem sido o principal alvo para combatê-lo de forma eficaz. Estudos evidenciam que mudanças na dieta e estilo de vida, levam à redução de até 70% no risco de desenvolvimento do CCR. (Giovannucci, 2002; Curry et al., 2003; González-

Vallinas et al., 2013). Nos últimos anos considerável atenção foi dada ao uso de substâncias naturais que tenham atividade quimiopreventiva. O antioxidante natural carnosina - CAR pertence a esta classe de moléculas que comprovadamente apresentam uma atividade anticancerígena significativa, tanto *in vitro* como *in vivo*. A L-carnosina (β -Ala-His) é um dipeptídeo sintetizado endogenamente e amplamente encontrado no cérebro, rins, estômago e, em grandes quantidades, na musculatura esquelética. A CAR é sintetizada pela enzima carnosina sintase, cuja atividade é regulada pelos seus próprios aminoácidos precursores e a β -alanina é o seu aminoácido limitante para a sua síntese no músculo esquelético (Boldrev et al., 2013; Iovine et al., 2014; Blancquaert et al., 2017; Saunders et al. 2017). Sua principal atribuição se dá pelo alto potencial terapêutico, com principal característica o efeito antioxidante, além de possuir adicionalmente, propriedades quelantes de metais e anti-inflamatória (Grasso et al., 2021; Distefano et al., 2022). Estudos comprovam a eficácia de redução do estresse oxidativo eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), capacidade de quelar íons metálicos e tamponamento de prótons, propriedades anti-inflamatórias e anti-senescência (Ghodsí et al., 2018; Chmielewska et al., 2020; Aldini et al., 2021; Jukić et al., 2021). Outro aspecto do efeito da L-carnosina diz respeito ao seu efeito antiproliferativo nas linhagens celulares de tumores humanos. Estudos anteriores mostraram que a L-carnosina inibe a proliferação de células de carcinoma colorretal humano, afetando a produção de ATP e EROs (Guiotto et al., 2005; Iovine et al., 2012; Iovine et al., 2014; Kubota et al., 2020; Jukić et al., 2021).

Giancarlo Aldini, professor e pesquisador da Universidade de Milão, demonstra larga experiência com esta substância. Em uma de suas primeiras experiências aplicadas demonstrou a capacidade da CAR em sequestrar EROs que apresentam Carbonila Reativa (ECRs) atribuída ao resíduo de histidina. Recentemente o grupo referenciado, aplicou em humanos obesos, um derivado sintético da carnosina, a CAR (FL-926-16) que tem como principal característica a resistência à ação da enzima carnosinase, responsável pela degradação da CAR em alanina e histidina (Aldini et al. 2005; Aldini et al. 2007; Orioli et al. 2007; Song et al., 2014; Baye et al. 2016; Regazzoni et al., 2016; Iacobini et al., 2018; Aldini et al., 2021).

2. Justificativa, hipótese e objetivos:

Devido à alta incidência de CCR no mundo decorrente do estilo de vida moderno adotado pela população, fazem-se necessárias medidas de prevenção e estudos envolvendo compostos com potencial preventivo e conhecimento de seus mecanismos de modulação de vias moleculares envolvidas nas diferentes etapas do seu desenvolvimento. O consumo de dieta rica em gorduras e carboidratos simples tem sido associado ao risco de desenvolvimento do CCR, dessa forma, a avaliação de uma dieta hipercalórica em períodos de pré e pós concepção tem sido pouco explorados quanto ao risco de adeno-carcinoma CCR em seus descendentes. Assim sendo, os objetivos do estudo foram: avaliar os efeitos da ingestão materna de dieta hipercalórica (rica em gorduras e açúcares simples), durante as fases de pré e pós-concepção, sobre danos na mucosa colônica induzida pelo carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) na prole F1 de ratas da linhagem *Sprague-Dawley*; e avaliar os efeitos quimiopreventivos da CAR administrada antes e durante a administração da DMH na prole F1 de ratas *Sprague-Dawley*.

3. Metodologia

3.1 Animais e ambiente de experimentação

Antes do início desta pesquisa, todos os procedimentos e respectivo protocolo experimental foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biotecnologia de Botucatu (IBB/UNESP) sob o protocolo CEUA Nº 1142200721.

Ratos da linhagem *Sprague-Dawley* (SD), machos (n= 15) e fêmeas (n= 40) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas – SP). Os animais foram obtidos com três semanas de idade e, previamente ao início do protocolo, foram climatizados durante 2 semanas às condições do biotério de roedores do setor de Morfologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (DBEF) do IBB-Unesp – Botucatu, SP.

Durante o período experimental, foram mantidos cinco animais por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. As gaiolas juntamente com a maravalha foram trocadas duas vezes por semana seguindo protocolo pré-estabelecido. As condições ambientais

da sala de experimentação, tais como de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), fotoperíodo (ciclos 12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar foram rigorosamente controladas durante toda a fase de crescimento e experimentação.

As fêmeas inicialmente divididas em 2 grupos, receberam ração normocalórica (grupo DNC, n=20) ou ração hipercalórica (grupo DHC, n=20) (Tabela 1), durante a fase de crescimento e pré-concepção. Bem como submetidas a coletas de sangue da cauda, para dosagem de glicose e triglicerídeos. Após atingir a idade reprodutiva (90 dias), duas fêmeas virgens foram colocadas com um macho/gaiola por 12 horas (período escuro). A presença de esperma no esfregaço vaginal e identificação da fase estro do ciclo foi considerado como dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram colocadas em gaiolas individual e continuaram com a mesma dieta inicial (grupo DNC ou DHC), no período pré-concepção até o dia pós-natal DPN21 e final da lactação. Após o desmame, as proles de fêmeas (F1) mantiveram a mesma dieta materna até o DPN32, dia destinado a eutanásia. As formulações das rações se encontram descritas na Tabela 1 e o delineamento experimental está representado na Figura 3.

Tabela 1. Formulações das rações experimentais. *

Componentes	Dieta (g/Kg)	
	Normocalórica (DNC)	Hipercalórica (DHC)
Proteína	220	235
Amido de milho	554	202
Sacarose	-	202
Óleo de soja	40	-
Óleo de milho	-	50
Banha de porco	-	200
Fibra	70	50
Mix de minerais	90	90
Mix de vitaminas	10	10
Total (g)	1000	1000
Total (kcal/kg)	3456	4806

* As rações foram baseadas na ração AIN 93G e fornecidas pela empresa Pragsoluções Biotecnologia, Brasil.

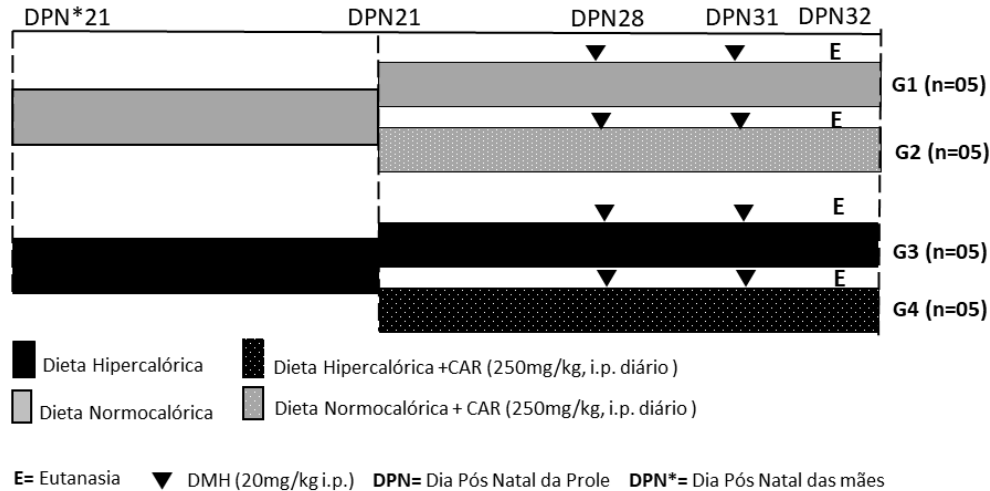


Figura 3. Delineamento experimental.

A prole gerada F1 (uma fêmea/ninhada/por grupo), foi subdividida em 4 subgrupos distribuídos em: G1 (n=5) e G2 (n=5), sendo que ambos ingeriram a dieta normocalórica e 2 insultos de DMH (20 mg/kg i.p.) e o G2 recebeu a CAR (250 mg/kg i.p.) durante 10 dias subsequentes (Aydin et al., 2017). Os grupos G3 (n=5) e 4 (n=5) receberam a dieta hipercalórica, mais 2 insultos de DMH (20 mg/kg i.p.) e o G4 recebeu também a CAR (250 mg/kg i.p.) durante 10 dias (Decaens et al., 1989). As doses de DMH foram administradas no DPN 28 e DPN 31. A carnosina utilizada é um derivado sintético (resistente à ação da carnosinase) fornecida pela empresa italiana *Flamma S.p.A. Italia*, em parceria com um pesquisador da Universidade de Milão. As eutanásias ocorreram no DPN32.

3.2 Eutanásia dos animais

Após a anestesia com ketamina/xilazina (30mg/kg e 180mg/kg de peso corpóreo, respectivamente), amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção cardíaca, com posterior eutanásia dos mesmos pela secção da veia cava inferior. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C e as amostras de plasma resultantes foram armazenadas em freezer à -20°C.

3.3 Coleta do intestino grosso e fígado dos animais

Após a eutanásia dos animais foi feita uma incisão na face ventral do animal ao longo da linha média, da região pélvica até o final da cavidade abdominal, para coleta do fígado e intestino grosso. Após a ressecção do osso púbico com exposição do reto, o intestino grosso foi removido e aberto pela linha mesentérica, com uma tesoura. O intestino grosso de cada animal foi lavado com solução de NaCl 0,9% (RNA free) para a retirada dos resíduos fecais, pesados e presos em prancha de isopor identificadas por 24 horas. Em seguida, foi dividido em três segmentos (proximal, medial e distal), e a mucosa de cerca de 2 cm do segmento distal foi raspada, armazenada em criotubo (RNA free) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em biofreezer -80°C para análise de expressão gênica. Os segmentos do intestino grosso foram fixados, abertos e presos à prancha de isopor identificada, por 24 horas. Após esse período de fixação, foram lavados em água corrente por 12 horas e então armazenados em álcool 70% até a realização das análises histológicas, histoquímica e imunohistoquímicas.

3.4- Análises bioquímicas e de estresse oxidativo

Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicérides foram analisados por espectrofotometria usando kits comerciais e seguindo as recomendações dos fabricantes (Bioclin, Quibasa – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). A peroxidação lipídica foi avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA) analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLTA). Amostras de colón medial (~ 100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato gelado pH 6,5 na razão de 1:5 e, então, foram centrifugadas por 5 min a 3500 rpm. Em 5 mL de cada amostra foi adicionado 25 mL de ácido fosfórico (1,22 mol/L), 45 mL de água deionizada e 25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%). O material em reação foi incubado por 1 hora em banho maria a 95°C e então resfriado em banho de gelo a 4°C (Young e Trimble 1991). Então, para 20 mL de cada amostra foi adicionado 36 mL de metanol e 40 mL de hidróxido de sódio (1 mol/L), sendo o material passado em filtro Millipore. Então, as amostras foram injetadas e passaram por coluna ODS RP18 (VC-250 mm × 4.6 mm) com 25 mmol/L de tampão fosfato 50:50 (v/v) e pH 6,5. O metanol foi a fase móvel em taxa de fluxo de 0,8

mL/min. A detecção fluorimétrica foi realizada em λ_{exc} 532 nm e λ_{emm} 553 nm, usando o detector de modelo RF-10AXL (Shimadzu, Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/mL}$ e o pico de detecção dos adutos MDA-TBA foi calibrado com uma solução padrão de 1,1,3,3 tetraetoxipropano em quantidades equimolares de MDA.

Em homogenizados de amostras do cólon distal (600 μL) foram acrescentados 5% de ácido tricloroacético gelado e centrifugadas a 300 rpm por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para avaliar o conteúdo de glutathiona em espectrofotômetro com leitura em 412 nm (Biochrom, Libra 522, Berlin, Alemanha). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mL}$ utilizando uma curva padrão com cisteína (2 mmol/L) para glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) (Sedlak and Lindsay 1968).

3.5 Análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica

Cortes histológicos de espessura entre 4-6 μm foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2145, Alemanha), colocados sobre lâminas codificadas (normais ou silanizadas) e, então, levadas para estufa (FAMEN 002 CB, Brasil) à 60°C por 24 horas. Em seguida, as lâminas foram submetidas a várias colorações e reações de imunohistoquímica.

Os cortes dos fragmentos do cólon foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (Bancroft e Gamble, 2008) para análise morfológica geral e análise da altura das criptas intestinais (mm), analisadas em microscópio de luz acoplado ao sistema analisador de imagens (CellSens Standard Imaging System, Olympus, Japão). Outros cortes histológicos foram corados com azul de Alcian/ácido periódico de Schiff, para distinguir entre células epiteliais colônicas secretoras de mucina neutra (magenta), ácida (azul) e mista (roxa). Para distinguir entre os dois tipos de mucinas ácidas, as lâminas foram coradas com azul de Alcian/Aldeído fucsina; para distinguir células secretoras de mucinas contendo ácido siálico (azul), sulfato (roxo) ou ambas (roxa escura/azul) (Bancroft e Gamble, 2008). Células colônicas secretoras de mucinas contendo ácido siálico e sulfato foram referidas como sialomucinas e sulfatomucinas ou mistas. Terminada as colorações, as lâminas foram levadas para a montagem de lamínulas (24x32mm) em meio *Permount* (Fisher, EUA).

A expressão de Ki-67 (marcador de proliferação celular) foi detectada pela técnica imunohistoquímica. Os cortes histológicos (4 μm) da mucosa colônicas em lâminas cobertas

com silano foram desparafinizadas e reidratados em uma série graduada de xileno-álcool. Em seguida, as lâminas foram submetidas a recuperação de antígeno em tampão citrato 0,01 M (pH 6,0, 120°C) em uma Câmara de Pressão Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca). Após bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 10% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (10min), as lâminas foram imersas em leite desnatado a 1% em PBS (60 min) e posteriormente incubado com anti-Ki-67 anticorpo primário em câmara umidificada (durante a noite, 4 ° C). Em seguida, as lâminas foram incubadas com polímero de peroxidase de rábano (HRP) de uma etapa (Dako Cytomation, Dinamarca) (30 min). A coloração foi feita com o cromógeno 3-diaminobenzidina (DAB) (5 min) (Sigma–Aldrich, EUA) e contra coloração em hematoxilina de Harris (1 min).

As células epiteliais Ki-67 positivas foram contadas em pelo menos 20 criptas/segmento/animal nos diferentes grupos experimentais. Os valores dos índices de marcação de Ki-67 foram determinados dividindo-se o número de células Ki-67 positivas ou células em apoptose pelo número de células analisadas (2000 células), multiplicando-se por 100.

Obs: Foram utilizados os seguintes reagentes: anticorpo policlonal IgG de camundongo anti-Ki-67 (ABCAM, EUA).

3.6 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: “*Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*” (Bustin et al., 2009).

O RNA total foi extraído de fragmentos do cólon medial utilizando o kit comercial, *RNeasy* Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria com base na densidade óptica (OD) obtida na leitura em absorvância à 260 nm (específica para ácidos nucleicos), com o equipamento NanoVue (GE, EUA). Esse também permitiu avaliar a contaminação das amostras de RNA total pela aferição das razões de absorvância a 260/280nm e 260/230nm que indicam a presença residual de proteínas e compostos orgânicos, respectivamente.

A qualidade do RNA total foi verificada após a eletroforese capilar, através da avaliação do número de integridade do RNA (RNA *Integrity Number*, RIN). O RIN foi obtido a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, através do sistema 2100 Bioanalyzer (©Agilent Technologies, EUA) (Fleige e Pfaffl, 2006; Becker et al., 2010).

A transcrição reversa do RNA total extraído de cada amostra de cólon medial foi realizada com o kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Master Mix*” (Life Technologies, EUA). Esse kit contém “primers” randômicos e poli-(T) que se anelam e retro-transcrevem todos os RNAs transcritos do genoma, juntamente com a enzima transcriptase reversa. Além disso, também contém todos os demais componentes necessários para a conversão quantitativa de RNA total em cDNA com alto rendimento, linearidade e precisão.

A reação de transcrição reversa e condições de ciclagem foram realizados seguindo as instruções do fabricante. Para a reação utilizou-se 4 µL de Master Mix ao qual foi adicionado 1 µg de RNA e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases. Essa mistura foi incubada em termociclador (Biometra, EUA) nas seguintes condições: 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 30 minutos seguido pela inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 minutos.

Foram utilizados os kits “*TaqMan® Low Density Array*” (TLDA) (Life Technologies, EUA) que abrange a análise da expressão de 95 genes envolvidos em processos de proliferação celular, apoptose e vias de ativação da β-catenina (Anexo 1).

As placas contêm 384 poços com “primers” e sondas de hidrólise específicos liofilizados que permitem a identificação de 95 mRNAs pré-selecionados. Esse sistema dispensa a realização de réplicas da PCR pois apresenta variações do instrumento e manipulação dos líquidos mínimos, como demonstrado por Mestdagh et al. (2012). Para cada placa, foram utilizados 450 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), 6 µL do produto da reação de transcrição reversa (cDNA) e o volume final foi ajustado para 900 µL com água livre de nucleases. Os genes de referência foram selecionados através da placa “*Rat Endogenous Control Array*” (Life Technologies, EUA) que analisa 4 genes endógenos ao mesmo tempo (*GAPDH*, *HPRT*, *GUSB*, *ACTB*).

As reações de RT-qPCR foram realizadas no aparelho ViiATM7 Real-time PCR System (Life Technologies, EUA), com as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores de C_q foram

calculados utilizando o software SDS 2.1, utilizando a configuração automática de “baseline” e “threshold”. O ciclo de quantificação (Cq) refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo “baseline” e o “threshold” (de acordo com o RDML, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org)). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo. Todos os dados de expressão gênica obtidos pela metodologia TLDA foram analisados com o software “Expression Suite v1.0.3” (Life Technologies, USA). Genes diferencialmente expressos entre os grupos experimentais foram aplicados o fold change estatístico de $\text{Log}_2 \text{Fold Change} \geq |1,3| \leq |0,66|$ e o valor-p $< 0,05$. Os genes selecionados para a análise de expressão gênicas estão na Tabela 1 presente no Anexo 1.

3.7 Enriquecimento funcional da via gênica

Para uma melhor compreensão dos efeitos da dieta hiperlipídica associada ou não com a administração da carnosina no câncer de cólon retal induzido pelo DMH as análises de enriquecimento foram feitas em 3 comparações: G1 x G3, G1 x G2 e G3 x G4. Primeiramente os genes diferencialmente expressos (up e down regulados) de cada comparação foi submetida à uma análise de enriquecimento funcional de rede de interação de proteína- proteína na ferramenta STRING (<https://string-db.org/>). Foram utilizadas as seguintes configurações para as fontes de interações ativas: textmining, experimentos, bancos de dados e co-ocorrência. O score mínimo de interação requerida foi de 0.400 (média confiança) e os todos os nodos desconectados da rede foram ocultados para facilitação da visualização do resultado. O p-valor utilizado na análise de rede de interação de proteína- proteína foi oferecido pelo STRING (Szklarczyk et al., 2015).

Em seguida foi utilizado o banco de dados Bioplanet pela ferramenta Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) para comparar os genes clusterizados pela ferramenta STRING com bancos de dados de amostras humanas de câncer de cólon retal (Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016). A análise de enriquecimento de cada comparação pode ser visualizada no material suplementar 1. Posteriormente, os genes que foram enriquecidos pelo banco de dados Bioplanet foram validados em in silico no banco de dados The Human Protein Atlas (HPA) (<https://www.proteinatlas.org/>), mostrando a distribuição e a localização destes

genes em amostras de tecido normal e de tumor de cólon retal por imunohistoquímica (Uhlén et al.,2005).

3.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos diferentes parâmetros foram comparados entre os grupos experimentais utilizando o teste de ANOVA seguido por de Tukey. O nível de significância adotado será de $p < 0.05$. A expressão de genes foi analisada pelo teste t de Student, usando o Expression Suite Software v1.0.3 (Life Tecnologias, EUA). A significância estatística foi estabelecida como $P < 0,0$. As análises estatísticas e os gráficos de barras foram feitos com a utilização do GraphPad Prism® 350 software version 8.0.1, Graph Pad, Inc., San Diego, CA).

4. Resultados

4.1. Peso (massa) corpóreo e consumo de ração das progenitoras (F0)

A Tabela 2 apresenta os valores de média e desvio padrão de peso corpóreo materno, antes e após concepção, bem como o ganho de peso corpóreo das fêmeas (F0). As fêmeas que receberam a dieta hipercalórica (DHC) no período de pré, pós-concepção e lactação não tiveram alterações na evolução de peso corpóreo e no ganho de peso, quando comparado com o grupo de fêmeas que recebeu a dieta normocalórica (DNC). No entanto, observou-se uma diminuição do consumo de DHC nas fases de pré, pós concepção e lactação (~38%), comparado com o grupo que recebeu a DNC.

A Tabela 3 apresenta os dados da evolução do peso corpóreo, peso hepático absoluto e relativo, bem como os dados bioquímicos séricos das proles de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. O DPN21, representa o dia do desmame e o DPN 32 a eutanásia das fêmeas, 24 horas após a segunda aplicação da DMH.

Ao desmame, as ninhadas de fêmeas dos grupos de DNC e DHC (G1 a G4) apresentaram valores médios de peso corpóreo. No DPN32, as fêmeas dos grupos DMH+DHC (G3) e DMH+DHC+CAR (G4) apresentaram menor peso corpóreo e ganho de peso (entre o DPN 21 ao 32) em comparação aos mesmos grupos alimentados com DNC (G1 e G2). Neste mesmo período, o peso corpóreo das fêmeas dos grupos DMH+DNC+CAR (G2) e

DMH+DHC+CAR (G4) foram maiores em relação aos grupos DMH+DNC (G1) e DMH+DHC (G3), respectivamente, após o segundo insulto de DMH. Em relação ao peso hepático, o peso absoluto foi maior, enquanto, o peso relativo foi menor no grupo de fêmeas do grupo DMH+DNC+CAR (G2) em relação ao grupo de fêmeas DMH+DNC (G1).

Os níveis séricos de triglicérides e colesterol foram maiores nas fêmeas do grupo DMH+DHC (G3) em relação ao grupo DMH+DNC (G1). O tratamento com carnosina (CAR) reduziu os níveis séricos de triglicérides e colesterol nas fêmeas do grupo DMH+DHC+CAR (G4) em relação ao grupo DMH+DHC (G3).

Tabela 2. Dados de evolução de peso corpóreo nas fases de pré e pós-concepção dos grupos de fêmeas SD (F0) que receberam dieta normocalórica (DNC) ou dieta hipercalórica (DHC)¹.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	DNC	DHC
Preconcepção		
Peso Corpóreo (g) (n=15)		
DPN 21	60,3 ± 7,2	59,5 ± 4,7
DPN 90	253,4 ± 13,7	256,4 ± 24,7
Ganho	193,1 ± 15,5	197,0 ± 26,3
Consumo de ração (g/rato/dia)	18,6 ± 2,6 ^a	12,2 ± 2,1 ^b
Pós-Concepção (Gestação)		
Peso Corpóreo (g) (n=10)		
DG 1	286,2 ± 32,9	280,3 ± 35,4
DG21	382,8 ± 35,3	365,3 ± 37,0
Consumo de ração (g/rato/dia)	26,4 ± 2,3 ^a	15,6 ± 1,60 ^b
Lactação		
Peso Corpóreo (g) (n=8)		
DPN 1	306,8 ± 21,7	297,8 ± 30,9
DPN 21	262,6 ± 29,4	258,2 ± 32,8
Consumo de ração (g/rato/dia)	37,9 ± 3,66 ^a	26,4 ± 2,78 ^b

Dados estão expressos em Média ± SD; N= número de animais por grupo; Letras diferentes significam diferença estatística, aplicando-se o Teste t de Student.

4.2. Peso (massa) corpóreo, consumo de ração, pesos (massas) hepáticos da prole de fêmeas SD (F1)

A Tabela 3 apresenta os dados da evolução do peso corpóreo, peso hepático absoluto e relativo, bem como os dados bioquímicos séricos das proles de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. O DPN 21, representa o dia do desmame e o DPN 32 a eutanásia das fêmeas 24 horas após a segunda aplicação da DMH.

Tabela 3. Dados de evolução de peso corpóreo, pesos hepáticos e bioquímicos séricos dos diferentes grupos de fêmeas SD (F1) que receberam dieta normocalórica ou dieta hipercalórica, com insultos de DMH e com ou o tratamento de carnosina¹.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	DNC+DMH (G1)	DNC+DMH+CAR (G2)	DHC+DMH (G3)	DHC+DMH+CAR (G4)
Peso Corpóreo (n=8)				
DPN 21	46,6 ± 4,7	40,8 ± 9,1	45,1 ± 6,7	44,1 ± 7,7
DPN 32	85,3 ± 10,5	92,8 ± 8,0 ^{ab}	66,8 ± 9,1 ^{ab}	80,5 ± 11,1 ^b
Ganho (g)	40,8 ± 9,1	48,3 ± 6,0 ^{ab}	21,7 ± 5,1 ^{ab}	36,4 ± 4,5 ^b
Peso Hep. Absoluto (g)	3,9 ± 0,5	4,1 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,4	3,6 ± 4,5
Peso Hep. Relativo (g)	4,6 ± 0,9	4,4 ± 0,4 ^a	5,2 ± 0,8	4,6 ± 0,7
Análises Séricas (n=6)				
Glicose (mg/dL)	64,5 ± 16,4	55,5 ± 12,7	78,7 ± 9,4	66,5 ± 19,5
Triglicerídeos (mg/dL)	60,5 ± 8,70	55,3 ± 11,8	82,5 ± 19,9 ^{ab}	67,3 ± 6,8 ^b
Colesterol (mg/dL)	63,7 ± 11,1	58,5 ± 11,0	85,3 ± 15,4 ^{ab}	69,5 ± 11,0 ^b

Dados estão expressos em Média ± SD; ² DMH= 1,2 dimetilhidrazina (2x 20mg/kg, i.p.), CAR= Carnosina (250 mg/kg, i.p.); a – significa diferença estatística para comparações em relação ao grupo G1, b - significa diferença estatística para comparações em relação ao grupo G4. A Teste estatístico ANOVA seguida de Tukey p<0,05.

Ao desmame, as ninhadas de fêmeas dos grupos de DNC e DHC (G1 a G4) apresentaram valores médios de peso corpóreo similares. No DPN32, as fêmeas dos grupos DMH+DHC (G3) e DMH+DHC+CAR (G4) apresentaram menor peso corpóreo e ganho de peso (entre o DPN 21 ao 32) em comparação aos mesmos grupos alimentados com DNC (G1 e G2). Neste mesmo período, o peso corpóreo das fêmeas dos grupos DMH+DNC+CAR (G2) e DMH+DHC+CAR (G4) foram maiores em relação aos grupos DMH+DNC (G1) e DMH+DHC (G3), respectivamente, após o segundo insulto de DMH. Em relação ao peso

hepático, o peso absoluto foi maior, enquanto, o peso relativo foi menor no grupo de fêmeas do grupo DMH+DNC+CAR (G2) em relação ao grupo de fêmeas DMH+DNC (G1).

Os níveis séricos de triglicérides e colesterol foram maiores nas fêmeas do grupo DMH+DHC (G3) em relação ao grupo DMH+DNC (G1). O tratamento com carnosina reduziu os níveis séricos de triglicérides e colesterol das fêmeas dos grupos que receberam a dieta hipercalórica, DMH+DHC+CAR (G4) em relação ao grupo DMH+DHC (G3).

4.3 Morfometria das criptas colônicas

A medida da altura das criptas colônicas foi realizada em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE). Após análise morfométrica, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) nas alturas médias das criptas colônicas do grupo que recebeu a dieta normocalórica, insultos de DMH e tratamento com carnosina (G2) e, adicionalmete o grupo que recebeu a dieta hipercalórica e insultos de DMH (G3) quando comparados ao grupo que recebeu a DNC (G1). Na comparação do grupo que recebeu a DHC (G3) observou-se um aumento da altura das criptas colônicas no grupo que recebeu carnosina associada a uma dieta hipercalórica (G4), ilustrada na Figura 4.

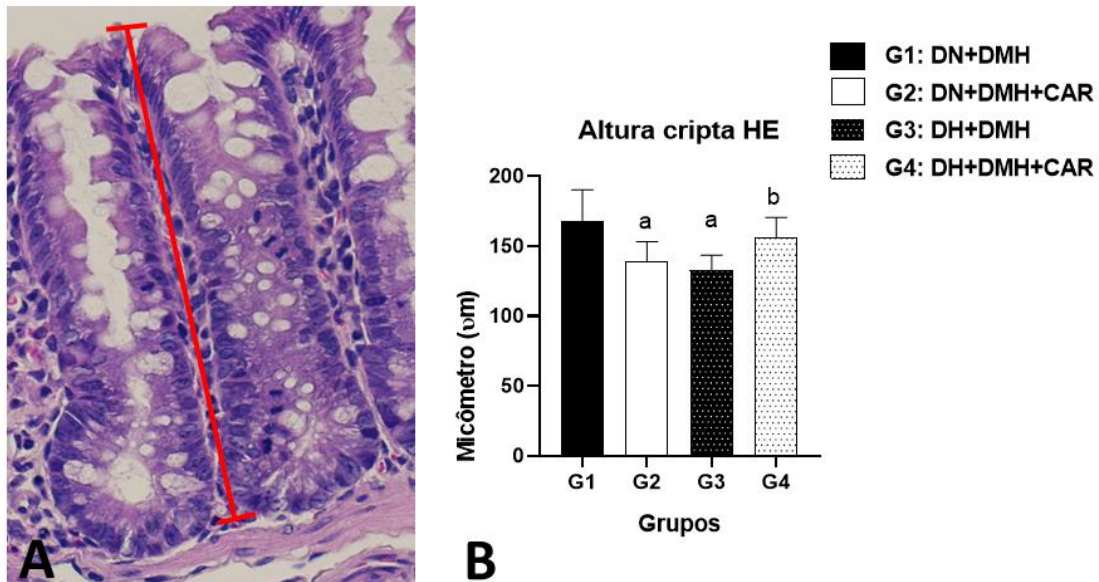


Figura 4. Imagem representativa e morfometria realizada em cortes histológicos de cólon. A) Imagem representativa de corte histológico do colón corado pela hematoxilina-eosina (HE), mostrando como foi feita a mediada da cripta intestinal (chave vermelha); B) Dados de média e desvio-padrão das medidas da altura das criptas intestinais nos diferentes grupos experimentais. DNC= Dieta normocalórica, DHC= Dieta hipercalórica, DMH=1,2-dimetilhidrazina, CAR= Carnosina. A letra a indica diferença em relação ao grupo G1 e b diferença em relação ao grupo G3, $p < 0,0001$, teste estatístico ANOVA seguida de Tukey.

4.4. Proliferação celular nas criptas colônicas

A análise de proliferação celular foi avaliada pela marcação imunohistoquímica de Ki-67 em criptas colônicas nos diferentes grupos experimentais. As análises indicam que houve uma redução significativa na proliferação celular em criptas colônicas no grupo que recebeu carnosina associada a DNC (G2) quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas a DNC (G1) (Figura 4). A DHC associada ao DMH (G3) não influenciou os níveis de proliferação celular nas criptas colônicas quando comparado ao grupo que recebeu a DNC (G1), enquanto o tratamento com a carnosina não alterou os níveis de proliferação celular no grupo que recebeu DHC e DMH (G3).

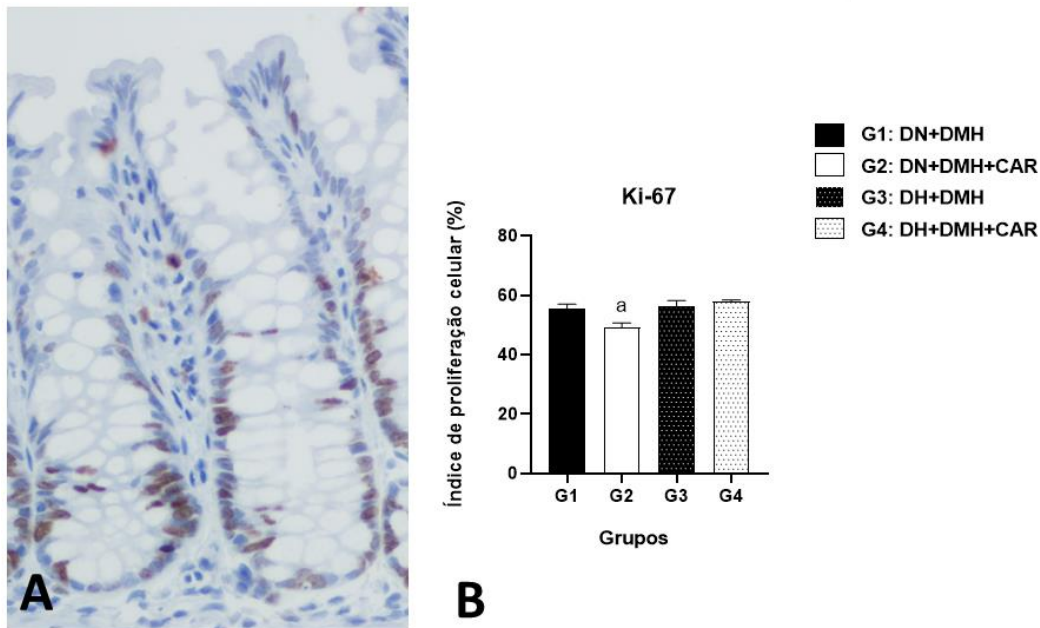


Figura 5. Análise de proliferação celular em cortes histológicos de cólon. A) Imagem representativa de corte histológico do cólon imunomarcado para o antígeno Ki-67 (núcleos marrons); B) Dados de média e desvio-padrão dos índices de marcação pelo Ki-67 das criptas intestinais nos diferentes grupos experimentais. DN= Dieta normocalórica, DH= Dieta hipercalórica, DMH=1,2-dimetilhidrazina, CAR= Carnosina. A letra a indica diferença em relação ao grupo G1 $p=0,0048$. Teste estatístico ANOVA seguida de Tukey.

4.5 Marcadores de estresse oxidativo na mucosa colônica

Os estudos não mostraram alterações dos grupos analisados quando observados os níveis de GSH (glutathiona reduzida) na mucosa dos animais F1. Quando avaliada a dosagem de GSSG (glutathiona oxidada) na mucosa colônica, observou-se uma diminuição dos níveis observados no grupo que carnosina associada à DHC e insultos de DMH (G4) quando comparado ao grupo que recebeu apenas a DHC e insultos de DMH (G3). Em relação aos níveis de MDA (malondialdeído) na mucosa colônica, não foram encontradas alterações significativas nos grupos considerados, observa-se os dados na Figura 6.

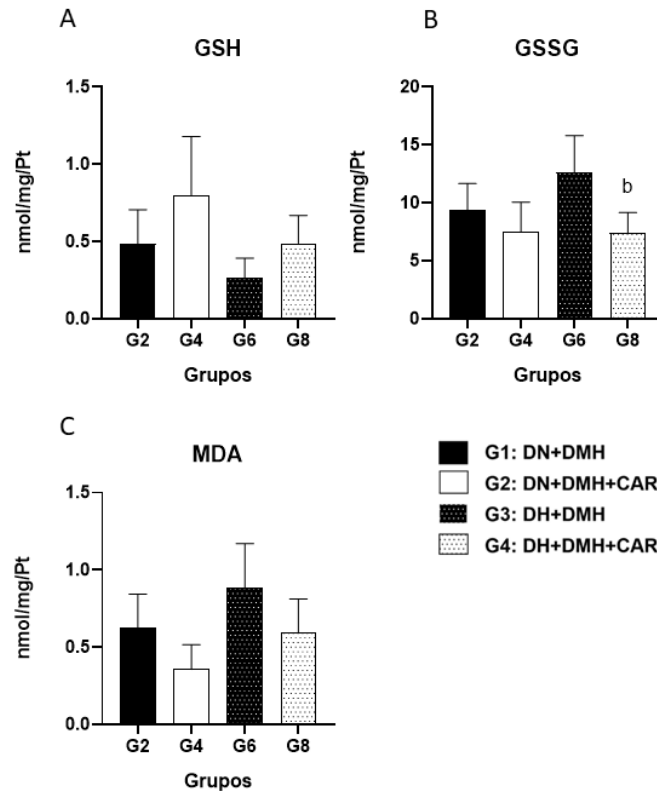


Figura 6. Análise de marcadores de estresse oxidativo em mucosa colônica. A- Dosagem de GSH (glutaciona reduzida). B- GSSG (glutaciona oxidada) $p=0,0186$. C- MDA (malondialdeído) em nmol/mg/proteína na mucosa colônica dos diferentes grupos experimentais. DN= Dieta Normocalórica, DH= Dieta Hipercalórica, DMH= 1,2 dimetilhidrazina (2x 20mg/kg, i.p.), CAR= Carnosina (250 mg/kg, i.p.). A letra b indica diferença em relação ao grupo G3. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey.

4.6 Análise de expressão gênica

A Tabela 4 apresenta os genes diferencialmente expressos na mucosa colônica dos grupos experimentais. Para a análise dos efeitos da dieta hipercalórica associada ao insulto de DMH foi realizada a comparação entre o grupo G1 x G3. Já para os efeitos da carnosina na dieta normocalórica com insulto de DMH foi realizada a comparação G1 x G2 e, para os efeitos da carnosina na dieta hipercalórica com insulto de DMH, foi feita a comparação G3 x G4. Na comparação G1 x G3 foram detectados 18 genes diferencialmente expressos: 14 genes que foram upregulados e 4 downregulados. Na G1 x G2 obtivemos 3 genes diferencialmente expressos: 2 upregulados e 1 downregulados. Na comparação G3 x G4 tivemos 5 genes

diferencialmente expressos: 3 upregulados e 2 downregulados. Os parâmetros utilizados para o enriquecimento de genes encontram-se no material suplementar 1.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na mucosa colônica dos diferentes grupos de animais DNC+DMH+CAR (G2), DHC+DMH+CAR (G4), comparados ao controle DNC+DMH (G1) e DHC+DMH (G3).

Gene	Gene name	Fold Change	P value
(G1)DNC+DMH	x		
(G3)DHC+DMH			
Akt3	AKT Serine/Threonine Kinase 3	1,983	0,033
Axin1	Axin 1	1,326	0,022
Bmp2	Bone Morphogenetic Protein 2	0,431	0,017
Braf	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	1,507	0,037
Casp3	Caspase 3	0,599	0,010
Ccne	Cyclin E1	1,950	0,009
Dcc	DCC Netrin 1 Receptor	8,119	0,002
Dlc1	DLC1 Rho GTPase Activating Protein	2,554	0,014
Figf	VEGFD, Vascular Endothelial Growth Factor D	2,080	0,024
Fos	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	0,232	0,008
Gja1	Gap Junction Protein Alpha 1	2,458	0,003
Hmox1	Heme Oxygenase 1	2,376	0,000
LOC100360342	MutS Homolog 6	1,733	0,027
Msh2	MutS Homolog 2	1,466	0,050

Myc	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	2,158	0,002
Tcf7l2	Transcription Factor 7 Like 2	0,487	0,009
Tgfb1	Transforming Growth Factor Beta 1	1,519	0,047
Wif1	WNT Inhibitory Factor 1	4,562	0,011
(G1)DNC+DMH x			
(G2)DNC+DMH+CAR			
Akt3	AKT Serine/Threonine Kinase 3	1,487	0,011
Birc5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	0,598	0,039
Mapk10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10	1,670	0,011
(G3)DHC+DMH x			
(G4)DHCxDMH+CAR			
Araf	A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	1,363	0,040
Gja1	Gap Junction Protein Alpha 1	0,577	0,030
Mapk1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	1,550	0,039
Nos2	Nitric Oxide Synthase 2	0,069	0,019
Pik3ca	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3- Kinase Catalytic Subunit Alpha	4,024	0,030

Grupos de animais que receberam DMH= 1,2 dimetilhidrazina (2x 20mg/kg, i.p.), CAR= Carnosina (250 mg/kg, i.p.). Os grupos foram comparados estatisticamente pelo teste T de Student. *Fold change* Log₂ Fold Change $|1,3| \leq |0,66$ e $p < 0,05$, foi considerado significativo.

4.7 Análise de clusterização e de vias enriquecidas pelos genes diferencialmente expressos

Assim que os genes diferencialmente expressos (14 genes upregulados e 4 genes downregulados) foram analisados pelo *String*, de acordo com as redes geradas, destacaram-se as vias mais fortemente enriquecidas no grupo que recebeu apenas a DNC (G1) comparado ao grupo que recebeu apenas a DHC (G3), foram elas: “*angiogênese, vias de sinalização de*

interleucina, via de sinalização PGDF, mapas de sinalização CCKR, via de feedback de p53, ativação de célula T, via de sinalização de apoptose, via doença de Huntington, via de receptor de liberação do hormônio gonadotrofina, via RAS, via de sinalização Wnt, ativação de células B, via de sinalização de TGFB, via p53” que estão representadas na Figura 7.

G1 x G3

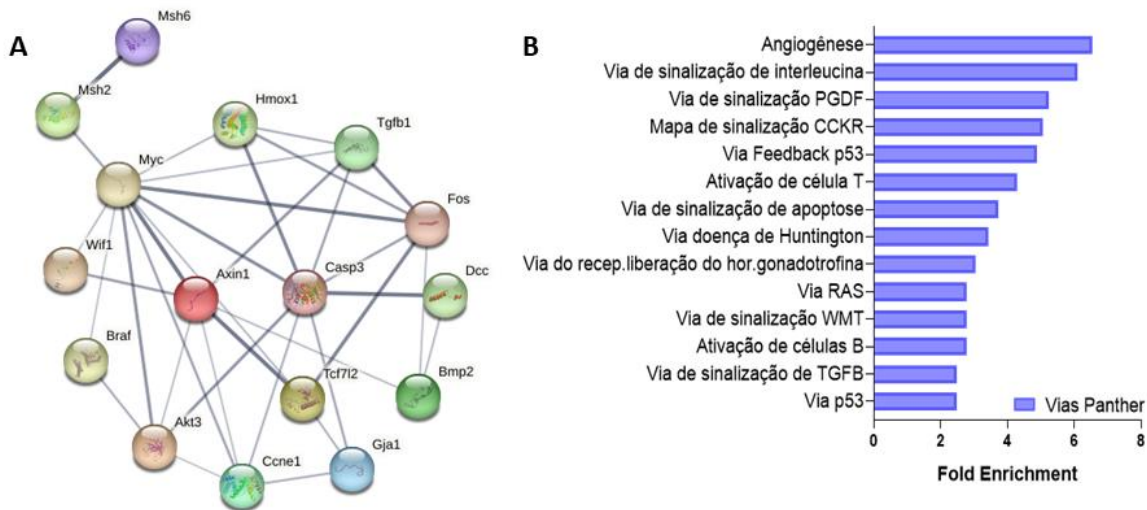


Figura 7. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no *String* dos grupos G1 (DNC+DMH) x G3 (DHC+DMH) e os termos enriquecidos pelo cluster. A- Redes de interação proteína-proteína geradas no *String* pelos genes diferencialmente expressos up e down regulados. **B-** Gráfico de barras representa os termos enriquecidos no *Panther* pelos genes up e down regulados.

Na comparação do grupo que recebeu a DNC (G1) com o grupo que recebeu a carnosina associada com a DNC (G2) foram observados 2 genes com expressão aumentada e um gene com expressão reduzida sendo que, com a posterior análise pelo *String*, mostram-se as vias mais fortemente enriquecidas “*Angiogênese, via RAS, ativação de células T, via de sinalização de FGF, via de sinalização de apoptose e via de sinalização de receptor EGFT cell activation, angiogenesis*” que encontram-se representadas na Figura 8.

G1 x G2

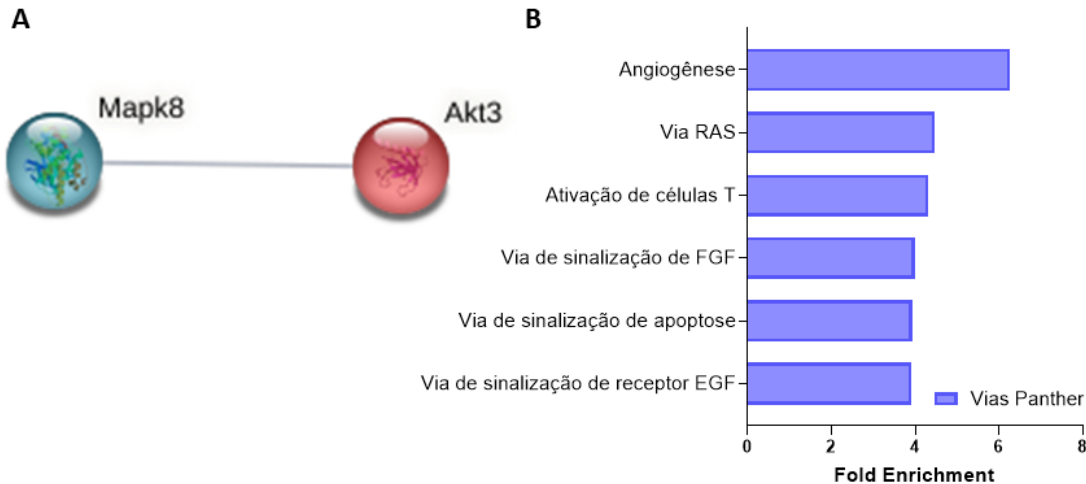


Figura 8. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no *String* dos grupos G1 (DNC+DMH) x G2 (DNC+DMH+CAR) e os termos enriquecidos pelo cluster. A- Redes de interação proteína-proteína geradas no *String* pelos genes diferencialmente expressos up e down regulados. B-Gráfico de barras representa os termos enriquecidos no *Panther* pelos genes up e down regulados

E por fim, na comparação do grupo que recebeu a DHC (G3) com o grupo que recebeu a carnosina associada com a DHC (G4), foram observados 3 genes com expressão aumentada e 2 genes com expressão reduzida e, após análise no *String*, as vias mais fortemente enriquecidas foram: “*vias de sinalização VEGF, vias RAS, ativação de célula B, via de sinalização de endotelina, ativação de célula T, via de sinalização de interleucina, via de sinalização FGF, via de sinalização de receptor EGF, via de sinalização de PDGF, angiogênese, via de sinalização de integrina, via de sinalização de inflamação por quimiocinas e citocinas, via PI3Kinase, via de sinalização de apoptose, mapa de sinalização CCKR*” que estão representadas na Figura 9.

G3 x G4

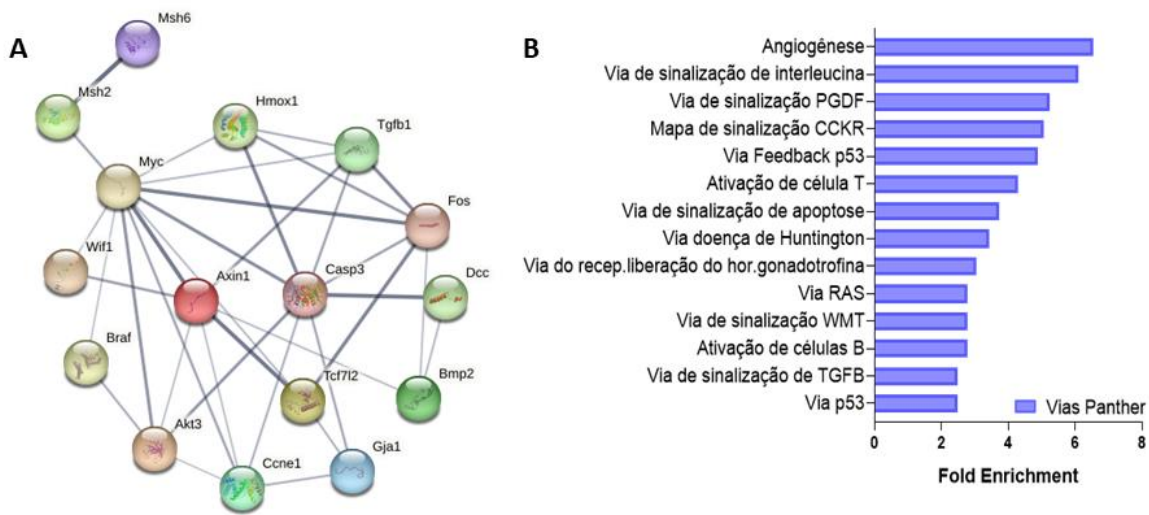


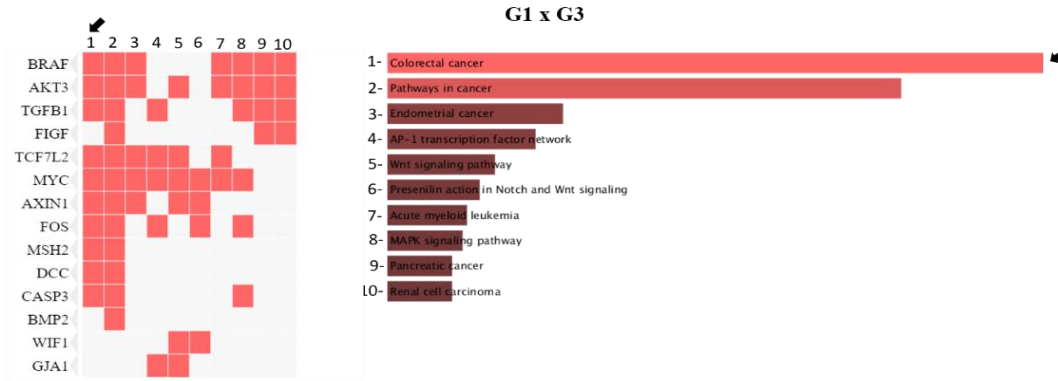
Figura 9. Representação das redes de interação proteína-proteína geradas no *String* dos grupos G3 (DH+DMH) x G4 (DHC+DMH+CAR) e os termos enriquecidos pelo cluster. A- Redes de interação proteína-proteína geradas no *String* pelos genes diferencialmente expressos up e down regulados. **B-** Gráfico de barras representa os termos enriquecidos no *Panther* pelos genes up e down regulados

Com base nesses resultados, identificamos o cluster de proteínas com vias fortemente alteradas sendo elas “angiogênese, via RAS, ativação de células T e via de sinalização de apoptose”.

4.8 Análises *in silico* dos genes diferencialmente expressos na iniciação da carcinogênese de cólon retal entre modelo de murinos e amostras humanas

Para fornecer mais informações sobre o papel da DHC no modelo de carcinogênese colorretal, foram comparados os dados obtidos no estudo realizado dos grupos G1 x G3 com dados de pacientes com câncer colorretal e obteve-se o Clustergrama gerado pelo Enrichr. Foram identificamos genes comumente expressos com diferentes expressões, foram eles “AKT3, TGFB1, TCF7L2, MYC e AXIN”, mostrados na Figura 10, a análise com maiores detalhes pode ser visualizada no material.suplementar 1.

A-



B-

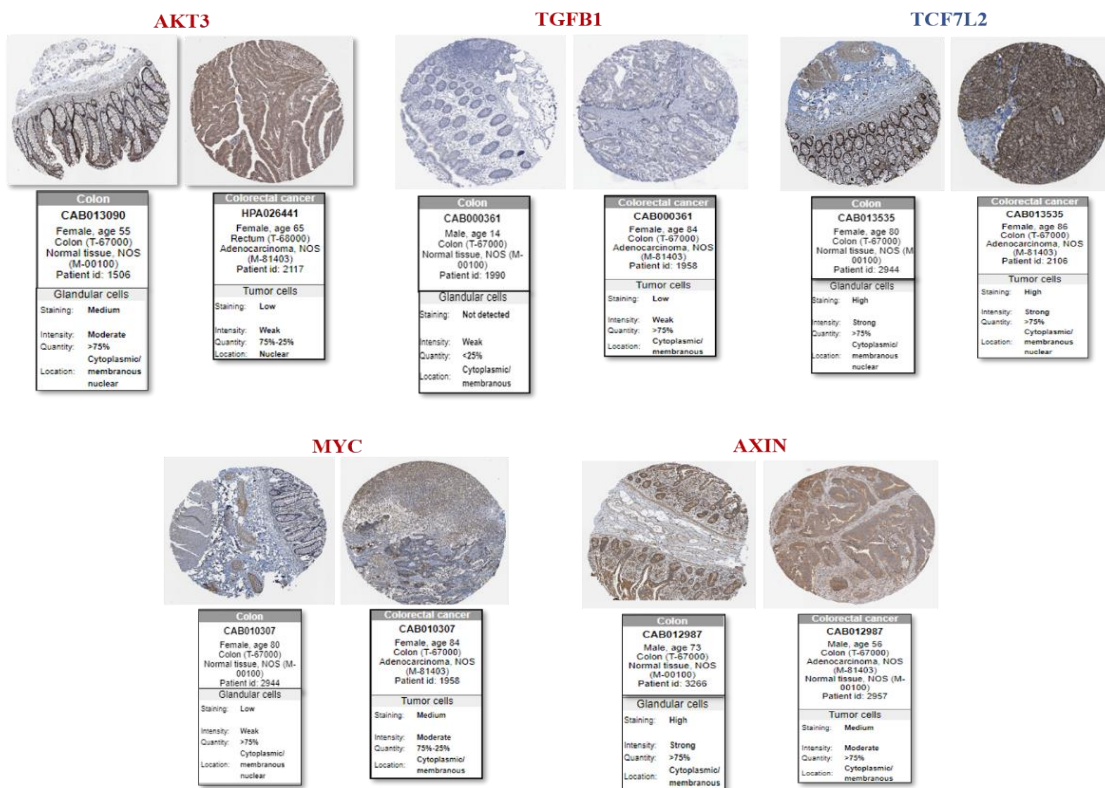


Figura 10. Análises *in silico* dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G3. A- Clustergrama gerado pelo *Enrichr* pelos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G3. Seta preta indica o termo ‘Câncer de cólon retal’ enriquecido. As células vermelhas indicam os genes associados a cada termo. Foi demonstrado o termo enriquecido com o p-valor < 0.05 (Top 10). **B-** Imuno-histoquímica de amostras de cólon normal e de câncer cólon retal dos genes que enriqueceram o termo de ‘Câncer de cólon retal’ contidos no banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://proteinatlas.org/>).

Para fornecer mais informações sobre o papel da CAR associada a DNC e insultos DMH no modelo de carcinogênese colorretal, foram comparados os dados obtidos no estudo realizado dos grupos G1 x G2 com dados de pacientes com câncer colorretal e obteve-se o Clustergrama

gerado pelo *Enrichr*. Foram identificamos genes comumente expressos com diferentes expressões, foram eles “*AKT3 e Birc5*”, mostrados na Figura 11 e no material suplementar 1.

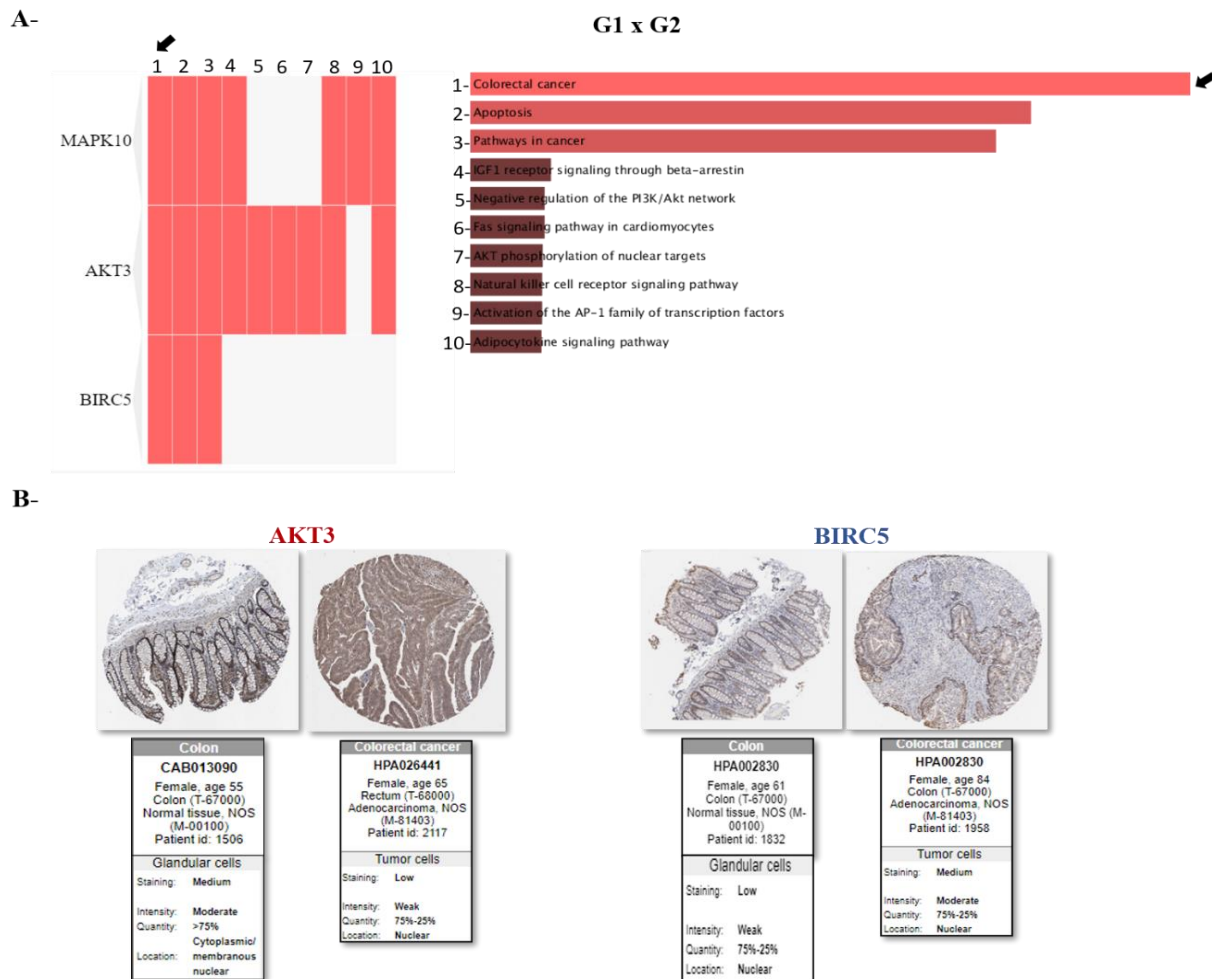
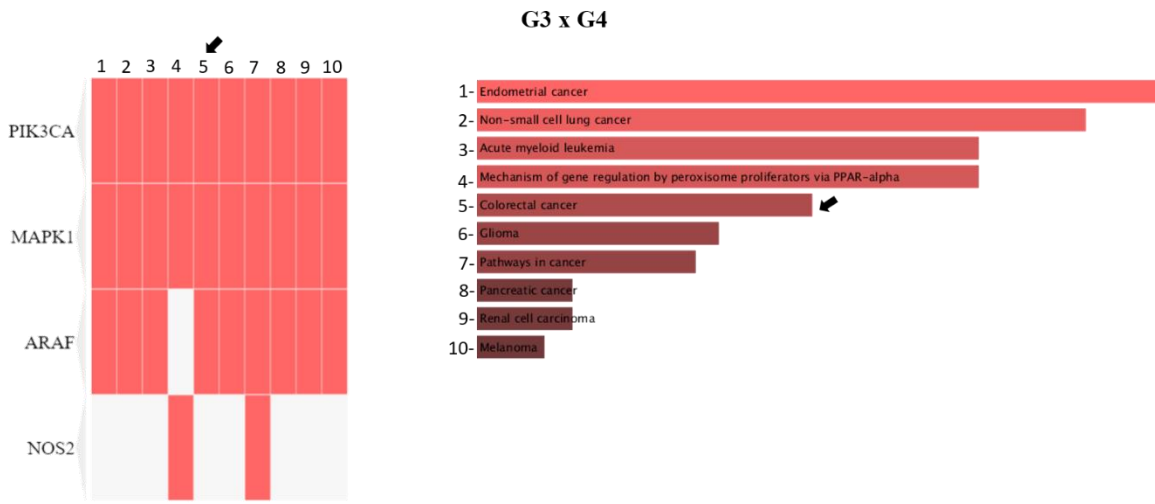


Figura 11. Análises *in silico* dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G2. A- Clustergrama gerado pelo *Enrichr* pelos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G1 x G2. Seta preta indica o termo ‘Câncer de cólon retal’ enriquecido. As células vermelhas indicam os genes associados a cada termo. Foi demonstrado o termo enriquecido com o p-valor < 0.05 (Top 10). B- Imuno-histoquímica de amostras de cólon normal e de câncer cólon retal dos genes que enriqueceram o termo de ‘Câncer de cólon retal’ contidos no banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://proteinatlas.org/>).

Finalmente, para obter maiores informações sobre o papel da CAR associada a DHC e insultos DMH no modelo de carcinogênese colorretal, foram comparados os dados obtidos no estudo realizado dos grupos G3 x G4 com dados de pacientes com câncer colorretal e obteve-se o Clustergrama gerado pelo *Enrichr*. Foram identificamos genes comumente expressos com diferentes expressões, foram eles “*PIK3CA, MAPK1 e Araf*”, mostrados na figura 12 e no material suplementar 1.

A-



B-

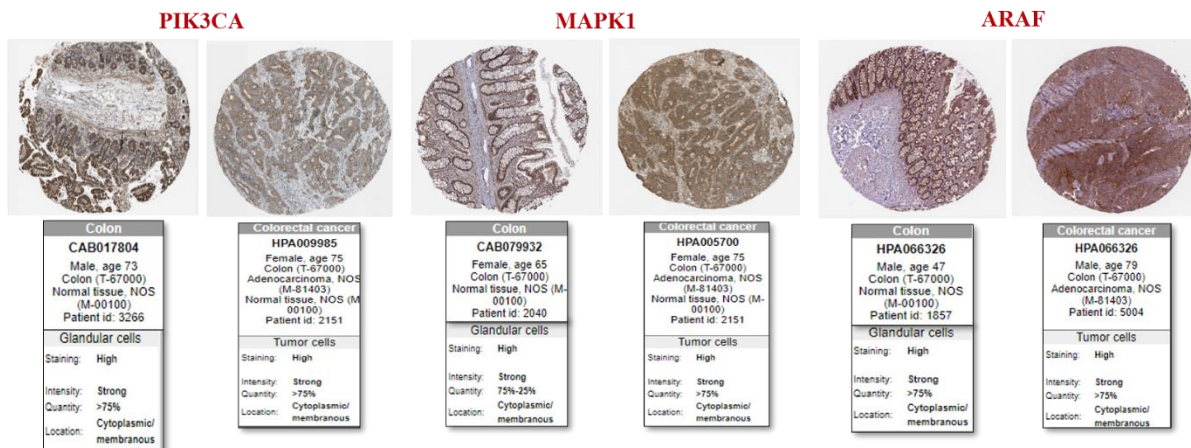


Figura 12. Análises *in silico* dos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G3 x G4. A- Clustergrama gerado pelo *Enrichr* pelos genes diferencialmente expressos contidos no cluster da análise G3 x G4. Seta preta indica o termo ‘Câncer de cólon retal’ enriquecido. As células vermelhas indicam os genes associados a cada termo. Foi demonstrado o termo enriquecido com o p-valor < 0.05 (Top 10). B- Imuno-histoquímica de amostras de cólon normal e de câncer cólon retal dos genes que enriqueceram o termo de ‘Câncer de cólon retal’ contidos no banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://proteinatlas.org/>).

5. Discussão

O uso de dietas hipercalóricas em modelos de roedores é cada vez mais empregado para mimetizar a condição de obesidade e síndrome metabólica materna e suas consequências para a descendência. Para melhor avaliação da patogênese dessas doenças, os modelos animais vêm empregando diferentes tipos de dietas com consumo materno de alta ingestão calórica durante a gestação e/ou lactação. Nesse trabalho, o diferencial é o uso da DHC nas fases de pré-

concepção e pós-concepção materna e fase juvenil da prole, avaliando sua atividade associada à exposição ao carcinógeno DMH, o mais utilizado para indução experimental de carcinogênese colorretal. As análises se deram em aspectos histopatológico, bioquímicos e moleculares.

Os resultados observados na Tabela 2, mostram que a fêmeas que receberam (DHC) no período de pré, pós-concepção e lactação não tiveram alterações na evolução de peso corpóreo e no ganho de peso, quando comparado ao grupo de fêmeas que recebeu a dieta (DNC) no período avaliado, corroborando com dados da literatura (Franco et al., 2009). No entanto, observou-se uma diminuição do consumo de DHC nas fases de pré, pós concepção e lactação quando comparado com o grupo que recebeu a DNC. Esta resposta fisiológica pode ter ocorrido devido ao aumento da densidade calórica dos animais, já que ratos ingerem uma quantidade constantes de calorias mesmo no regime *ad libitum* (Rasmussen, 1992; Llopis et al., 2014). Quando avaliada a prole, observou-se um aumento de ganho de peso nos animais tanto de G2 quanto de G4 no DPN 32, grupos os quais receberam a CAR como tratamento, possivelmente o ganho de peso está associado ao efeito protetor da carnosina relacionado à minimização do efeito danoso causado pela administração de DMH, acarretando a redução de peso corpóreo. Além do mais, observou-se alteração de peso hepático relativo e absoluto na prole que ingeriu CAR, podendo ser explicado pela ação da CAR em proteção hepática aos efeitos tóxicos das administrações de DMH.

Em nosso estudo, mostrou-se o aumento de triglicérides e colesterol na prole de fêmeas cujas as mães receberam DHC (G3) quando comparado com o grupo que recebeu a DNC (G1). No entanto, quando avaliados os grupos que receberam a DHC (G3) e (G4), nota-se a diminuição de colesterol e triglicérides na presença da CAR (G4). Esses achados na prole (F1) foram também observados em outros estudos de ingestão materna de DHC (Lima et al., 2018; Silva et al, 2019). O aumento de lipídeos no sangue após o consumo de alimentos é um processo fisiológico normal do sistema digestivo e do sistema de transporte de lipídeos (Zhukova et al. 2014). A concentração de colesterol no sangue depende da alimentação e da atividade de sua formação a partir de lipoproteínas e da eficiência da captura dos mesmos pelos seus receptores. Portanto, o acúmulo de colesterol no sangue se dá pelo bloqueio da endocitose mediada pelo receptor de colesterol na inibição da hidrólise do triglicérido contido no colesterol (Titov, 2001; Zhukova et al. 2014). A principal função do colesterol é a transferência

de ácido graxo poli-insaturado para as células na forma de ésteres apolares de colesterol. O bloqueio da captura de colesterol pelas células resulta em acúmulo de lipídeos ricos em ácidos graxos no sangue (Zhukova et al. 2014). Alguns estudos avaliaram a associação (DHC+DMH) e observaram que houve um aumento da concentração de sais biliares no lúmen do cólon, estimulando hiperproliferação celular, além de iniciar o estresse da membrana celular ocasionado pelo aumento de colesterol, afetando a integridade das mesmas (Kamaleeswari et al, 2006; Karthik, 2010; Sangeetha et al, 2010;). Adicionalmente ao aumento de colesterol devido a ingestão da DHC, ocorre uma elevada síntese do mesmo no fígado, devido a atividade da enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase aumentada, participadora na modulação do crescimento celular, sinalização celular e inibição de apoptose, fatores contribuintes para a carcinogênese colorretal (Cooper et al., 1978; Mo et al, 2004). Esses achados levam a pensar numa predisposição da F1 à obesidade e doenças metabólicas na vida adulta. A CAR pode atuar atenuando o mecanismo de estresse oxidativo na mucosa colônica, e potencialmente no fígado, devido a regularização dos níveis de colesterol e triglicerídeos de animais alimentados DHC.

Observou-se ainda uma redução das alturas de criptas na prole de fêmeas que ingeriram a dieta hipercalórica (G3) comparada ao grupo que recebeu a DNC (G1) e um aumento das alturas de criptas no grupo que recebeu tratamento de CAR associada a DHC (G4) comparada ao grupo que recebeu DHC (G3). Muitos estudos sugerem que a ingestão de DHC rica em lipídeos altera a progressão do câncer colorretal, mesmo que os animais ainda não tenham alcançado o nível de obesidade (Shulz et al., 2014). Poucos estudos descrevem as potenciais alterações no epitélio intestinal de roedores alimentados com DHC (Xie et al., 2020). Pode-se observar em estudos recentes que murinos que ingeriram a dieta hipercalórica apresentaram aumento de profundidade de criptas (Beyaz et al., 2016) e a diminuição das criptas na ingestão de DHC, sendo controversamente descrita na literatura (Baldassano et al., 2013; Mao et al., 2013; Xie et al., 2020). As diferenças encontradas podem ocorrer devido às variáveis de cada estudo como idade dos animais, tempo de exposição e até mesmo a composição da dieta empregada (Marques et al, 2015). Quando o alimento é ingerido, o seu primeiro contato é o trato intestinal e seu desbalanço homeostático pode resultar em uma cadeia de eventos, além do aparecimento de diversas doenças, incluindo o câncer (Xie et al., 2020).

Quando comparados os grupos que receberam o carcinógeno com a ingestão da DNC, (G1) e DHC (G3) observou-se 4 genes regulados negativamente: *Bmp2*, *Casp3*, *c-FOS* e *Tcf7l2* e 14 genes regulados positivamente: *Akt3*, *Braf*, *Wif1*, *Axin1*, *CCne*, *Dcc*, *Dlc1*, *Figf*, *Gjal*, *Hmox*, *Loc100360342*, *Tgfb1*, *Msh2*. Após a o enriquecimento de vias com esses genes desregulados, observa-se o gene *Akt3* upregulado quando comparado aos bancos de dados CCR humanos, os quais nos mostram o gene *AKT3* com expressão média e o mesmo gene com baixa expressão na presença de CCR humano. A Akt é uma serina/treonina quinase conhecida como PKB (proteína quinase B) e é está diretamente relacionada à progressão do CCR, estudos demonstram que a via AKT controla a sobrevivência celular, metástase, angiogênese e recrutamento de fatores inflamatórios no ambiente tumoral (Sasaki et al., 2013; Tu et al., 2016; Zhu et al., 2016; Liu et al., 2019; Jiang et al., 2020). Essa via PI3K/Akt foi encontrada mutada nos tumores colorretais em 10-20% dos casos, podendo ser ativada por vários estímulos, como: fatores de crescimento peptídicos, citocinas, hormônios, estresse oxidativo (EO) (Kim e Choi, 2010; Lech et al., 2016; Stefani et al., 2021).

O *AKT3* é um membro da família AKT que está relacionado diretamente aos processos de crescimento celular, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular (Nakatani et al, 1999; Ma et al, 2020; Buikhuisen et al, 2021). Adicionalmente, *AKT3* apresenta papel pró-tumoral devido sua participação ativa na via de sinalização PI3K/AKT em CCR (Agarwal et al., 2013; Ma et al, 2020) *AKT3* ainda foi encontrado altamente expresso em modelos animais e humanos de CCR, sua relação com malignização e mau prognóstico desse tipo de câncer é descrito na literatura (Li et al, 2020; Ma et al, 2020; Buikhuisen et al, 2021). Outro gene que teve sua expressão aumentada no enriquecimento funcional foi o *TGFB1* que não tem sua expressão detectada na mucosa de colón e reto normais e apresenta uma expressão baixa no CCR humano. *TGFB-1* tem relação com crescimento, diferenciação ou migração celular e regulação da via apoptótica, além de estar associado à reação inflamatória em diversas patologias (Hata e Chen, 2016; Zhao et al., 2018; Wodziński et al., 2022). No modelo de CCR, quando *TGFB1* está em condições fisiológicas, age como um supressor tumoral e ativador do processo de apoptose (Zhao et al., 2019; Wodziński et al., 2022). *TGFB1* mostra-se superexpresso em diversos tipos de cânceres, além de trazer uma piora no tratamento do modelo de CCR e promover a transição epitélio-mesenquimal levando a formação de metástase (Parada

et al., 2013; Liu et al., 2014; Zhao et al., 2018; Zhao et al., 2019; Wodziński et al., 2022; Heck et al., 2023) O gene discutido pode estar superexpresso no estudo realizado devido ao insulto de DMH e iniciação de carcinogênese colorretal, corroborando com a literatura que mostra o aumento da sua expressão em pacientes com estágios iniciais de CCR, os quais não apresentam infiltração linfocitária e nem de vasos sanguíneos (Wodziński et al., 2022). Por último, ainda nessa comparação (G1xG3), observa-se o gene TCF7L2 com a expressão reduzida, encontrado nos bancos de dados com expressão alta em cólon normal e alta/média em CCR humanos. O fator de transcrição TCF7L2 codifica TCF4, importante para a homeostase do tecido intestinal pois relaciona-se a via Wnt/ β -Catenina e atua como supressor de invasão celular, além do mais, a sua expressão diminuída está atrelada ao aumento da malignidade de CCR (Wenzel et al., 2020; Cui et al., 2021). Em estudos recentes, os quais apresentam o silenciamento do gene TCF7L2, apresentam como consequência alterações estruturais e funcionais que promovem a migração e invasão celular em CCR humano (Brown et al., 2020). Com o uso da DHC, encontra-se o TCF7L2 com expressão reduzida, em concordância com os dados obtidos no estudo de Geoghegan e colaboradores em 2019. A expressão alterada de TCF7L2 pode ocorrer devido ao insulto de DMH levando à iniciação da carcinogênese colorretal, juntamente com a ingestão de DHC.

Quando foram comparados os grupos que receberam a DMH associada a ingestão da DNC (G1) com o grupo de mesma dieta e que foram tratados com a carnosina (G2) notou-se na mucosa colônica um único gene regulado negativamente, o *Birc5* e 2 genes regulados positivamente, *Akt3* e *MAPK10*. Seguidas as análises de enriquecimento funcional dos mesmos grupos G1xG2, além da alta expressão de Akt3, evidenciada na comparação de G1xG3, ocorreu uma alteração de Birc 5, o qual apresentou uma baixa expressão, observação comum quando não há ocorrência de CCR. No entanto, quando há o CCR, esse gene (*Birc5*) apresenta-se com média expressão encontrada nos bancos de dados humanos analisados. Birc-5, codifica a proteína survivina, bastante expressa em tecidos fetais em proliferação e com apresenta-se com baixa expressão em tecidos diferenciados na fase adulta do indivíduo (Garcia et al., 2016; Steigerwald et al, 2018). Adicionalmente, Birc-5 apresenta função de inibição apoptótica, regulação mitótica e ativa a via de NF- κ B (via inflamatória), gerando a invasão de células tumorais e metástase em diferentes tipos de cânceres (Mehrotra et al, 2010 Krieg et al, 2013;

Tong et al., 2021). Estudos mostram que a survivina apresenta expressão elevada e é um marcador para mau prognóstico em modelos de CCR (Steigerwald et al, 2018; Xu et al, 2021). A CAR pode atenuar a expressão de Birc 5, com um possível efeito protetor na mucosa colônica contra o insulto de DMH na mucosa colônica, podendo estar associado à redução do processo inflamatório.

Na comparação dos grupos com ingestão de DHC e exposição a DMH (G3) com o grupo da mesma dieta e tratados com a carnosina (G4) foram detectados na mucosa colônica apenas 2 genes regulados negativamente: *Gjal* e *Nos2* e 3 genes regulados positivamente: *Araf*, *MAPK1*, *Pik3ca*. Porém, quando realizados os enriquecimentos de vias desses genes em bancos de dados de CCR humanos, a CAR associada a DHC em animais submetidos ao insulto de DMH não apresentou alterações relevantes na expressão dos genes quando comparadas em amostras de cólon normal e de CCR.

A compreensão do mecanismo de atuação da carnosina em vias moleculares específicas é um caminho promissor para o desenvolvimento de novas drogas com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios para doenças relacionadas ao dano celular advindo do estresse oxidativo. No entanto, novos estudos são necessários para estabelecer a completa elucidação da carnosina associada à dieta hipercalórica e entender o seu mecanismo no desenvolvimento de lesões precursoras e do próprio CCR.

6. Conclusão

Os resultados deste estudo, permitem concluir que a dieta hipercalórica materna e de início da vida causa alterações na altura das criptas intestinais, perfil bioquímico de expressão gênica da mucosa colônica após insulto agudo de DMH. No entanto, o tratamento da prole de fêmeas com a carnosina contribuiu para redução de respostas da predisposição à obesidade e doenças metabólicas. O papel protetor da carnosina está relacionado à resposta antioxidante e diminuição de vias inflamatórias, reduzindo os efeitos citotóxicos de DMH. No entanto, novos estudos são necessários para avaliar o papel protetor da carnosina sobre o desenvolvimento de lesões pré e neoplásicas induzidas pela DMH.

7. Referências Bibliográficas

Afrin S, Giampieri F, Gasparini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodriguez P, Zhang J, Manna PP, Daglia M, Atanasov AG, Battino M. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnol Adv.* 2020 Jan-Feb;38:107322.

Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev.* 2007 Nov;27(6):817-68.

Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, Altomare A, D'Amato A, Vistoli G, Carini M. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res.* 2021 Apr;55(4):321-330.

Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors.* 2005;24(1-4):77-87.

Agarwal E, Brattain MG, Chowdhury S. Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal.* 2013 Aug;25(8):1711-9.

American Cancer Society (ACS), cancer.org 1.800.227.2345. www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/912.00.pdf. Acessado em 29 de novembro de 2022.

Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, Arnold M. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int J Cancer.* 2019 Jun 15;144(12):2992-3000.

Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012 Jan;5(1):19-27.

Aydın AF, Bingül İ, Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Doğru Abbasoğlu S, Uysal M. Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol.* 2017 Oct;98(5):278-288.

Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986 May 10;1(8489):1077–1081.

Baye E, Ukropcova B, Ukropec J, Hipkiss A, Aldini G, de Courten B. Physiological and therapeutic effects of carnosine on cardiometabolic risk and disease. *Amino Acids*. 2016 May;48(5):1131-49.

Bakhoun SF, Swanton C. Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer. *Front Oncol*. 2014 Jun 19;4:161.

Baldassano C, Beck DM, Fei-Fei L. Differential connectivity within the Parahippocampal Place Area. *Neuroimage*. 2013 Jul 15;75:228-237.

Bekusova V, Droessler L, Amasheh S, Markov AG. Effects of 1,2-Dimethylhydrazine on Barrier Properties of Rat Large Intestine and IPEC-J2 Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 24;22(19):10278.

Benetou V, Lagiou A, Lagiou P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. *F1000Res*. 2015 Sep 28;4(F1000 Faculty Rev):916.

Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, Bauer-Rowe KE, Xifaras ME, Akkad A, Arias E, Pinello L, Katz Y, Shinagare S, Abu-Remaileh M, Mihaylova MM, Lamming DW, Dogum R, Guo G, Bell GW, Selig M, Nielsen GP, Gupta N, Ferrone CR, Deshpande V, Yuan GC, Orkin SH, Sabatini DM, Yilmaz ÖH. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature*. 2016 Mar 3;531(7592):53-8.

Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP, van Dijk SJ, Ozanne SE. Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis*. 2017 Oct;8(5):513-519.

Blackmore HL, Ozanne SE. Maternal diet-induced obesity and offspring cardiovascular health. *J Dev Orig Health Dis*. 2013 Oct;4(5):338-47.

Blancquaert L, Everaert I, Missinne M, Baguet A, Stegen S, Volkaert A, Petrovic M, Vervaeck C, Achten E, DE Maeyer M, DE Henauw S, Derave W. Effects of Histidine and β -alanine

Supplementation on Human Muscle Carnosine Storage. *Med Sci Sports Exerc.* 2017 Mar;49(3):602-609.

Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.* 2013 Oct;93(4):1803-45.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 ;68(6):394-424.

Briaud I, Kelpel CL, Johnson LM, Tran PO, Poytout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes.* 2002 Mar;51(3):662-8.

Brown, M. A., Dotson, G. A., Ronquist, S., Emons, G., Rajapakse, I., & Ried, T. TCF7L2 Silencing Reprograms the 4D Nucleome of Colorectal Cancer Cells. *bioRxiv*, 2020. 2020-05.

Buikhuisen JY, Gomez Barila PM, Torang A, Dekker D, de Jong JH, Cameron K, Vitale S, Stassi G, van Hooff SR, Castro MAA, Vermeulen L, Medema JP. AKT3 Expression in Mesenchymal Colorectal Cancer Cells Drives Growth and Is Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 14;13(4):801.

Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol Rev.* 2016 Oct;96(4):1509-65.

Byun JC, Lee SR, Kim CS. Effects of carnosine and hypothermia combination therapy on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Clin Exp Pediatr.* 2021 Aug;64(8):422-428.

Caderni G, Luceri C, Lancioni L, Dolara P. Dietary sucrose, glucose, fructose, and starches affect colonic functions in rats. *Nutr Cancer.* 1996;25(2):179-86.

Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015 Oct;149(5):1177-1190.e3.

Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jan 10;650(1):184-94.

Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;128(14).

Chen J, Huang XF. High fat diet-induced obesity increases the formation of colon polyps induced by azoxymethane in mice. *Ann Transl Med.* 2015 Apr;3(6):79.

Chen L, Yang F, Chen S, Tai J. Mechanisms on chemotherapy resistance of colorectal cancer stem cells and research progress of reverse transformation: A mini-review. *Front Med (Lausanne).* 2022 Sep 12;9:995882.

Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol Genomics.* 2018 Feb 1;50(2):77-97.

Chmielewska K, Dzierzbicka K, Inkielewicz-Stępnia I, Przybyłowska M. Therapeutic potential of carnosine and its derivatives in the treatment of human diseases. *Chem Res Toxicol.* 2020;33(7):1561–1578.

Christians JK, Lennie KI, Wild LK, Garcha R. Effects of high-fat diets on fetal growth in rodents: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019 Apr 16;17(1):39.

Clapper ML, Chang WL, Cooper HS. Dysplastic Aberrant Crypt Foci: Biomarkers of Early Colorectal Neoplasia and Response to Preventive Intervention. *Cancer Prev Res (Phila).* 2020 Mar;13(3):229-240.

Cooper HK, Buecheler J, Kleihues P. DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1978;38:3063–5.

Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(13):1911-22.

Cui S, Wu Q, Liu M, Su M, Liu S, Shao L, Han X, He H. EphA2 super-enhancer promotes tumor progression by recruiting FOSL2 and TCF7L2 to activate the target gene EphA2. *Cell Death Dis*. 2021 Mar 12;12(3):264.

Dalrymple KV, El-Heis S, Godfrey KM. Maternal weight and gestational diabetes impacts on child health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2022 May 1;25(3):203-208.

Davidson EP, Coppey LJ, Dake B, Yorek MA. Effect of treatment of sprague dawley rats with AVE7688, enalapril, or candoxatril on diet-induced obesity. *J Obesity* 2011; 2011:pii: 686952.

Decaens C, Gautier R, Daher N, Bara J, Burtin P. Induction of rat intestinal carcinogenesis with single doses, low and high repeated doses of 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 1989 Jan;10(1):69-72.

Deponte M. The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxid Redox Signal*. 2017 Nov 20;27(15):1130-1161.

Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Apr;39(4):633-41.

DE-Souza ASC, Costa-Casagrande TA. Animal models for colorectal cancer. *Arq Bras Cir Dig*. 2018;31(2):e1369.

Distefano A, Caruso G, Oliveri V, Bellia F, Sbardella D, Zingale GA, Caraci F, Grasso G. Neuroprotective Effect of Carnosine Is Mediated by Insulin-Degrading Enzyme. *ACS Chem Neurosci*. 2022 May 18;13(10):1588-1593.

Dragsted LO, Daneshvar B, Vogel U, Autrup HN, Wallin H, Risom L, Møller P, Mølck AM, Hansen M, Poulsen HE, Loft S. A sucrose-rich diet induces mutations in the rat colon. *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4339-45.

Du L, Cheng Q, Zheng H, Liu J, Liu L, Chen Q. Targeting stemness of cancer stem cells to fight colorectal cancers. *Semin Cancer Biol.* 2022 Jul;82:150-161.

Farrelly C. 50 years of the "war on cancer": lessons for public health and geroscience. *Geroscience.* 2021 Jun;43(3):1229-1235.

Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:479-507.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67.

Franco LC, Aureluc J&D. (2009). Dietary fat content, serum lipid levels and body weight of exercised rats. *Rev de Nutr* 2009; 22(3):359-366.

Fiala ES, Sohn OS, Puz C, Czerniak R. Differential effects of 4-iodopyrazole and 3-methylpyrazole on the metabolic activation of methylazoxymethanol to a DNA methylating species by rat liver and rat colon mucosa in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987;113:145–50.

Garcia DN, Prietsch LA, Rincón JA, Moreira Ide L, Valle SC, Barros CC, Helbig E, Corrêa MN, Schneider A. Differential effects of a high-fat diet on serum lipid parameters and ovarian gene expression in young and aged female mice. *Zygote.* 2016 Oct;24(5):676-83.

Gaspar RS, Unsworth AJ, Al-Dibouni A, Bye AP, Sage T, Stewart M, Wells S, Cox RD, Gibbins JM, Sellayah D, E Hughes C. Maternal and offspring high-fat diet leads to platelet hyperactivation in male mice offspring. *Sci Rep.* 2021 Jan 14;11(1):1473.

Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel).* 2018 Apr 27;7(5):62.

Gawlińska, K.; Gawliński, D.; Filip, M.; Przegaliński, E. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health. *Nutr. Rev.* 2021, 79, 709–725.

Geoghegan G, Simcox J, Seldin MM, Parnell TJ, Stubben C, Just S, Begaye L, Lusic AJ, Villanueva CJ. Targeted deletion of Tcf7l2 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and impaired glucose metabolism. *Mol Metab.* 2019 Jun;24:44-63.

George BP, Chandran R, Abrahamse H. Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights. *Antioxidants (Basel).* 2021 Sep 14;10(9):1455.

Ghodsi R, Kheirouri S. Carnosine and advanced glycation end products: a systematic review. *Amino Acids.* 2018;50(9):1177–1186.

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002 Dec;31(4):925-43.

Global Cancer Statistics 2022; <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> Acessado 29 de novembro de 2022.

Goldstein JM, Holsen L, Huang G, Hammond BD, James-Todd T, Cherkerzian S, Hale TM, Handa RJ. Prenatal stress-immune programming of sex differences in comorbidity of depression and obesity/metabolic syndrome. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016 Dec;18(4):425-436.

Gomes, Monres José et al. Avaliação da expressão da caspase-3 no adenocarcinoma colorretal através de um sistema computadorizado de análise de imagem. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [online]. 2008, v. 21, n. 1, pp. 33-37.

Grab, D. I., & Zedeck, M. S. Studies of the mechanism of organotrophy shown by the carcinogen methylazoxymethanol acetate (MAM). *Federation proceedings*, 1977; 36(3).

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008 Oct;135(4):1079-99.

Grasso M, Caruso G, Godos J, Bonaccorso A, Carbone C, Castellano S, Currenti W, Grosso G, Musumeci T, Caraci F. Improving Cognition with Nutraceuticals Targeting TGF- β 1 Signaling. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jul 5;10(7):1075.

Greenfield RE, Ellwein LB, Cohen SM. A general probabilistic model of carcinogenesis: analysis of experimental urinary bladder cancer. *Carcinogenesis.* 1984 Apr;5(4):437-45.

Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem.* 2005;12(20):2293-315.

Gupte AA, Lyon CJ, Hsueh WA. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Diab Rep.* 2013 Jun;13(3):362-71.

Hata A, Chen YG. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Sep 1;8(9):a022061.

Heck KA, Lindholm HT, Niederdorfer B, Tsirvouli E, Kuiper M, Flobak Å, Læg Reid A, Thommesen L. Characterisation of Colorectal Cancer Cell Lines through Proteomic Profiling of Their Extracellular Vesicles. *Proteomes*. 2023 Jan 11;11(1):3.

Hoffman DJ, Powell TL, Barrett ES, Hardy DB. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev*. 2021 Jul 1;101(3):739-795.

Hong Q, Li B, Cai X, Lv Z, Cai S, Zhong Y, Wen B. Transcriptomic Analyses of the Adenoma-Carcinoma Sequence Identify Hallmarks Associated With the Onset of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2021 Aug 11;11:704531.

Hossain, P.; Kavar, B.; El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World—A Growing Challenge. *N. Engl. J. Med*. 2007, 356, 213–215.

Iacobini C, Menini S, Blasetti Fantauzzi C, Pesce CM, Giaccari A, Salomone E, Lapolla A, Orioli M, Aldini G, Pugliese G. FL-926-16, a novel bioavailable carnosinase-resistant carnosine derivative, prevents onset and stops progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Br J Pharmacol*. 2018 175(1):53-66.

Instituto Nacional do Câncer (BR). Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>. Acessado em 22 de novembro de 2022.

Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board. Fulfilling the Potential of Cancer Prevention and Early Detection. Curry SJ, Byers T, Hewitt M, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003.

Iovine B, Iannella ML, Nocella F, Pricolo MR, Bevilacqua MA. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett*. 2012. 28;315(2):122-8.

Iovine B, Oliviero G, Garofalo M, Orefice M, Nocella F, Borbone N, Piccialli V, Centore R, Mazzone M, Piccialli G, Bevilacqua MA. The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS One*. 2014; 9 (6):e99739.

Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):135-48.

Jamieson JP, Nock MK, Mendes WB. Mind over matter: reappraising arousal improves cardiovascular and cognitive responses to stress. *J Exp Psychol Gen*. 2012. 141(3):417-22.

Jaspersen K, Burt RW. The Genetics of Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 24(4):683-703.

Jia M, Jansen L, Walter V, Tagscherer K, Roth W, Herpel E, Kloor M, Bläker H, Chang-Claude J, Brenner H, Hoffmeister M. No association of CpG island methylator phenotype and colorectal cancer survival: population-based study. *Br J Cancer*. 2016 22;115(11):1359-1366.

Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep*. 2020 Jun;47(6):4587-4629.

Johnson RL, Fleet JC. Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 32(1-2):39-61.

Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matic A, Kozina N, Mihaljević Z, Mihalj M, Šušnjara P, Stupin M, Čurić ŽB, Selthofer-Relatić K, Kibel A, Lukinac A, Kolar L, Kralik G, Kralik Z, Széchenyi A, Jozanović M, Galović O, Medvidović-Kosanović M, Drenjančević I. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants (Basel)*. 2021 28;10 (7):1037.

Kamaleeswari M, Nalini N. Dose-response efficacy of caraway (*Carum carvi* L.) on tissue lipid peroxidation and antioxidant profile in rat colon carcinogenesis. *J Pharm Pharmacol*. 2006 Aug;58(8):1121-30.

Kang X, Zhang R, Kwong TN, Lui RN, Wu WK, Sung JJ, Yu J, Wong SH. Serrated neoplasia in the colorectum: gut microbiota and molecular pathways. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1-12.

Karaca O, Ertekin T, Canoz O, Ulger H, Soysal H, Kus I. Effect of endostatin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor in mice. *Toxicology and Industrial Health*. 2012; 28(1):21-26.

Karthik Kumar V, Vennila S, Nalini N. Inhibitory effect of morin on DMH-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in experimental colon carcinogenesis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010 Jan;29(1):50-7.

Kedrin D, Gala MK. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015. 9;6(4):e84.

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 ;16(12):713-732.

Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*. 2013. 15;450(1):9-21.

Kominiarek, MA; Peaceman, A.M. Gestational weight gain. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2017, 217, 642–651.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472-82.

Kubota Y, Kawazoe A, Sasaki A, et al. The Impact of Molecular Subtype on Efficacy of Chemotherapy and Checkpoint Inhibition in Advanced Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2020. 26 (14): 3784–3790.

Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8; 44(W1):W90-7.

Laqueur GL. The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycone. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*. 1965 Dec 21;340(2):151-63.

Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 7;22(5):1745-55.

Lecomte V, Maloney CA, Wang KW, Morris MJ. Effects of paternal obesity on growth and adiposity of male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017 Feb 1;312(2):E117-E125.

Li B, Sun H, Zhang J. LncRNA DSCAM-AS1 promotes colorectal cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-384 to modulate AKT3 expression. *Aging (Albany NY)*. 2020 May 26;12(10):9781-9792.

Li J, Akaliyski P, Schäfer J, Kendall G, Oddy WH, Stanley F, Strazdins L. Non-linear relationship between maternal work hours and child body weight: Evidence from the Western Australian Pregnancy Cohort (Raine) Study. *Soc Sci Med*. 2017 Aug;186:52-60.

Lima MS, Perez GS, Morais GL, Santos LS, Cordeiro GS, Couto RD, Deiró TCBJ, Leandro CG, Barreto-Medeiros JM. Effects of maternal high fat intake during pregnancy and lactation on total cholesterol and adipose tissue in neonatal rats. *Braz J Bio*. 2018; 78. 10.1590/1519-6984.166788.

Liu GH, Qu J, Shen X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):713-27.

Liu L, Zhou W, Cheng CT, Ren X, Somlo G, Fong MY, Chin AR, Li H, Yu Y, Xu Y, O'Connor ST, O'Connor TR, Ann DK, Stark JM, Wang SE. TGFβ induces "BRCAness" and sensitivity to PARP inhibition in breast cancer by regulating DNA-repair genes. *Mol Cancer Res*. 2014 Nov;12(11):1597-609.

Liu X, Song M, Wang P, Zhao R, Chen H, Zhang M, Shi Y, Liu K, Liu F, Yang R, et al. Targeted therapy of the AKT kinase inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2019;145(4):1007– 19.

Liu Y, Zhang X, Han C, Wan G, Huang X, Ivan C, Jiang D, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Rao PH, Maru DM, Pahl A, He X, Sood AK, Ellis LM, Anderl J, Lu X. TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. *Nature*. 2015 Apr 30; 520(7549):697-701.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89(2)175-84.

Litzenburger T, Huber EK, Dinger K, Wilke R, Vohlen C, Selle J, Kadah M, Persigehl T, Heneweer C, Dötsch J, Alejandre Alcazar MA. Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Apr 17;134(7):921-939.

Llopis M, Sánchez J, Priego T, Palou A, Picó C. Maternal Fat Supplementation during Late Pregnancy and Lactation Influences the Development of Hepatic Steatosis in Offspring Depending on the Fat Source. *J Agric Food Chem*. 2014;62(7):1590-601.

Lopes GA, Dias MC, Barbisan LF, Marchesan Rodrigues MA. Early Life and Postnatal Western Diet Feeding and Susceptibility to Chemically Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Male Rats Offspring. *Nutr Cancer*. 2016 Jul;68(5):811-7.

Ma J, Zhang L, Shang A, Song H, Huo J, Zhang M, Jiang L. LINC02163 promotes colorectal cancer progression via miR-511-3p/AKT3 axis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020 Dec;48(1):961-968.

Manzano A, Pérez-Segura P. Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention? *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:327341.

Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 2015 Jul 15;5(1):11-21.

Masuyama, H; Hiramatsu, Y. Effects of a High-Fat Diet Exposure in Utero on the Metabolic Syndrome-Like Phenomenon in Mouse Offspring through Epigenetic Changes in Adipocytokine Gene Expression. *Endocrinology* 2012, 153, 2823–2830.

Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):53-64.

Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469(2):125-34.

Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:567–85.

Mou Y, Wen S, Li Y-X, et al. Recent progress in Keap1- Nrf2 protein-protein interaction inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2020; 202:112532.

Moraes-Souza, R.Q.; Vesentini, G.; Paula, V.G.; Sinzato, Y.K.; Soares, T.S.; Gelaleti, R.B.; Volpato, G.T.; Damasceno, D.C. Oxidative Stress Profile of Mothers and Their Offspring after Maternal Consumption of High-Fat Diet in Rodents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2021, 2021, 9073859

Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*. 2003 Jul 10;546(2-3):181-4.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21528-32.

Ng, M.; Fleming, T.; Robinson, M.; Thomson, B.; Graetz, N.; Margono, C.; Mullany, E.C.; Biryukov, S.; Abbafati, C.; Abera, S.F.; et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014, 384, 766–781.

Nguyen, HT, Duong, H. "As características moleculares do câncer colorretal: implicações para o diagnóstico e terapia (revisão)". *Oncology Letters* 16.1 2018. 9-18.

Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):291-302.

Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem.* 2012 Mar 23;287(13):9873-9886.

Ocvirk S, Wilson AS, Appolonia CN, Thomas TK, O'Keefe SJD. Fiber, Fat, and Colorectal Cancer: New Insight into Modifiable Dietary Risk Factors. *Curr Gastroenterol Rep.* 2019 Dec 2;21(11):62.

Orioli M, Aldini G, Benfatto MC, Facino RM, Carini M. HNE Michael adducts to histidine and histidine-containing peptides as biomarkers of lipid-derived carbonyl stress in urines: LC-MS/MS profiling in Zucker obese rats. *Anal Chem.* 2007 1;79(23):9174-84.

Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Wu, J.-C.; Ho, C.-T. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 32–45.

Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompella A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2002 Sep;64(5-6):1027-35.

Parada C, Li J, Iwata J, Suzuki A, Chai Y. CTGF mediates Smad-dependent transforming growth factor β signaling to regulate mesenchymal cell proliferation during palate development. *Mol Cell Biol.* 2013 Sep;33(17):3482-93.

Parker TW, Neufeld KL. APC controls Wnt-induced β -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. *Sci Rep.* 2020 Feb 19;10(1):2957.

Peral-Sanchez I, Hojeij B, Ojeda DA, Steegers-Theunissen RPM, Willaime-Morawek S. Epigenetics in the Uterine Environment: How Maternal Diet and ART May Influence the Epigenome in the Offspring with Long-Term Health Consequences. *Genes.* 2022; 13(1):31.

Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:473964.

Pitot HC, Hikita H, Dragan Y, Sargent L, Haas M. Review article: the stages of gastrointestinal carcinogenesis--application of rodent models to human disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Apr;14 Suppl 1:153-60.

Poulsen M, Mølck AM, Thorup I, Breinholt V, Meyer O. The influence of simple sugars and starch given during pre- or post-initiation on aberrant crypt foci in rat colon. *Cancer Lett.* 2001 26;167(2):135-43.

Pozharisski KM. The significance of nonspecific injury for colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 1975 Dec;35(12):3824-30.

Pullar J, Wickramasinghe K, Demaio AR, Roberts N, Perez-Blanco KM, Noonan K, Townsend N. The impact of maternal nutrition on offspring's risk of non-communicable diseases in adulthood: a systematic review. *J Glob Health.* 2019 Dec;9(2):020405.

Quin C, Ghosh S, Dai C, Barnett JA, Garner AM, Yoo RKH, Zandberg WF, Botta A, Gorzelak MA, Gibson DL. Maternal Intake of Dietary Fat Pre-Programs Offspring's Gut Ecosystem Altering Colonization Resistance and Immunity to Infectious Colitis in Mice. *Mol Nutr Food Res.* 2021 Mar;65(6):e2000635.

Rahman S, Garrel S, Gerber M, Maitra R, Goel S. Therapeutic Targets of KRAS in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 11;13(24):6233.

Ramírez-Alarcón, K.; Sánchez-Agurto, A.; Lamperti, L.; Martorell, M. Epigenetics, Maternal Diet and Metabolic Programming. *Open Biol. J.* 2019, 7, 45–51.

Rasmussen KM. The influence of maternal nutrition on lactation. *Annu Rev Nutr.* 1992; 12:103-17.

Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.

Regazzoni L, de Courten B, Garzon D, Altomare A, Marinello C, Jakubova M, Vallova S, Krumpolec P, Carini M, Ukropec J, Ukropcova B, Aldini G. A carnosine intervention study in overweight human volunteers: bioavailability and reactive carbonyl species sequestering effect. *Sci Rep.* 2016 6; 6:27224. 4893669.

Roncucci L, Mariani F. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *Eur J Intern Med.* 2015 Dec;26(10):752-6.

Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Velasco I, Barroso A, Fernandois D, Heras V, Manfredi-Lozano M, Vazquez MJ, Castellano JM, Roa J, Pinilla L, Tena-Sempere M. Intergenerational Influence of Paternal Obesity on Metabolic and Reproductive Health Parameters of the Offspring: Male-Preferential Impact and Involvement of Kiss1-Mediated Pathways. *Endocrinology.* 2018 Feb 1;159(2):1005-1018.

Şanlı, E.; Kabaran, S. Maternal Obesity, Maternal Overnutrition and Fetal Programming: Effects of Epigenetic Mechanisms on the Development of Metabolic Disorders. *Curr. Genom.* 2019, 20, 419–427.

Sangeetha N, Aranganathan S, Panneerselvam J, Shanthi P, Rama G, Nalini, N. Oral supplementation of silibinin prevents colon carcinogenesis in a long term preclinical model. *European Journal of Pharmacology.* 2010; 643(1):

Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Increased phosphorylation of AKT in high-risk gastric mucosa. *Anticancer Res.* 2013;33(8):3295–300.

Saunders B, DE Salles Painelli V, DE Oliveira LF, DA Eira Silva V, DA Silva RP, Riani L, Franchi M, Gonçalves LS, Harris RC, Roschel H, Artioli GG, Sale C, Gualano B. Twenty-four Weeks of β -Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2017. 49(5):896-906.

Schulz MD, Atay C, Heringer J, Romrig FK, Schwitalla S, Aydin B, Ziegler PK, Varga J, Reindl W, Pommerenke C, et al. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 2014;514:508–512.

Scuto M, Trovato Salinaro A, Modafferi S, et al. Carnosine activates cellular stress response in podocytes and reduces glycativative and lipoperoxidative stress. *Biomedicines.* 2020;8(6):177.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968 Oct 24;25(1):192-205.

Sen, C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2000, 36, 1–30.

Silva LML, Bloise AMNLG, Fontes DAF, Araújo KS, Barbosa MO, Costa-Silva, JH Composition of a maternal high fat diet rich in saturated fats and omega 3 in gestation and lactation for studies with rodents. *Rev de Nut.* 2019.32. 10.1590/1678-9865201932e180292.

Singh AK, Arya RK, Maheshwari S, Singh A, Meena S, Pandey P, Dormond O, Datta D. Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: updates in concept, controversies and clinical relevance. *Int J Cancer.* 2015. 1;136(9):1991-2000.

Song BC, Joo NS, Aldini G, Yeum KJ. Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome. *Nutr Res Pract.* 2014 8(1):3-10.

Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes.* 2012 Nov;61(11):2833-41.

Steck SE, Murphy EA. Dietary patterns and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2020 20(2):125-138.

Steigerwald C, Rasenberger B, Christmann M, Tomicic MT. Sensitization of colorectal cancer cells to irinotecan by the Survivin inhibitor LLP3 depends on XAF1 proficiency in the context of mutated p53. *Arch Toxicol.* 2018 Aug;92(8):2645-2648.

Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, Jinga M. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 23;22(19):10260.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer.* 2013 Jul 9;109(1):1-7.

Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2833-41.

Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *J Toxicol Pathol*. 2013; 26(4):335-41.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

Tain, YL; Hsu, CN. Oxidative Stress-Induced Hypertension of Developmental Origins: Preventive Aspects of Antioxidant Therapy. *Antioxidants* 2022, 11, 511.

Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 2004;95(6):475-80.

Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*. 2009;8:5.

Tanaka T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *Int J Inflam*. 2012;2012:658786.

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017 24;355(6331):1330-1334.

Tong Y, Huang Y, Zhang Y, Zeng X, Yan M, Xia Z, Lai D. DPP3/CDK1 contributes to the progression of colorectal cancer through regulating cell proliferation, cell apoptosis, and cell migration. *Cell Death Dis*. 2021 May 22;12(6):529.

Tu YY, Kim E, Gao Y, Rankin GO, Li B, Chen YC. Theaflavin-3, 3'-digallate induces apoptosis and G2 cell cycle arrest through the Akt/MDM2/p53 pathway in cisplatin-resistant ovarian cancer A2780/CP70 cells. *Int J Oncol*. 2016;48(6):2657-65.

Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigyarto CA, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergström K, Brumer H, Cerjan D, Ekström M, Elobeid A, Eriksson C, Fagerberg L, Falk R, Fall J, Forsberg M, Björklund MG, Gumbel K, Halimi A, Hallin I, Hamsten C, Hansson M, Hedhammar M, Hercules G, Kampf C, Larsson K, Lindskog M, Lodewyckx W, Lund J, Lundberg J, Magnusson K, Malm E, Nilsson P, Odling J, Oksvold P, Olsson I, Oster E, Ottosson J, Paavilainen L, Persson A, Rimini R, Rockberg J, Runeson M, Sivertsson A, Sköllermo A, Steen J, Stenvall M, Sterky F, Strömberg S, Sundberg M, Tegel H, Tourle S, Wahlund E, Waldén A, Wan J, Wernérus H, Westberg J, Wester K, Wrethagen U, Xu LL, Hober S, Pontén F. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Dec;4(12):1920-32.

Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014; 7;20(29) :9828-49.

Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Sileri P, Rossi P, Sica G, Pallone F. Familial colorectal cancer screening: When and what to do? *World J Gastroenterol* 2015; 21(26): 7944-7953.

Venkatachalam K, Vinayagam R, Arokia Vijaya Anand M, Isa NM, Ponnaiyan R. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. *Toxicol Res (Camb)*. 2020. Mar 30;9(1):2-18.

Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 ;7(3):153-62.

Vincent TL, Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2008 ;32(4):729-37.

Voerman E, Santos S, Patro Golab B, Amiano P, Ballester F, Barros H, Bergström A, Charles MA, Chatzi L, Chevrier C, Chrousos GP, Corpeleijn E, Costet N, Crozier S, Devereux G, Eggesbø M, Ekström S, Fantini MP, Farchi S, Forastiere F, Georgiu V, Godfrey KM, Gori D, Grote V, Hanke W, Hertz-Picciotto I, Heude B, Hryhorczuk D, Huang RC, Inskip H, Iszatt N, Karvonen AM, Kenny LC, Koletzko B, Küpers LK, Lagström H, Lehmann I, Magnus P, Majewska R, Mäkelä J, Manios Y, McAuliffe FM, McDonald SW, Mehegan J, Mommers M,

Morgen CS, Mori TA, Moschonis G, Murray D, Chaoimh CN, Nohr EA, Nybo Andersen AM, Oken E, Oostvogels AJJM, Pac A, Papadopoulou E, Pekkanen J, Pizzi C, Polanska K, Porta D, Richiardi L, Rifas-Shiman SL, Ronfani L, Santos AC, Standl M, Stoltenberg C, Thiering E, Thijs C, Torrent M, Tough SC, Trnovec T, Turner S, van Rossem L, von Berg A, Vrijheid M, Vrijkotte TGM, West J, Wijga A, Wright J, Zvinchuk O, Sørensen TIA, Lawlor DA, Gaillard R, Jaddoe VWV. Maternal body mass index, gestational weight gain, and the risk of overweight and obesity across childhood: An individual participant data meta-analysis. *PLoS Med.* 2019 Feb 11;16(2):e1002744.

Wang Z, Lin Y, Liang J, Huang Y, Ma C, Liu X, Yang J. NMR-based metabolomic techniques identify potential urinary biomarkers for early colorectal cancer detection. *Oncotarget.* 2017 Nov 11;8(62):105819-105831.

Weisburger JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer.* 1971 Jul;28(1):60-70.

Wright M, Beaty JS, Ternent CA. Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am.* 2017 97(3):683-701.

Xie Y, Ding F, Di W, Lv Y, Xia F, Sheng Y, Yu J, Ding G. Impact of a high-fat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middle-aged female mice. *Mol Med Rep.* 2020 Mar;21(3):1133-1144.

Xu L, Yu W, Xiao H, Lin K. BIRC5 is a prognostic biomarker associated with tumor immune cell infiltration. *Sci Rep.* 2021 Jan 11;11(1):390.

Wenzel J, Rose K, Haghighi EB, Lamprecht C, Rauen G, Freihe V, Kesselring R, Boerries M, Hecht A. Loss of the nuclear Wnt pathway effector TCF7L2 promotes migration and invasion of human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2020 May;39(19):3893-3909. doi: 10.1038/s41388-020-1259-7.

Wodziński D, Wosiak A, Pietrzak J, Świechowski R, Kordek R, Balcerczak E. Assessment of the TGFB1 gene expression and methylation status of the promoter region in patients with colorectal cancer. *Sci Rep.* 2022 Jul 7;12(1):11488.

Yamada, L; Chong, S. Epigenetic studies in Developmental Origins of Health and Disease: Pitfalls and key considerations for study design and interpretation. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2017, 8, 30–43.

Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 2016. 6;35:4.

Yang H, Wang Q, Li S. MicroRNA-218 promotes high glucose-induced apoptosis in podocytes by targeting heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Mar 18;471(4):582-8.

Yehia R, Saleh S, El Abhar H, Saad AS, Schaalán M. L-Carnosine protects against Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in colorectal cancer patients: A perspective on targeting Nrf-2 and NF- κ B pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2019 Feb;365:41-50.

Yerra VG, Negi G, Sharma SS, Kumar A. Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- κ B pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biol.* 2013 Aug 1;1(1):394-7.

Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem.* 1991 Sep;28 (Pt 5):504-8.

Zambon S, Fontana S, Kajbaf M. Evaluation of cytochrome P450 inhibition assays using human liver microsomes by a cassette analysis /LC-MS/MS. *Drug Metab Lett.* 2010 Aug;4(3):120-8.

Zapaterini, JR, Fonseca ARB, Bidinotto LT, Colombelli KT, Rossi ALD, Kass L, Justulin LA, Barbisan LF. Maternal Low-Protein Diet Deregulates DNA Repair and DNA Replication Pathways in Female Offspring Mammary Gland Leading to Increased Chemically Induced Rat Carcinogenesis in Adulthood. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 1;9:756616.

Zhao K, Li Y, Wang Z, Han N, Wang Y. Carnosine Protects Mouse Podocytes from High Glucose Induced Apoptosis through PI3K/AKT and Nrf2 Pathways. *Biomed Res Int.* 2019 May 28;2019:4348973.

Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018 Jan 12;14(2):111-123.

Zhao Y, Xia S, Cao C, Du X. Effect of TGF- β 1 on Apoptosis of Colon Cancer Cells Via the ERK Signaling Pathway. J BUON. 2019 Mar-Apr;24(2):449-455.

Zhukova NV, Novgorodtseva TP, Denisenko YK. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. Lipids Health Dis. 2014 Mar 16;13:49.

Zhu YP, Dai B, Zhang HL, Shi GH, Shen YJ, Ye DW. Long non-coding RNA LOC572558 inhibits bladder cancer cell proliferation and tumor growth by regulating the AKT-MDM2-p53 signaling axis. Cancer Lett. 2016; 380(2):369–74.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação pela Comissão de ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de dieta materna rica em carboidratos simples e gordura nas fases de pré e pós-concepção sobre as taxas de proliferação e morte celular e de expressão gênica na mucosa colônica após administração da 1,2-dimetilhidrazina na geração de fêmeas F1: modulação pela carnosina", protocolada sob o CEUA nº 1142200721 (08/08/2021), sob a responsabilidade de **Luis Fernando Barbisan** e equipe; Vanía Vastí Affer Nunes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 27/08/2021.

We certify that the proposal "Effects of a maternal diet rich in simple carbohydrates and fat during pre- and post-conception phases on cell proliferation and death and gene expression in the colonic mucosa after 1,2-dimethylhydrazine administration in F1 female offspring : modulation by carnosine", utilizing 98 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1142200721 (08/08/2021), under the responsibility of **Luis Fernando Barbisan** and team; Vanía Vastí Affer Nunes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 08/27/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2021 a 09/2023 Área: Ciências Biomédicas

Origem: CEMIB - UNICAMP

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 21 a 120 dias


N: 98

Linhagem: SD


Peso: 45 a 250 g

Local do experimento: Biotério de pequenos roedores do setor de Morfologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Botucatu, 27 de agosto de 2021



Prof. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista



Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Tabela Suplementar 1. Lista de genes selecionados no cartão Taqman Low Density Array (TLDA).

	Unigene	Símbolo	Descrição
01	Rn.91450	Gapdh	encodes a member of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein family
02	Rn.47	Hprt1	catalyzes the conversion of IMP and diphosphate to hypoxanthine and 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate
03	Rn.3692	Gusb	catalyzes the conversion of a beta-D-glucuronoside and H ₂ O to an alcohol and D-glucuronate
04	Rn.94978	Actb	mRNA expression increases following axon injury; may play a role in acceleration of axonal outgrowth
05	Rn.11422	Akt1	inhibits JUN kinase activation and mediates inhibition of apoptosis
06	Rn.2592	Mapk3	kinase involved in intracellular signalling; component of Mapk signalling pathway
07	Rn.34914	Mapk1	kinase involved in intracellular signaling; component of Mapk signaling pathway
08	Rn.54443	Tp53	regulates cell cycle arrest, apoptosis, senescence and DNA repair
09	Rn.9996	Bcl2	an anti-apoptotic protein; involved in inhibiting cell death in many different cell types
10	Rn.10562	Casp3	apoptotic protease that may play a role in cell death regulation and other apoptotic processes
11	Rn.10668	Bax	Bcl2-related gene; involved in the regulation of apoptotic cell death
12	Rn.202944	Gstm1	enzyme with scavenger function; able to neutralize harmful metabolites
13	Rn.10426	Gsk3b	mediates Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex regulation; may induce apoptosis
14	Rn.112601	Ctnbb1	involved in mediating the interaction between cadherins and the actin cytoskeleton
15	Rn.93714	Jun	transcription factor; acts as a protooncogene
16	Rn.22279	Ccnd1	regulatory subunit of CDK4 or CDK6; regulation of the G1/S transition of the cell cycle
17	Rn.24554	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily
18	Rn.6059	Sod 1	conversion of superoxide to molecular oxygen; involved in response to oxidative stress
19	Rn.87066	Akt2	may be involved in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) mediated signaling
20	Rn.40136	Tgfb1	binds the TGFbeta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation
21	Rn.2755	Smad2	transcriptional mediator for both activin and TGF-beta
22	Rn.88057	Apc	binds microtubules; may play a role in the regulation of cell polarity
23	Rn.33262	Raf1	acts as a mitogenic protein kinase; mutant forms may play a role in transformation
24	Rn.9774	Smad4	transduces signal from TGF-beta; deletion of is associated with pancreatic carcinomas
25	Rn.10666	Dcc	Deleted in colorectal cancer; play dual roles as receptor e other signaling pathways
26	Rn.228611	Lef1	Enhancer binding factor has 98% amino acid homology with mouse Lef-1
27	Rn.233802	Mki67	Marker of cell proliferation Ki-67
28	Rn.91239	Xiap	involved in directly inhibiting key apoptotic proteases, caspase 3 and 7
29	Rn.1303	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation
30	Rn.3174	Msh2	mismatch repair protein
31	Rn.103750	Fos	an immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction
32	Rn.107401	Rhoa	regarded as a prominent regulatory factor in other functions such as the regulation of cytoskeletal dynamics, transcription, cell cycle progression and cell transformation
33	Rn.12072	Myc	The protein encoded by this gene is a multifunctional, nuclear phosphoprotein that plays a role in cell cycle progression, apoptosis and cellular transformation.
34	Rn.4090	Mapk8	involved in a wide variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, transcription regulation and development.
35	Rn.29157	Rac1	regulator of many cellular processes, including the cell cycle, cell-cell adhesion, motility (through the actin network), and of epithelial differentiation

36	Rn.10599	Pik3r1	Phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylates the inositol ring of phosphatidylinositol at the 3-prime position
37	Rn.9954	Tgfbr2	receptor for TGF-beta; may play a role in lung maturation and response to hypoxia
38	Rn.10636	Smad3	transcription factor; important component of the TGF-beta signaling pathway
39	Rn.36696	Bad	may be involved in induction of programmed cell death
40	Rn.24554	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily
41	Rn.24539	Tgfb2	binds the transforming growth factor-beta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation; may be involved in mesenchymal-epithelial cell interactions during development
42	Rn.5850	Map2k1	kinase that activates Mapk3 (Erk1) and Mapk1 (Erk2) kinases
43	Rn.32199	Casp9	plays a role in initiation and progression of apoptosis
44	Rn.7018	Tgfb3	involved in epithelial and endothelial cell proliferation and differentiation during development
45	Rn.9910	Mapk9	Involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development.
46	Rn.2202	Cycs	a component of the electron transport chain in mitochondria, may function in apoptosis
47	Rn.205813	Braf	human homolog is a serine/threonine kinase; mutation of gene is associated with human cancers
48	Rn.20391	Mlh1	may be involved in DNA mismatch repair
49	Rn.9911	Mapk10	involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development
50	Rn.44193	Pik3ca	expression of the human homolog is associated with increased cell proliferation and decreased apoptosis and may play a role in ovarian cancer progression
51	Rn.31781	Axin1	interacts with adenomatosis polyposis coli, catenin (cadherin-associated protein) beta 1, glycogen synthase kinase 3 beta, protein phosphatase 2, and itself
52	Rn.105849	Tcf7l2	is a transcription factor influencing the transcription of several genes thereby exerting a large variety of functions within the cell
53	Rn.44268	Pik3cb	may play a role in hepatocyte proliferation and DNA replication
54	Rn.10506	Akt3	kinase that associates with both protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins
55	Rn.224576	Appl1	The protein encoded by this gene has been shown to be involved in the regulation of cell proliferation, and in the crosstalk between the adiponectin signalling and insulin signalling pathways
56	Rn.1714	Araf	proto-oncogene, serine/threonine kinase
57	Rn.162212	Axin2	inhibits axis formation; acts as a negative regulator of the Wnt signaling pathway by inducing GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin
58	Rn.40174	Ralgds	facilitates conversion of Ras-related GTPase
59	Rn.2863	Rac2	regulate a diverse array of cellular events, including the control of cell growth, cytoskeletal reorganization, and the activation of protein kinases
60	Rn.22497	Pik3r2	regulatory subunit of the enzyme phosphatidylinositol 3-kinase; involved in cellular signaling mechanisms
61	Rn.162551	Msh3	DNA mismatch repair protein
62	Rn.11530	Pik3cd	Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) phosphorylate inositol lipids and are involved in the immune response
63	Rn.88630	Cyct	specific cytochrome c
64	Rn.44448	Pik3r3	regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, a mediator of various cellular signaling mechanisms
65	Rn.47032	RSA-14-44	a member of the rho/ras family of small GTPases
66	Rn.214730	Pik3r5	play important roles in cell growth, proliferation, differentiation, motility, survival and intracellular trafficking
67	Rn.106335	Tcf7	The encoded protein can bind an enhancer element and activate the CD3E gene, and it also may repress the CTNNB1 and TCF7L2 genes through a feedback mechanism
68	Rn.168155	Apc2	adenomatosis polyposis coli 2
69	Rn.67805	LOC100360342	may be involved in DNA mismatch repair

70	Rn.78564	LOC100363502	may be involved in DNA mismatch repair
71	Rn.45876	cox 2	It is involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H2, an important precursor of prostacyclin and thromboxane A2
72	Rn.92401	Cyp4a1	arachidonic acid monooxygenase; catalyzes the hydroxylation of omega-terminal carbon of the arachidonic acid
73	Rn.11122	Gstt1	subunit of the glutathione S-transferase
74	Rn.3160	Hmox 1	catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin
75	Rn.13131	Abcg2	this protein functions as a xenobiotic transporter which may play a role in multi-drug resistance to chemotherapeutic agents including mitoxantrone and camptothecin analogues.
76	Rn.214715	Nemo	regulatory subunit of the I kappa B kinase complex, which phosphorylates and activates NF kappa B
77	Rn.103750	c-Fos	an immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction
78	Rn.20059	Creb3l3	positive regulation of acute inflammatory response; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
79	Rn.74256	wif1	human homolog has decreased mRNA expression in some prostate cancers and other cancers; may act as a secreted inhibitor of the Wnt signaling pathway
80	Rn.90931	Bmp2	involved in cellular signaling during limb development; induces bone formation
81	Rn.2490	IL-15	human homolog is a cytokine involved in the regulation of T and natural killer cell activation and proliferation
82	Rn.15455	Ccne1	a cyclin-like protein; may be involved in growth stimulation
83	Rn.13094	Ccna2	human homolog plays a role in regulation of DNA synthesis and of mitosis
84	Rn.6743	Ccnb2	Cyclin B2 also binds to transforming growth factor beta RII and thus cyclin B2/cdc2 may play a key role in transforming growth factor beta-mediated cell cycle control
85	Rn.24792	Fzd5	forms a receptor complex with Lpr6 that binds Wnt7A proteins
86	Rn.23638	ler3	mouse homolog plays a role in regulation of T cell proliferation
87	Rn.10400	iNoS	cytokine-inducible enzyme involved in nitric oxide (NO) production
88	Rn.2275	TNf	acts as a cytokine; binds TNF receptors; plays a role in regulation of cell proliferation, induction of apoptosis, and inflammatory response
89	Rn.7255	Dlc1	It is suggested that this gene is a candidate tumor suppressor gene for human liver cancer, as well as for prostate, lung, colorectal, and breast cancers
90	Rn.223092	wnt	member of a family of secreted glycoproteins that play a role in regulation of cell growth, differentiation, and tumorigenesis
91	Rn.228916	Ffar2	may be involved in the inflammatory response and in regulating lipid plasma levels.
92	Rn.23483	Hdac4	human homolog is a component of the DNA damage response pathway and is also involved in repression of muscle differentiation
93	Rn.10346	Gja1	gap junction component; plays a role in cell-cell communication
94	Rn.202944	Gstm1	multifunctional enzyme thought to have scavenger function; able to neutralize harmful metabolites from foreign substances
95	Rn.1303	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation
96	Rn.9753	Ppara	nuclear steroid receptor; heterodimerizes with retinoid-X receptor (RXR), and binds to peroxisome proliferator response elements (PPREs) to initiate the transcriptional regulation of target genes

Tabela Suplementar 2. Redes de interação proteína-proteína geradas no String dos grupos G1 (DNC+DMH) x G3 (DHC+DMH)

Vias Panther	Fold Enrichment	P value
Via Feedback p53	67.88	1.31E-05
Via de sinalização de interleucina	55.78	8.24E-07
Ativação de célula T	42.32	5.10E-05
Angiogênese	34.46	2.90E-07
Via RAS	33.78	1.66E-03
Via de sinalização PGDF	33.31	6.01E-06
Ativação de células B	33.31	1.71E-03
Mapa de sinalização CCKR	30.17	8.80E-06
Via de sinalização de apoptose	26.85	1.9E-04
Via de sinalização de TGFB	23.75	3.28E-03
Via p53	23.28	3.40E-03
Via doença de Huntington	21.29	3.71E-04
Via do receptor de liberação do hormônio gonadotrofina	15.44	9.30E-04
Via de sinalização WMT	12.53	1.68E-03

Tabela Suplementar 3. Redes de interação proteína-proteína geradas no String dos G1 (DNC+DMH) com G2 (DNC+DMH+CAR).

Vias Panther	Fold Enrichment	P value
Via RAS	>100	3.38E-05
Ativação de células T	>100	4.80 E-05
Angiogênese	>100	5.43E-07
Via de sinalização de FGF	>100	1.01E-04
Via de sinalização de apoptose	>100	1.18E-04
Via de sinalização de receptor EGF	>100	1.23E-04

Tabela Suplementar 4. Redes de interação proteína-proteína geradas no String dos G3 (DH+DMH) com G4 (DHC+DMH+CAR).

Vias Panther	Fold Enrichment	P value
Via de sinalização de VEGF	>100	3.39E-07
Via RAS	>100	3.85E-07
Ativação de células B	>100	4.01E-07
Via PI3Kinase	>100	6.81E-05
Via de sinalização de endotelina	>100	6.28E-07
Ativação de células T	>100	6.50E-07
Via de sinalização de interleucina	>100	6.73E-07
Via de sinalização de FGF	>100	1.97E-06
Via de sinalização de receptor EGF	94.53	2.64E-06
Via de sinalização PDGF	89.94	3.06E-06
Angiogênese	74.43	5.35E-06
Via de sinalização de integrina	69.63	6.52E-06
Via de sinalização de apoptose	64.43	3.89E-04
Mapa de sinalização de CCKR	54.30	5.45E-04
Via de sinalização de inflamação mediada por quimiocinas e citocinas	52.86	1.47E-05

BioPlanet 2019 G1xG3 Table

Term	Overlap	P-value	Adjusted P-value	Old P-value	Old Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Colorectal cancer	10/62	1.64E-05	6.04E-05	0	0	47.908.653.846.153.800	22.929.506.046.166.700	TCF7L2;TGFB1;MSH2;DCC;MYC;CASP3;AKT3;AXIN1;BRAF;FOS
Pathways in cancer	12/225	4.71E-03	8.69E-01	0	0	12.568.051.118.210.800	5.014.312.721.893.960	TCF7L2;FOG;BMP2;TGFB1;MSH2;DCC;MYC;CASP3;AKT3;AXIN1;BRAF;FOS
Endometrial cancer	4/52	1.00E-08	1.00E-08	0	0	1.631.342.521.193.200	1.631.342.521.193.200	TCF7L2;MYC;AKT3;AXIN1;BRAF
AP-1 transcription factor network	5/70	3.76E-07	3.46E-08	0	0	11.785.207.100.591.700	2.286.345.397.628.030	TCF7L2;GIA1;TGFB1;MYC;FOS
Wnt signaling pathway	6/231	3.68E-07	2.71E-10	0	0	43.904.444.444.444.400	7.515.780.213.285.210	TCF7L2;GIA1;WIF1;MYC;AKT3;AXIN1
Presenilin action in Notch and Wnt signaling	4/48	8.72E-07	5.36E-09	0	0	12.946.753.246.753.200	21.045.744.504.430.800	WIF1;MYC;AXIN1;FOS
Acute myeloid leukemia	4/57	1.76E-09	9.28E-08	0	0	10.743.396.226.415.000	1.670.875.747.560.450	TCF7L2;MYC;AKT3;BRAF
MAPK signaling pathway	6/314	2.26E-08	1.04E-11	0	0	3.193.831.168.831.160	48.872.951.943.372.400	TGFB1;MYC;CASP3;AKT3;BRAF;FOS
Pancreatic cancer	4/70	4.06E-08	1.50E-11	0	0	12.621.645.021.645.020	12.689.148.950.937.700	FIGF;TGFB1;AKT3;BRAF
Renal cell carcinoma	4/70	4.06E-08	1.50E-11	0	0	8.621.645.021.645.020	12.689.148.950.937.700	FIGF;TGFB1;AKT3;BRAF
Chronic myeloid leukemia	4/73	4.81E-08	1.61E-11	0	0	8.245.548.654.244.300	11.995.594.185.011.400	TGFB1;MYC;AKT3;BRAF
Signal transduction	8/1020	1.23E-09	3.79E-10	0	0	14.996.047.430.830.000	2.040.427.123.500.220	FIGF;BMP2;MYC;DCC1;CASP3;AKT3;AXIN1;BRAF
Thyroid cancer	29/mar	2.20E-09	6.26E-10	0	0	1.535.076.923.076.920	19.994.797.825.786.900	TCF7L2;MYC;BRAF
Inactivation of GSK3 by Akt causes accumulation of beta-catenin in alveolar macrophages	30/mar	2.45E-09	6.45E-10	0	0	1.478.148.148.148.140	1.909.837.643.971.430	GIA1;WIF1;AXIN1
ALK in cardiac myocytes	3/37	4.57E-09	1.15E-11	0	0	11.734.117.647.058.800	1.440.400.663.499.890	BMP2;TGFB1;AXIN1
Bladder cancer	3/42	6.87E-09	1.50E-12	0	0	10.227.179.487.179.400	12.157.859.347.640.500	FIGF;MYC;BRAF
Wnt interactions in lipid metabolism and immune response	3/45	8.48E-09	1.84E-12	0	0	9.495.238.095.238.090	1.108.810.988.296.510	GIA1;MYC;FOS
Integrated breast cancer signaling	4/152	9.03E-09	1.85E-12	0	0	3.828.957.528.957.520	4.447.270.561.680.820	MSH2;MYC;CASP3;BRAF
Basal cell carcinoma	3/55	1.03E-11	3.03E-11	0	0	7.665.384.615.384.610	8.484.517.283.201.250	TCF7L2;BMP2;AXIN1
TGF-beta signaling pathway	4/185	1.96E-11	3.56E-11	0	0	31.256.511.444.356.700	338.830.792.828.952	TGFB1;MYC;AXIN1;FOS
RAG pathway	3/60	2.03E-10	3.56E-11	0	0	6.991.228.070.175.430	7.554.516.971.088.570	GIA1;TGFB1;CASP3
TSPI-induced apoptosis in microvascular endothelial cell	08/fev	2.14E-11	3.38E-11	0	0	4.161.666.666.666.660	4.473.613.902.909.710	CASP3;FOS
Thyroid-stimulating hormone signaling pathway	3/66	2.70E-11	4.34E-12	0	0	63.234.920.634.920.600	6.651.353.765.325.990	MYC;BRAF;FOS
Telomerase regulation	3/67	2.83E-11	4.35E-11	0	0	6.224.375	6.518.934.130.016.900	TGFB1;MYC;FOS
Antigen-activated B-cell receptor generation of second messengers	4/211	3.28E-11	4.84E-12	0	0	27.294.685.990.338.100	28.181.450.456.995.600	MYC;AKT3;BRAF;FOS
DCC role in regulating apoptosis	10/fev	3.43E-10	4.86E-11	0	0	31.209.375	3.208.634.562.990.400	DCC;CASP3
Protein activation of MAPK signaling	3/75	3.97E-10	5.42E-11	0	0	5.530.555.555.555.550	5.604.917.293.042.830	MYC;CASP3;FOS
MAP kinase signaling pathway	3/81	5.20E-10	6.59E-11	0	0	50.545.844.613.076.700	50.545.844.613.076.700	TGFB1;MYC;FOS
ATM-dependent DNA damage response	3/82	5.18E-11	6.60E-11	0	0	503.873.417.721.510	4.971.825.388.851.600	TGFB1;MYC;AXIN1
Differentiation pathway in PC12 cells	3/84	5.57E-11	6.66E-11	0	0	49.138.271.604.938.200	48.131.696.276.768.400	AKT3;BRAF;FOS
Apoptosis	4/242	5.60E-11	6.66E-10	0	0	23.702.280.912.364.900	232.052.875.612.836	DCC;MYC;CASP3;AKT3
TGF-beta regulation of skeletal system development	3/85	5.77E-09	6.66E-10	0	0	4.853.658.536.585.360	47.370.663.862.607.200	BMP2;TGFB1;MYC
Prostate cancer	3/89	6.62E-10	7.41E-11	0	0	46.269.767.441.860.400	44.522.910.194.588.500	TCF7L2;AKT3;BRAF
T cell receptor/Itas pathway	14/fev	6.92E-10	9.75E-11	0	0	20.802.083.333.333.300	19.925.161.305.549.100	BRAF;FOS
BDF signaling pathway	4/261	7.51E-10	7.92E-11	0	0	21.928.849.360.755.900	20.825.510.312.192.400	BMP2;MYC;DCC1;FOS
ERBB signaling pathway	3/94	7.99E-10	7.99E-11	0	0	43.716.483.516.483.500	41.533.492.700.023.400	MYC;AKT3;BRAF
Interleukin-4 regulation of apoptosis	4/267	8.20E-10	8.18E-11	0	0	21.422.053.231.939.100	20.155.575.304.011.400	BMP2;MYC;CASP3;FOS
Wnt signaling pathway and pluripotency	3/98	8.82E-10	8.20E-11	0	0	4.186.736.842.105.260	3.908.478.036.191.730	TCF7L2;MYC;AXIN1
Granule cell survival pathway	3/99	9.10E-10	8.20E-11	0	0	4.142.916.666.666.660	38.550.548.704.840.700	CASP3;AKT3;FOS
Senescence and autophagy	3/99	9.10E-10	8.20E-11	0	0	4.142.916.666.666.660	38.550.548.704.840.700	BMP2;TGFB1;BRAF
B cell survival pathway	16/fev	9.11E-09	8.20E-11	0	0	17.828.571.428.571.400	16.586.557.887.027.400	CASP3;FOS
Cadmium-induced DNA biosynthesis and proliferation in macrophages	17/fev	1.03E-12	9.04E-11	0	0	16.639.166.666.666.600	15.272.636.618.368.000	MYC;FOS
Chagas disease	3/104	1.05E-12	9.04E-11	0	0	3.936.831.683.168.310	3.605.622.011.335.200	TGFB1;AKT3;FOS
mTOR signaling pathway	3/113	1.35E-11	0.001129678	0	0	3.613.090.909.090.900	3.220.141.715.616.050	FIGF;AKT3;BRAF
Interleukin-3 regulation of hematopoietic cells	20/fev	1.44E-12	0.001154833	0	0	13.863.888.888.888.800	1.226.393.330.101.250	TGFB1;FOS
Estrogen receptor signaling pathway	20/fev	1.44E-12	0.001154833	0	0	13.863.888.888.888.800	1.226.393.330.101.250	TGFB1;FOS
Oxidative stress-induced gene expression via Nr2f2	21/fev	1.59E-11	0.001248572	0	0	13.133.525.631.578.900	11.487.135.280.506.400	HMOX1;FOS
Interleukin-11 pathway	23/fev	1.91E-10	0.001471326	0	0	11.881.547.619.047.600	10.172.014.676.113.400	TGFB1;FOS
PDGFB signaling pathway	3/129	1.99E-11	0.001500671	0	0	3.151.746.031.746.030	2.685.545.798.603.360	MYC;BRAF;FOS
Inhibition of cellular proliferation by Gleevec	24/fev	2.09E-12	0.001540066	0	0	1.134.090.909.090.900	9.611.089.042.220.100	MYC;FOS
C-Myc pathway	25/fev	2.27E-11	0.001608737	0	0	10.847.282.608.695.600	910.288.628.412.586	MYC;AXIN1
Corticotropin releasing hormone pathway	25/fev	2.27E-11	0.001608737	0	0	10.847.282.608.695.600	910.288.628.412.586	GIA1;FOS
Segmentation clock	26/fev	2.45E-12	0.001709005	0	0	10.399.421.666.666.600	8.640.531.121.915.720	WIF1;AXIN1
EGF/EGFR signaling pathway	3/141	2.59E-11	0.001715287	0	0	28.759.420.289.855.800	2.375.161.494.281.870	GIA1;BRAF;FOS
Proteins and DNA sequences in cardiac structures	27/fev	2.65E-11	0.001715287	0	0	99.785	821.821.281.893.882	BMP2;TGFB1
CTCF pathway	27/fev	2.65E-11	0.001715287	0	0	99.785	821.821.281.893.882	TGFB1;MYC
Oxidative stress	27/fev	2.65E-11	0.001715287	0	0	99.785	821.821.281.893.882	HMOX1;FOS
Multi-step regulation of transcription by PITX2	28/fev	2.72E-11	0.001834417	0	0	959.423.076.923.077	7.551.181.815.068.970	WIF1;AXIN1
Serotonin TRR3 group and FOS pathway	2/32	2.73E-11	0.002335489	0	0	8.313.333.333.333.330	5.561.542.143.574.870	BRAF;FOS
Syndecan 2 pathway	2/33	3.97E-11	0.002443428	0	0	804.475.806.451.613	6.299.693.586.370.830	TGFB1;CASP3
MAPK/TRK pathway	2/34	4.22E-11	0.0024712	0	0	779.296.875	6.055.692.748.599.660	BRAF;FOS
N-cadherin signaling events	2/34	4.22E-11	0.0024712	0	0	779.296.875	6.055.692.748.599.660	GIA1;AXIN1
EGF receptor transcription by GPCRs in cardiac hypertrophy	2/34	4.22E-11	0.0024712	0	0	779.296.875	6.055.692.748.599.660	MYC;FOS
Integrated cancer pathway	2/35	4.47E-11	0.002578643	0	0	7.556.439.393.939.900	5.827.832.554.136.840	MSH2;CASP3
FRK pathway	4/57	5.20E-11	0.002838915	0	0	7.123.928.571.428.570	5.417.141.669.658.500	GIA1;HMOX1
Signal transduction through IL-1R	2/38	5.28E-11	0.002949658	0	0	6.925.694.444.444.400	5.226.965.599.068.790	TGFB1;FOS
FOXM1 transcription factor network	2/41	6.14E-11	0.003388006	0	0	63.919.871.794.871.700	4.726.783.914.538.250	MYC;FOS
Cell differentiation by G alpha (i) pathway inferred from mouse Neuro2A model	2/43	6.76E-11	0.003667606	0	0	60.795.731.707.317.000	4.437.787.597.089.310	AKT3;BRAF
Interleukin-12/STAT4 pathway	2/45	7.40E-10	0.00390192	0	0	5.796.220.930.232.550	41.782.568.323.656.500	TGFB1;FOS
Interleukin-3 signaling pathway	2/45	7.40E-10	0.00390192	0	0	5.796.220.930.232.550	41.782.568.323.656.500	TGFB1;FOS
Platelet activation, signaling and aggregation	4/205	7.75E-11	0.004072113	0	0	19.584.158.415.841.500	1.402.260.899.897.870	TGFB1;AKT3
Regulation of NFAT transcription factors	2/47	8.07E-11	0.004137822	0	0	5.538.055.555.555.550	39.440.459.836.307.100	CASP3;FOS
Interleukin-5 signaling pathway	2/49	8.77E-11	0.004435071	0	0	530.186.170.212.766	3.731.741.306.231.750	MYC;FOS
Signaling by NGF	3/221	9.61E-11	0.004790927	0	0	1.813.211.009.174.310	12.597.760.244.255.600	CASP3;AKT3;BRAF
Interleukin-2 receptor beta chain in T cell activation	2/52	9.88E-11	0.004859645	0	0	49.83	34.482.850.534.778.100	MYC;FOS
Non-small cell lung cancer	2/54	0.001064812	0.005169944	0	0	4.790.865.384.615.380	32.793.266.640.649.300	AKT3;BRAF
Focal adhesion	11/233	0.001119213	0.005303291	0	0	17.175.621.739.313.000	115.717.343.144.750	FIGF;AKT3;BRAF
Glioma	2/65	0.001538697	0.00707242	0	0	395.218.253.968.254	25.597.571.122.223.400	AKT3;BRAF
LPA receptor mediated events	2/65	0.001538697	0.00707242	0	0	395.218.253.968.254	25.597.571.122.223.400	CASP3;FOS
ERK1/ERK2 MAPK pathway	2/65	0.001538697	0.00707242	0	0	395.218.253.968.254	25.597.571.122.223.400	MYC;BRAF
HIF-1 transcriptional activation in hypoxia	2/66	0.001585937	0.007136718	0	0	3.890.234.375	2.507.870.606.899.540	HMOX1;FOS
Signaling by TGF-beta receptor complex	2/66	0.001585937	0.007136718	0	0	3.890.234.375	2.507.870.606.899.540	TGFB1;MYC
Cytokine-cytokine receptor interaction	3/215	0.0015963	0.00720523	0	0	15.053.435.114.503.800	9.672.671.491.483.540	FIGF;BRAF;TGFB1
CDSR/ cell receptor downstream pathway	2/68	0.001682481	0.007390897	0	0	3.771.969.669.969.600	24.095.403.928.127.200	BRAF;FOS
MicroRNA regulation of DNA damage response	2/70	0.001781768	0.007613199	0	0	36.606.617.647.058.800	23.175.535.384.837.500	MYC;CASP3
T cell receptor regulation of apoptosis	4/603	0.001781717	0.007621399	0	0	9.245.409.015.		

Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) interactions	11/jan	0.009857922	0.035798391	0	11.748.235.294.117.600	5.427.073.703.814.340	DCC
Granzyme A-mediated apoptosis pathway	12/jan	0.010749535	0.027355712	0	10.679.679.144.385.000	4.840.984.098.875.240	CASP3
BMP signaling and regulation	12/jan	0.010749535	0.027355712	0	10.679.679.144.385.000	4.840.984.098.875.240	BMP2
Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	12/jan	0.010749535	0.027355712	0	10.679.679.144.385.000	4.840.984.098.875.240	CASP3
D4-GDI signaling pathway	12/jan	0.010749535	0.027355712	0	10.679.679.144.385.000	4.840.984.098.875.240	CASP3
Activation of DNA fragmentation factor	13/jan	0.011640389	0.028827541	0	978.921.568.627.451	43.594.063.546.940.700	CASP3
Kesop1-NfY2 pathway	13/jan	0.011640389	0.028827541	0	978.921.568.627.451	43.594.063.546.940.700	HMOX1
Downregulation of ERBB2-ERBB3 signaling	13/jan	0.011640389	0.028827541	0	978.921.568.627.451	43.594.063.546.940.700	AKT3
PI3K class IB pathway	13/jan	0.011640389	0.028827541	0	978.921.568.627.451	43.594.063.546.940.700	AKT3
Chemokine signaling pathway	2/189	0.012304404	0.030220585	0	13.231.951.871.657.700	5.819.145.194.893.290	AKT3,BRAF
AKT phosphorylation of cytosolic targets	14/jan	0.012530487	0.030220585	0	9.035.746.606.334.840	3.957.287.161.899.810	AKT3
Porphyryn metabolism	14/jan	0.012530487	0.030220585	0	9.035.746.606.334.840	3.957.287.161.899.810	HMOX1
DCC-mediated attractive signaling	14/jan	0.012530487	0.030220585	0	9.035.746.606.334.840	3.957.287.161.899.810	DCC1
TGF-beta regulation of extracellular matrix	3/565	0.013338813	0.031144127	0	6.911.032.028.649.750	298.354.587.230.138	TGFBI,MYC,DLC1
Repression of pain sensation by the transcriptional regulator DREAM	15/jan	0.013419827	0.031144127	0	8.389.915.966.386.550	3.616.911.269.349.320	FOS
Calcium signaling by HbX of hepatitis B virus	15/jan	0.013419827	0.031144127	0	8.389.915.966.386.550	3.616.911.269.349.320	FOS
Signaling to p38 via RIT and RIN	15/jan	0.013419827	0.031144127	0	8.389.915.966.386.550	3.616.911.269.349.320	BRAF
Stress induction of HSP regulation	15/jan	0.013419827	0.031144127	0	8.389.915.966.386.550	3.616.911.269.349.320	CASP3
Erythrocyte differentiation pathway	15/jan	0.013419827	0.031144127	0	8.389.915.966.386.550	3.616.911.269.349.320	TGFBI
Jak-STAT signaling pathway	2/199	0.015723777	0.031301295	0	12.553.934.010.152.200	53.978.383.873.324.000	MVC,AKT3
Selenium metabolism and selenoproteins	16/jan	0.014308411	0.032193925	0	7.830.196.078.431.370	3.325.412.031.884.900	FOS
Interleukin-10 anti-inflammatory signaling pathway	16/jan	0.014308411	0.032193925	0	7.830.196.078.431.370	3.325.412.031.884.900	HMOX1
Sprouty regulation of FGF signaling	16/jan	0.014308411	0.032193925	0	7.830.196.078.431.370	3.325.412.031.884.900	BRAF
TGF-beta receptor signaling in EMT (epithelial to mesenchymal transition)	16/jan	0.014308411	0.032193925	0	7.830.196.078.431.370	3.325.412.031.884.900	TGFBI
ACE inhibitor pathway	17/jan	0.015196239	0.033577319	0	7.340.441.176.470.580	3.073.227.868.533.230	TGFBI
Apoptotic cleavage of cellular proteins	17/jan	0.015196239	0.033577319	0	7.340.441.176.470.580	3.073.227.868.533.230	CASP3
Beta-catenin phosphorylation cascade	17/jan	0.015196239	0.033577319	0	7.340.441.176.470.580	3.073.227.868.533.230	AXIN1
Pertussis toxin-insensitive CCR5 signaling in macrophage	18/jan	0.016083312	0.034706095	0	6.908.304.498.269.890	2.853.111.137.768.620	FOS
Bone remodeling	18/jan	0.016083312	0.034706095	0	6.908.304.498.269.890	2.853.111.137.768.620	FOS
Serotonin receptor 4/6/7 and NR3C signaling	18/jan	0.016083312	0.034706095	0	6.908.304.498.269.890	2.853.111.137.768.620	BRAF
Effect of METs on macrophage differentiation	18/jan	0.016083312	0.034706095	0	6.908.304.498.269.890	2.853.111.137.768.620	FOS
Gap junction assembly	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	GJA1
Apoptosis modulation by HSP70	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	CASP3
Cell cycle progression regulation by PLK3	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	CASP3
TP53 network	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	MYC
Telomeres, telomerase, cellular aging, and immortality	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	MYC
Tob role in T-cell activation	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	TGFBI
FRS3-mediated activation	19/jan	0.016996631	0.035178617	0	6.524.183.006.535.940	2.659.472.259.849.420	BRAF
Gene expression regulation in pancreatic beta cells	20/jan	0.017855195	0.036200918	0	61.804.953.560.371.500	24.879.341.471.282.000	AKT3
Apoptotic signaling in response to DNA damage	20/jan	0.017855195	0.036200918	0	61.804.953.560.371.500	24.879.341.471.282.000	CASP3
Signaling by Hippo	20/jan	0.017855195	0.036200918	0	61.804.953.560.371.500	24.879.341.471.282.000	CASP3
Nerve growth factor (NGF) pathway	20/jan	0.017855195	0.036200918	0	61.804.953.560.371.500	24.879.341.471.282.000	FOS
IGF1 signaling pathway	21/jan	0.018740007	0.037378716	0	5.871.176.470.588.230	23.350.224.496.360.500	FOS
CD28-dependent PI3K/Akt signaling	21/jan	0.018740007	0.037378716	0	5.871.176.470.588.230	23.350.224.496.360.500	AKT3
Mitochondrial role in apoptotic signaling	21/jan	0.018740007	0.037378716	0	5.871.176.470.588.230	23.350.224.496.360.500	CASP3
CTLA4 inhibitory signaling	22/jan	0.019624065	0.038991613	0	5.591.316.526.610.640	2.197.945.772.360.190	AKT3
Incretin biosynthesis, secretion, and inactivation	23/jan	0.020507371	0.040038201	0	5.336.898.395.721.920	2.074.368.622.737.000	TCF7L2
Signaling by bone morphogenetic protein (BMP)	23/jan	0.020507371	0.040038201	0	5.336.898.395.721.920	2.074.368.622.737.000	BMP2
Mismatch repair	23/jan	0.020507371	0.040038201	0	5.336.898.395.721.920	2.074.368.622.737.000	MSH2
Signal transduction of S1R receptor	24/jan	0.021389268	0.041233993	0	510.460.358.056.266	19.626.359.689.838.600	MYC
Tumor suppressor Arf inhibits ribosomal biogenesis	24/jan	0.021389268	0.041233993	0	510.460.358.056.266	19.626.359.689.838.600	MYC
Alpha-9 beta-1 integrin pathway	25/jan	0.02227173	0.042293946	0	48.916.666.666.666.600	18.610.038.260.880.100	HIF1
IGF1 receptor signaling through beta-arrestin	25/jan	0.02227173	0.042293946	0	48.916.666.666.666.600	18.610.038.260.880.100	AKT3
TPO signaling pathway	25/jan	0.02227173	0.042293946	0	48.916.666.666.666.600	18.610.038.260.880.100	FOS
ALK1 pathway	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	TGFBI
Physiological and pathological hypertrophy of the heart	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	FOS
RXR/VDOR pathway	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	TGFBI
Inhibition of activated T cell apoptosis by neuropeptides VIP and PACAP	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	MYC
Selective expression of chemokine receptors during T-cell polarization	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	TGFBI
Interleukin-27-mediated signaling events	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	TGFBI
Interleukin-9 regulation of target genes	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	MYC
TGF-beta signaling in development	26/jan	0.023152783	0.042293946	0	4.695.764.705.882.350	17.682.560.723.797.100	TGFBI
G-protein beta-gamma signaling	28/jan	0.024912641	0.044842754	0	43.474.945.533.769.000	16.052.601.632.867.900	AKT3
Cell cycle: G1/S checkpoint	28/jan	0.024912641	0.044842754	0	43.474.945.533.769.000	16.052.601.632.867.900	TGFBI
TGF-beta receptor activation of SMADs	28/jan	0.024912641	0.044842754	0	43.474.945.533.769.000	16.052.601.632.867.900	TGFBI
S1P5/S1P3 pathway	29/jan	0.025791447	0.045772313	0	4.192.016.806.722.680	15.333.191.684.558.900	AKT3
T cell receptor calcium pathway	29/jan	0.025791447	0.045772313	0	4.192.016.806.722.680	15.333.191.684.558.900	FOS
Gap junction trafficking and regulation	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	GJA1
Apoptosis intrinsic pathway	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	FOS
Interleukin-2/STAT5 pathway	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	MYC
Signaling pathway from G-protein families	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	FOS
TNFR1 signaling pathway	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	CASP3
Nuclear necrosis factor (TNF) pathway	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	FOS
Tumor events mediated by MAP kinases	30/jan	0.026669505	0.045772313	0	4.047.261.663.286.000	14.668.225.415.832.800	FOS
PI3K signaling pathway	31/jan	0.027546815	0.046414496	0	3.912.156.862.745.090	14.051.952.455.455.300	FOS
Alpha-V beta-3 integrin/OPN pathway	31/jan	0.027546815	0.046414496	0	3.912.156.862.745.090	14.051.952.455.455.300	FOS
CD28 co-stimulation	31/jan	0.027546815	0.046414496	0	3.912.156.862.745.090	14.051.952.455.455.300	MYC
CD40/CD40L signaling	31/jan	0.027546815	0.046414496	0	3.912.156.862.745.090	14.051.952.455.455.300	TGFBI
NF-kappaB activation by non-typeable Hemophilus influenzae	31/jan	0.027546815	0.046414496	0	3.912.156.862.745.090	14.051.952.455.455.300	TGFBI
Pancreatic beta-cell development regulation	1/32	0.028423378	0.047458039	0	3.785.768.500.948.760	13.479.392.621.731.500	AKT3
Nicotin-mediated signaling events	1/32	0.028423378	0.047458039	0	3.785.768.500.948.760	13.479.392.621.731.500	MYC
Glucocorticoid-VII-mediated activation cascade	1/33	0.029299196	0.048700015	0	3.667.279.411.764.700	1.294.621.221.594.000	AKT3
Induction of apoptosis through DR3 and DR4/5 death receptors	1/34	0.030174267	0.049485799	0	35.559.714.795.008.900	12.448.623.298.308.200	CASP3
Interleukin-7 interactions in immune response	1/34	0.030174267	0.049485799	0	35.559.714.795.008.900	12.448.623.298.308.200	BRAF
EPO receptor signaling	1/34	0.030174267	0.049485799	0	35.559.714.795.008.900	12.448.623.298.308.200	FOS
Interleukin-2/PI3K pathway	1/35	0.031048594	0.050030267	0	345.121.107.266.436	11.983.301.120.641.300	MYC
Interleukin-7 signaling pathway	1/35	0.031048594	0.050030267	0	345.121.107.266.436	11.983.301.120.641.300	TGFBI
Cytokines and inflammatory response	1/35	0.031048594	0.050030267	0	345.121.107.266.436	11.983.301.120.641.300	AKT3
PI3K/AKT pathway	1/35	0.031048594	0.050030267	0	345.121.107.266.436	11.983.301.120.641.300	AKT3
Oncostatin M	2/311	0.031297869	0.050212669	0	7.958.333.333.333.300	27.569.300.183.404.600	MYC,HMOX1
GM-CSF-mediated signaling events	1/36	0.031922171	0.050772772	0	3.352.436.974.789.910	11.547.316.040.046.500	FOS
Signaling to ERKs	1/36	0.031922171	0.050772772	0	3.352.436.974.789.910	11.547.316.040	

Adipocytokine signaling pathway	1/67	0.058637218	0.075919766	0	0	17.750.445.632.798.500	5.034.710.965.358.100	AKT3
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	1/68	0.05948279	0.076751084	0	0	17.484.635.645.302.800	4.934.151.245.602.000	CASP3
G alpha q pathway	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	AKT3
Hedgehog signaling pathway	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	BMPT2
CDc42 signaling events	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	BRAF
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	BRAF
Long term depression	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	BRAF
Long-term potentiation	1/70	0.06185256	0.07731973	0	0	1.697.612.958.226.760	4.742.874.202.866.330	BRAF
Cell cycle	2/453	0.061678182	0.077676618	0	0	5.413.248.337.028.820	15.080.362.693.436.100	TGFB1,MYC
Viral myocarditis	1/71	0.062033159	0.077857945	0	0	1.67.327.731.092.437	4.651.855.173.584.370	CASP3
Costimulation by the CD28 family	1/72	0.062880335	0.078124053	0	0	16.496.271.748.135.800	4.563.729.539.644.480	AKT3
Cyclin A-Cdk2-associated events at S phase entry	1/72	0.062880335	0.078124053	0	0	16.496.271.748.135.800	4.563.729.539.644.480	MYC
Myoicre adrenergic pathway	1/72	0.062880335	0.078124053	0	0	16.496.271.748.135.800	4.563.729.539.644.480	AKT3
Signaling by NOTCH1	1/73	0.063726788	0.078379144	0	0	16.266.339.869.281.000	44.783.677.915.691.100	MYC
Degradation of beta-catenin by the destruction complex	1/73	0.063726788	0.078379144	0	0	16.266.339.869.281.000	44.783.677.915.691.100	AXIN1
Myc repressed pathway	1/73	0.063726788	0.078379144	0	0	16.266.339.869.281.000	44.783.677.915.691.100	MYC
Adherens junction cell adhesion	1/74	0.064572519	0.078379144	0	0	16.042.707.493.956.400	4.395.647.876.269.950	TGFB1,2
RANKL regulation of apoptosis and immune response	1/74	0.064572519	0.078379144	0	0	16.042.707.493.956.400	4.395.647.876.269.950	BMPT2
Seven transmembrane receptor signaling through beta-arrestin	1/74	0.064572519	0.078379144	0	0	16.042.707.493.956.400	4.395.647.876.269.950	MYC
E2F transcription factor network	1/76	0.066261818	0.080165937	0	0	15.613.333.333.333.000	42.376.795.202.067.300	AKT3
VEGF signaling pathway	1/77	0.067105386	0.080657614	0	0	15.407.120.743.034.000	4.162.219.761.611.140	CASP3
Mitochondrial pathway of apoptosis: caspases	1/77	0.067105386	0.080657614	0	0	15.407.120.743.034.000	4.162.219.761.611.140	TGFB1
Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation	1/78	0.067948234	0.081405514	0	0	15.206.264.323.911.300	4.088.978.353.793.220	AKT3
Signaling by SYK-Kit	1/79	0.068790363	0.081882723	0	0	15.010.558.669.381.500	40.178.634.862.671.200	MYC
p73 transcription factor network	1/79	0.068790363	0.081882723	0	0	15.010.558.669.381.500	40.178.634.862.671.200	AKT3
Fc epsilon receptor 1 signaling pathway	1/82	0.071312441	0.084618688	0	0	14.452.432.824.981.800	3.816.431.494.463.280	FOS
Regular glucocorticoid receptor pathway	1/85	0.073828067	0.086759735	0	0	13.934.173.669.467.700	3.631.268.374.332.490	MYC
C-Myc transcription factor network	1/85	0.073828067	0.086759735	0	0	13.934.173.669.467.700	3.631.268.374.332.490	MYC
MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	1/85	0.073828067	0.086759735	0	0	13.934.173.669.467.700	3.631.268.374.332.490	TGFB1
Myc active pathway	1/88	0.076337257	0.089423644	0	0	13.451.656.524.678.800	3.460.565.311.468.720	FOS
Androgen receptor signaling, proteolysis, and transcription regulation	1/90	0.078006481	0.091009847	0	0	13.148.050.213.128.400	3.540.194.413.609.900	GJA1
Gas junction pathway	1/93	0.080504977	0.093710841	0	0	12.717.391.304.347.800	32.040.656.856.642.000	AKT3
Fc gamma receptor-mediated phagocytosis	1/94	0.081336387	0.094389002	0	0	12.580.012.650.221.300	31.565.287.091.339.000	AKT3
Mitochondrial pathway of apoptosis: Bcl-2 family	1/97	0.08382636	0.096965288	0	0	12.185.049.019.607.800	3.020.683.114.705.010	AKT3
Downstream signaling events of B cell receptor (BCR)	1/98	0.084654933	0.09761772	0	0	12.058.823.529.411.700	29.775.308.154.544.300	AKT3
Dilated cardiomyopathy	1/100	0.086309957	0.099216119	0	0	1.181.402.257.872.840	28.942.114.306.609.300	TGFB1
Melanogenesis	1/101	0.087136409	0.099545929	0	0	11.695.294.117.647.000	28.539.797.811.620.900	TGFB1,2
TNF-alpha signaling pathway	1/102	0.087962155	0.100179121	0	0	11.578.916.715.200.900	28.146.593.675.405.000	AKT3
Signaling by ERBB2	1/105	0.090435162	0.102678691	0	0	11.243.212.669.683.200	270.188.131.977.752	AKT3
Fibroblast growth factor receptor pathway	1/110	0.094542772	0.107013137	0	0	10.724.770.642.201.800	25.296.548.009.342.800	FOS
Leptin influence on immune response	1/111	0.095362189	0.107282462	0	0	10.626.737.967.914.400	24.973.611.307.863.400	AKT3
Signaling by EGFR in cancer	1/111	0.095362189	0.107282462	0	0	10.626.737.967.914.400	24.973.611.307.863.400	AKT3
Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway	1/112	0.096180905	0.107874632	0	0	10.530.471.648.118.700	24.657.356.652.146.000	MYC
S phase	1/115	0.098632858	0.110289468	0	0	10.251.805.985.552.100	2.374.677.927.740.430	CASP3
Fas signaling pathway	1/116	0.099448779	0.110865859	0	0	10.162.148.337.595.900	23.455.382.166.428.700	BRAF
Vascular smooth muscle contraction	1/118	0.101078528	0.112005936	0	0	9.987.430.869.783.810	22.889.768.968.042.200	HMOX1
Proctant regulation of apoptosis	1/118	0.101078528	0.112005936	0	0	9.987.430.869.783.810	22.889.768.968.042.200	CASP3
p53 activity regulation	1/119	0.101892357	0.1125697	0	0	9.920.293.120.638.080	22.615.236.179.842.300	MYC
Signaling by NOTCH	1/120	0.102705491	0.113129332	0	0	9.818.586.258.032.620	223.460.193.071.682	BRAF
G alpha s pathway	1/121	0.103517929	0.113684869	0	0	9.736.274.509.803.920	2.208.197.234.292.850	MYC
Notch signaling pathway	1/122	0.104329673	0.114236348	0	0	9.655.323.286.339.320	2.182.295.649.315.510	AKT3
Signaling by PDGF	1/123	0.105140722	0.114783806	0	0	9.575.699.132.111.860	21.568.837.265.640.800	DLG1
Rho GTPase cycle	1/124	0.105951078	0.115327278	0	0	9.489.736.967.957.915	2.131.948.479.946.900	CASP3
p75 neurotrophin receptor-mediated signaling	1/125	0.106760741	0.115527018	0	0	9.420.303.605.313.090	21.074.773.673.487.500	TGFB1,2
Integration of energy metabolism	1/125	0.106760741	0.115527018	0	0	9.420.303.605.313.090	21.074.773.673.487.500	FOS
Interleukin-1 signaling pathway	1/129	0.109992471	0.118676088	0	0	9.124.080.882.352.940	2.013.997.932.609.550	DCC
Cell-cell communication	1/131	0.111604193	0.120063986	0	0	8.982.805.429.864.250	19.697.465.749.311.600	CASP3
Parkinson's disease	1/133	0.113211357	0.121088855	0	0	8.845.811.051.693.400	19.270.448.026.035.900	GJA1
Membrane trafficking	1/133	0.113211357	0.121088855	0	0	8.845.811.051.693.400	19.270.448.026.035.900	AKT3
Tight junction	1/135	0.114493369	0.122451871	0	0	8.712.906.057.945.560	18.858.171.061.574.900	MYC
Mitotic G1-G1/S phases	1/137	0.116422834	0.123804108	0	0	8.583.910.034.602.070	18.459.936.845.641.200	MYC
Diabetes pathways	1/139	0.118023554	0.125145665	0	0	8.458.653.026.427.960	18.075.050.872.110.700	MSH2
p53 signaling pathway	1/142	0.120419501	0.127320332	0	0	8.277.430.120.984.560	17.521.447.135.021.600	TGFB1
Influenza infection	1/144	0.122013382	0.128636966	0	0	8.160.839.160.839.160	17.167.341.601.168.900	FOS
Interleukin-5 regulation of apoptosis	1/149	0.12598616	0.132446989	0	0	7.883.147.853.736.080	1.633.059.681.765.110	GJA1
Calcium regulation in the cardiac cell	1/151	0.127570512	0.133731588	0	0	7.777.254.901.960.780	16.014.036.926.399.900	AKT3
Signaling by the B cell receptor (BCR)	1/152	0.128361671	0.134319763	0	0	7.725.300.342.812.620	15.853.418.874.897.400	MYC
EGFR1 pathway	1/159	0.133880838	0.139553755	0	0	7.380.491.437.081.160	14.840.730.151.520.000	FOS
Toll receptor cascades	1/169	0.141708134	0.147296624	0	0	6.937.675.070.028.010	13.556.118.103.313.000	CASP3
Alzheimer's disease	1/184	0.15332392	0.158922827	0	0	6.364.191.578.270.650	11.934.147.775.031.400	CASP3
Huntington's disease	1/190	0.157928531	0.163237053	0	0	6.160.286.336.756.920	11.369.502.600.305.900	BRAF
Transmission across chemical synapses	1/201	0.166308956	0.171419007	0	0	5.818.235.294.117.640	10.437.379.086.756.500	TGFB1
Endocytosis	1/226	0.189063368	0.190218337	0	0	5.165.228.758.169.930	8.714.035.232.942.250	BRAF
Actin cytoskeleton regulation	2/998	0.22577924	0.231360348	0	0	2.382.781.124.497.900	35.460.629.659.357.000	AKT3,FOS
Immune system	1/283	0.22634405	0.231360348	0	0	41.093.032.957.863.900	6.105.181.726.167.220	BRAF
Neuronal system	1/319	0.251390436	0.256251577	0	0	36.374.398.816.130.200	5.022.387.932.343.220	FOS
Axon guidance	1/325	0.25489583	0.259712511	0	0	35.689.905.591.866.300	4.870.150.440.253.560	DCC
Generic transcription pathway	1/377	0.290138235	0.29412365	0	0	30.672.715.894.868.500	3.795.435.110.430.700	MYC
Transmembrane transport of small molecules	1/432	0.325125622	0.332688643	0	0	2.666.349.938.583.320	29.980.076.052.940.500	HMOX1
Adaptive immune system	1/606	0.425394599	0.42888144	0	0	1.884.005.833.738.450	1.610.331.153.963.720	AKT3
Gene expression	1/968	0.590728484	0.593947713	0	0	11.567.005.292.292.700	0.608885753	MYC
Signaling by GPCR	1/977	0.594199762	0.595814435	0	0	11.454.918.032.786.800	0.596273979	AKT3
Metabolism	1/1615	0.780459085	0.780459085	0	0	0.669436548	0.16593522	HMOX1

BioPlanet 2019 G1xG2 Table

Term	Overlap	P-value	Adjusted P-value	Old P-value	Old Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Colorectal cancer	3/62	2.84E+07	3,94E+09	0	0	59814	10.394.539.032.742.900	MAPK10;AKT3;BIRC5
Apoptosis	3/242	1,75E+10	1,22E+12	0	0	59274	7.857.374.989.285.320	MAPK10;AKT3;BIRC5
Pathways in cancer	3/325	4,25E+09	1,56E+11	0	0	59025	7.300.309.138.756.050	MAPK10;AKT3;BIRC5
IGF1 receptor signaling through beta-arrestin	25/fev	4,50E+10	1,56E+11	0	0	17.368.695.652.173.900	21.384.724.596.795.100	MAPK10;AKT3
Natural killer cell receptor signaling pathway	2/60	2,65E+11	6,24E+11	0	0	687.551.724.137.931	7.245.708.334.233.760	MAPK10;AKT3
Adipocytokine signaling pathway	2/67	3,31E+10	6,24E+11	0	0	6.132.923.076.923.070	6.326.837.237.900.450	MAPK10;AKT3
Pancreatic cancer	2/70	3,61E+10	6,24E+11	0	0	5.861.470.588.235.290	59.951.300.122.650.900	MAPK10;AKT3
Myocyte adrenergic pathway	2/72	3,83E+10	6,24E+11	0	0	5.693.428.571.428.570	5.790.986.926.267.430	MAPK10;AKT3
Seven transmembrane receptor signaling through beta-arrestin	2/74	4,04E+10	6,24E+11	0	0	5.534.722.222.222.220	5.599.058.010.484.020	MAPK10;AKT3
Fc epsilon receptor 1 signaling pathway	2/79	4,61E+11	6,30E+11	0	0	5.174.025.974.025.970	5.166.148.011.925.250	MAPK10;AKT3
Differentiation pathway in PC12 cells	2/84	5,21E+11	6,30E+11	0	0	4.857.317.073.170.730	4.790.013.726.354.360	MAPK10;AKT3
Progesterone-mediated oocyte maturation	2/86	5,47E+10	6,30E+11	0	0	4.741.190.476.190.470	4.653.082.338.545.230	MAPK10;AKT3
ERBB signaling pathway	2/94	6,54E+10	6,30E+11	0	0	4.327.173.913.043.470	4.169.463.410.390.570	MAPK10;AKT3
Mitochondrial pathway of apoptosis: BH3-only Bcl-2 family	2/97	6,96E+10	6,30E+11	0	0	4.189.894.736.842.100	4.107.639.521.960.800	MAPK10;AKT3
Integrin-mediated cell adhesion	2/100	7,40E+10	6,30E+11	0	0	4.061.020.408.163.260	38.625.739.352.565.200	MAPK10;AKT3
Chagas disease	2/104	8,01E+10	6,30E+11	0	0	3.900.980.392.156.860	3.679.655.006.315.530	MAPK10;AKT3
Interleukin-4 signaling pathway	2/104	8,01E+10	6,30E+11	0	0	3.900.980.392.156.860	3.679.655.006.315.530	AKT3;BIRC5
Fibroblast growth factor receptor pathway	2/105	8,16E+10	6,30E+11	0	0	38.629.126.213.592.200	36.363.309.907.873.100	MAPK10;AKT3
G alpha i pathway	2/108	8,64E+10	6,32E+11	0	0	3.753.018.867.924.520	35.116.752.086.512.400	MAPK10;AKT3
Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway	2/111	9,12E+10	6,34E+11	0	0	36.491.743.119.266.000	3.394.456.097.024.390	MAPK10;AKT3
Neurotrophin signaling pathway	2/126	1,18E+11	7,79E+11	0	0	3.053.225.806.451.600	29.001.433.970.041.900	MAPK10;AKT3
Adrenergic pathway	2/137	1,39E+12	8,79E+11	0	0	2.942.518.518.518.510	26.130.227.657.037.000	MAPK10;AKT3
Toll-like receptor signaling pathway regulation	2/142	1,49E+12	9,03E+11	0	0	2.836.714.285.714.280	24.987.030.710.925.300	MAPK10;AKT3
Integrin signaling pathway	2/155	1,78E+12	0,001031579	0	0	25.939.869.281.045.700	22.394.108.049.197.400	MAPK10;AKT3
Antigen-activated B-cell receptor generation of second messengers	2/211	3,30E+12	0,001834888	0	0	18.935.885.167.464.100	15.179.705.750.394.200	MAPK10;AKT3
Wnt signaling pathway	2/231	3,95E+11	0,002071132	0	0	17.264.628.820.960.600	13.527.714.936.431.500	MAPK10;AKT3
Focal adhesion	2/233	4,02E+12	0,002071132	0	0	17.113.419.913.419.900	13.379.779.884.064.000	MAPK10;AKT3
Insulin signaling pathway	2/277	5,68E+10	0,002820442	0	0	14.343.272.727.272.700	10.718.915.909.514.300	MAPK10;AKT3
MAPK signaling pathway	2/314	7,29E+11	0,003496408	0	0	12.618.589.743.589.700	9.114.465.636.368.717	MAPK10;AKT3
Negative regulation of the PI3K/Akt network	07/jan	0,001049651	0,004706546	0	0	16.659.166.666.666.600	11.427.001.554.688.200	AKT3
Fas signaling pathway in cardiomyocytes	07/jan	0,001049651	0,004706546	0	0	16.659.166.666.666.600	11.427.001.554.688.200	AKT3
AKT phosphorylation of nuclear targets	09/jan	0,001349432	0,005861595	0	0	12.493.125	82.555.464.452.602	AKT3
Activation of the AP-1 family of transcription factors	10/jan	0,001499295	0,006315211	0	0	11.104.444.444.444.400	7.220.954.198.683.590	MAPK10
Downregulation of ERBB2-ERBB3 signaling	13/jan	0,001948794	0,007739496	0	0	8.327.083.333.333.330	5.196.553.511.599.690	AKT3
PI3K class Iβ pathway	13/jan	0,001948794	0,007739496	0	0	8.327.083.333.333.330	5.196.553.511.599.690	AKT3
AKT phosphorylation of cytosolic targets	14/jan	0,002098597	0,008102916	0	0	7.686.153.846.153.840	4.739.656.184.381.280	AKT3
JNK (c-Jun kinases) phosphorylation and activation mediated by activated human TAK1	16/jan	0,002398159	0,008772212	0	0	6.660.666.666.666.660	40.184.162.309.154.800	MAPK10
B cell survival pathway	16/jan	0,002398159	0,008772212	0	0	6.660.666.666.666.660	40.184.162.309.154.800	MAPK10
G-protein-independent seven transmembrane receptor signaling	19/jan	0,002847389	0,009894676	0	0	5.549.722.222.222.220	3.252.888.056.951.120	MAPK10
Apoptosis modulation by HSP70	19/jan	0,002847389	0,009894676	0	0	5.549.722.222.222.220	3.252.888.056.951.120	MAPK10
Gene expression regulation in pancreatic beta cells	20/jan	0,002997102	0,010160908	0	0	5.257.368.421.052.630	30.545.885.497.256.300	AKT3
CD28-dependent PI3K/Akt signaling	21/jan	0,003146801	0,010414412	0	0	499.425	28.773.716.896.348.600	AKT3
CTLA4 inhibitory signaling	22/jan	0,003296484	0,010644784	0	0	4.756.190.476.190.470	2.718.114.679.972.290	AKT3
Mitochondrial pathway of apoptosis: antiapoptotic Bcl-2 family	23/jan	0,003446153	0,010644784	0	0	45.397.727.272.727.200	25.747.663.877.793	MAPK10
Interleukin-11 pathway	23/jan	0,003446153	0,010644784	0	0	45.397.727.272.727.200	25.747.663.877.793	BIRC5
Signal transduction of 51P receptor	24/jan	0,003595807	0,010665559	0	0	4.342.173.913.043.470	24.437.697.931.466.800	AKT3
Oxidative stress	27/jan	0,004044678	0,01196192	0	0	3.840.576.923.076.920	21.162.935.816.693.600	MAPK10
Protein beta-gamma signalling	28/jan	0,004194272	0,012145912	0	0	3.681.481.481.481.480	2.024.379.431.258.310	AKT3
S1P/S1P3 pathway	29/jan	0,004343851	0,012176829	0	0	3.565.892.857.142.850	19.394.870.011.141.500	AKT3
Tumor necrosis factor (TNF) pathway	30/jan	0,004493415	0,012176829	0	0	3.442.758.620.689.650	1.860.860.040.913.560	MAPK10
Nuclear events mediated by MAP kinases	30/jan	0,004493415	0,012176829	0	0	3.442.758.620.689.650	1.860.860.040.913.560	MAPK10
CD28 co-stimulation	31/jan	0,004642964	0,012176829	0	0	33.278.333.333.333.300	1.787.845.973.802.920	AKT3
CD40/CD40L signaling	31/jan	0,004642964	0,012176829	0	0	33.278.333.333.333.300	1.787.845.973.802.920	MAPK10
Pancreatic beta-cell development regulation	1/32	0,004792498	0,012362440	0	0	32.203.225.806.451.600	17.198.788.256.956.100	AKT3
Glycoprotein VI-mediated activation cascade	1/33	0,004942017	0,012489824	0	0	311.953.125	16.564.654.076.932.600	AKT3
PI3K/AKT pathway	1/35	0,00524101	0,013008936	0	0	2.935.735.294.117.640	15.416.253.665.904.200	AKT3
PI3K/AKT activation	1/37	0,005539943	0,013509687	0	0	2.772.361.111.111.110	14.404.553.417.617.100	AKT3
G13 signaling pathway	1/39	0,005838817	0,013526593	0	0	26.261.842.105.263.100	13.507.061.704.673.400	MAPK10
GAB1 signalosome	1/39	0,005838817	0,013526593	0	0	26.261.842.105.263.100	13.507.061.704.673.400	AKT3
Aurora B signaling	1/39	0,005838817	0,013526593	0	0	26.261.842.105.263.100	13.507.061.704.673.400	BIRC5
FOXM1 transcription factor network	1/41	0,006137631	0,013985749	0	0	2.494.625	12.705.914.609.940.400	AKT3
Cell differentiation by G alpha (i/o) pathway inferred from mouse Neuro2A model	1/43	0,006436385	0,01408335	0	0	2.375.595.238.095.230	11.986.750.596.729.200	AKT3
PI3K class Iβ pathway in neutrophils	1/43	0,006436385	0,01408335	0	0	2.375.595.238.095.230	11.986.750.596.729.200	AKT3
ERBB2/ERBB3 signaling events	1/44	0,006585739	0,01408335	0	0	23.202.325.581.395.300	1.165.417.705.666.180	MAPK10
PI3K events in ERBB2 signaling	1/44	0,006585739	0,01408335	0	0	23.202.325.581.395.300	1.165.417.705.666.180	AKT3
Immune system	2/988	0,007215037	0,014988058	0	0	3.815.461.847.389.550	18.816.285.761.966.800	MAPK10;AKT3
FoxO family signaling	1/49	0,007332288	0,014988058	0	0	20.780.208.333.333.300	10.214.444.344.646.400	MAPK10
G alpha 12 pathway	1/49	0,007332288	0,014988058	0	0	20.780.208.333.333.300	10.214.444.344.646.400	MAPK10
Type 2 diabetes mellitus	1/50	0,007481552	0,015071533	0	0	20.355.102.040.816.300	9.964.463.577.649.720	MAPK10
Endometrial cancer	1/52	0,007780037	0,015307871	0	0	19.554.901.960.784.300	9.496.240.090.215.040	AKT3
JNK/MAPK pathway	1/53	0,007929257	0,015307871	0	0	19.177.884.615.384.600	9.276.718.550.806.610	MAPK10
PI3K pathway	1/53	0,007929257	0,015307871	0	0	19.177.884.615.384.600	9.276.718.550.806.610	AKT3
Non-small cell lung cancer	1/54	0,008078462	0,015382277	0	0	1.881.509.433.962.260	906.615.436.737.158	AKT3
Acute myeloid leukemia	1/57	0,00825987	0,015801496	0	0	17.804.464.285.714.200	8.483.179.948.344.080	AKT3
PI3K cascade	1/57	0,00825987	0,015801496	0	0	17.804.464.285.714.200	8.483.179.948.344.080	AKT3
Shigellosis	1/62	0,009271564	0,016957202	0	0	16.340.983.606.557.300	7.648.892.871.354.380	MAPK10
Angiotensin II-stimulated signaling through G-proteins and beta-arrestin	1/64	0,00956969	0,017275154	0	0	15.820.634.920.634.900	7.355.257.596.653.150	MAPK10
Glioma	1/65	0,00971873	0,017319276	0	0	1.557.265.625	7.215.902.191.436.580	AKT3
G alpha 13 pathway	1/67	0,010016767	0,017561425	0	0	15.099.242.424.242.400	6.950.928.600.722.870	AKT3
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	1/68	0,010165762	0,017561425	0	0	14.873.134.328.358.200	6.824.879.536.219.700	MAPK10
G alpha q pathway	1/70	0,010463709	0,017561425	0	0	14.440.579.710.144.900	6.584.667.662.524.263	AKT3
Renal cell carcinoma	1/70	0,010463709	0,017561425	0	0	14.440.579.710.144.900	6.584.667.662.524.263	AKT3
Melanoma	1/71	0,01061266	0,017561425	0	0	1.423.357.142.857.140	6.470.165.481.479.880	AKT3
RIG-I-like receptor signaling pathway	1/71	0,01061266	0,017561425	0	0	1.423.357.142.857.140	6.470.165.481.479.880	MAPK10
Costimulation by the CD28 family	1/72	0,010761596	0,017598374	0	0	14.032.394.366.197.100	6.359.160.389.879.960	AKT3
Chronic myeloid leukemia	1/73	0,010910517	0,01763444	0	0	13.836.805.555.555.500	6.251.507.650.815.510	AKT3
VEGF signaling pathway	1/76	0,01135719	0,018145396	0	0	13.281.333.333.333.300	5.947.253	

p75 neurotrophin receptor-mediated signaling	1/124	0,018485692	0,022720205	0	0	8.078.861.788.617.880	32.240.784.145.177.400	MAPK10
Interleukin-1 signaling pathway	1/125	0,018633837	0,022720205	0	0	8.013.306.451.612.900	31.915.205.673.213.100	MAPK10
Signaling by FGFR in disease	1/128	0,019078183	0,023038373	0	0	7.822.834.645.669.290	30.972.243.930.029.500	AKT3
PDGFB signaling pathway	1/129	0,019226268	0,023038373	0	0	7.761.328.125	30.668.715.661.620.900	MAPK10
Tight junction	1/133	0,019818461	0,023545009	0	0	7.524.621.212.121.210	29.505.103.733.791.800	AKT3
NGF signaling via TRKA from the plasma membrane	1/136	0,020262449	0,023868478	0	0	7.356.296.296.296.290	2.868.209.556.494.530	AKT3
T cell receptor signaling pathway	1/139	0,020706303	0,024186354	0	0	7.195.289.855.072.460	27.898.420.614.565.900	AKT3
Signaling by the B cell receptor (BCR)	1/151	0,022480378	0,026039772	0	0	6.615.666.666.666.660	25.107.198.720.733.400	AKT3
Toll receptor cascades	1/159	0,023661904	0,027181857	0	0	6.278.164.556.962.020	23.504.750.782.491.800	MAPK10
Protein processing in the endoplasmic reticulum	1/166	0,024694959	0,028136059	0	0	60.096.969.696.969.600	22.242.826.981.279.400	MAPK10
TGF-beta signaling pathway	1/185	0,027495289	0,031071912	0	0	5.383.967.391.304.340	19.348.582.185.240.300	MAPK10
Chemokine signaling pathway	1/189	0,028084149	0,031481425	0	0	52.683.510.638.297.800	18.821.447.440.701.500	AKT3
Jak-STAT signaling pathway	1/199	0,029555257	0,032865446	0	0	4.999.747.474.747.470	1.760.657.892.808.410	AKT3
Platelet activation, signaling and aggregation	1/205	0,03043721	0,033577557	0	0	4.851.225.490.196.070	16.940.913.189.219.500	AKT3
DNA replication	1/207	0,030731075	0,033634799	0	0	48.036.407.766.990.200	1.672.858.735.070.350	BIRC5
Signaling by NGF	1/221	0,03278647	0,035604058	0	0	4.494.772.727.272.720	15.361.961.581.194.000	AKT3
BDNF signaling pathway	1/261	0,038643014	0,041638596	0	0	3.795.576.923.076.920	12.348.489.256.697.200	BIRC5
Innate immune system	1/319	0,04709294	0,05035322	0	0	3.094.182.389.937.100	9.454.683.296.528.290	MAPK10
Developmental biology	1/420	0,061689026	0,065456294	0	0	2.336.276.849.642.000	6.508.047.809.500.240	AKT3
Cell cycle	1/453	0,066425536	0,069948102	0	0	21.620.575.221.238.900	58.627.945.722.979.900	BIRC5
Hemostasis pathway	1/468	0,068573215	0,071666744	0	0	20.910.064.239.828.600	56.035.904.067.957.400	AKT3
T cell receptor regulation of apoptosis	1/603	0,087754302	0,090790197	0	0	16.108.803.986.710.900	3.919.617.377.159.540	BIRC5
Adaptive immune system	1/606	0,08817753	0,090790197	0	0	16.026.446.280.991.700	3.891.867.207.898.680	AKT3
Disease	1/674	0,097735619	0,099891552	0	0	14.356.612.184.249.600	3.338.614.670.058.460	AKT3
Interleukin-2 signaling pathway	1/847	0,121750886	0,123528272	0	0	1.131.855.791.962.170	23.834.372.942.478.400	AKT3
Signaling by GPCR	1/977	0,139513891	0,140524861	0	0	974.436.475.409.836	19.192.414.181.242.900	AKT3
Signal transduction	1/1020	0,145336193	0,145336193	0	0	931.207.065.750.736	17.960.243.264.604.000	AKT3

BioPlanet 2019 G3xG4 Table

Term	Overlap	P-value	Adjusted P-value	Old P-value	Old Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Endometrial cancer	3/52	1.65E+09	1.45E+11	0	0	6.105.918.367.346.930	953.526.494.342.797	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Non-small cell lung cancer	3/54	1.85E+08	1.45E+11	0	0	5.865.882.352.941.170	909.279.321.905.746	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Acute myeloid leukemia	3/57	2.19E+07	1.45E+11	0	0	5.539.166.666.666.660	8.494.953.665.782.790	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Mechanism of gene regulation by peroxisome proliferators via PPAR-alpha	3/57	2.19E+07	1.45E+11	0	0	5.539.166.666.666.660	8.494.953.665.782.790	PIK3CA;NOS2;MAPK1
Colorectal cancer	3/62	2.82E+09	1.45E+11	0	0	5.068.474.576.271.180	7.643.215.919.737.960	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Glioma	3/65	3.26E+08	1.45E+11	0	0	483.25	7.202.926.940.518.230	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Pathways in cancer	4/325	8.87E+08	1.45E+11	0	0	24.515.887.850.467.200	3.652.982.028.971.920	PIK3CA;NOS2;ARAF;MAPK1
Pancreatic cancer	3/70	4.09E+08	1.45E+11	0	0	44.614.925.373.134.300	6.563.191.588.880.120	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Renal cell carcinoma	3/73	4.09E+08	1.45E+11	0	0	44.614.925.373.134.300	6.563.191.588.880.120	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Melanoma	3/71	4.26E+09	1.45E+11	0	0	43.956.617.647.058.800	6.447.405.323.749.170	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Chronic myeloid leukemia	3/73	4.64E+08	1.45E+11	0	0	4.269.642.857.142.850	6.236.540.189.445.250	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Prolactin activation of MAPK signaling	3/75	5.04E+08	1.45E+11	0	0	4.150.625	6.018.913.927.077.680	PIK3CA;NOS2;MAPK1
Progesterone-mediated oocyte maturation	3/86	7.63E+08	2.02E+11	0	0	359.855.421.686.747	5.069.010.619.469.860	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Prostate cancer	3/89	8.46E+07	2.09E+11	0	0	347.25	485.538.859.092.337	PIK3CA;ARAF;MAPK1
ERBB signaling pathway	3/94	9.99E+07	2.30E+11	0	0	3.280.879.120.879.120	4.533.181.837.907.110	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Chagas disease	3/104	1.36E+10	2.92E+11	0	0	29.545.544.554.455.400	39.919.906.738.377.500	PIK3CA;NOS2;MAPK1
Natural killer cell-mediated cytotoxicity	3/137	3.11E+09	6.32E+10	0	0	22.232.462.686.567.100	28.190.694.458.683.100	PIK3CA;ARAF;MAPK1
Human cytomegalovirus and MAP kinase pathways	18/fev	7.64E+07	1.46E+12	0	0	8.324.583.333.333.330	980.837.516.307.289	PIK3CA;MAPK1
PTEN-dependent cell cycle arrest and apoptosis	19/fev	8.54E+08	1.55E+12	0	0	7.834.509.803.921.560	9.143.887.447.340.030	PIK3CA;MAPK1
Estrogen receptor signaling pathway	20/fev	9.48E+09	1.64E+12	0	0	7.398.888.888.888.880	8.557.579.526.684.430	PIK3CA;MAPK1
Angiogenesis	23/fev	1.26E+11	1.81E+12	0	0	6.340.952.380.952.380	7.152.572.070.560.200	PIK3CA;MAPK1
BAD phosphorylation mediated by IGF1R signaling	23/fev	1.26E+11	1.81E+12	0	0	6.340.952.380.952.380	7.152.572.070.560.200	PIK3CA;MAPK1
CREB transcription factor and its extracellular signals	23/fev	1.26E+11	1.81E+12	0	0	6.340.952.380.952.380	7.152.572.070.560.200	PIK3CA;MAPK1
Collagen binding in corneal epithelia mediated by Erk and PI-3 Kinase	23/fev	1.26E+11	1.81E+12	0	0	6.340.952.380.952.380	7.152.572.070.560.200	PIK3CA;MAPK1
Actin cytoskeleton regulation	3/226	1.40E+11	1.89E+12	0	0	13.299.551.569.506.700	148.639.772.329.154	PIK3CA;ARAF;MAPK1
IGF1 receptor signaling through beta-arrestin	25/fev	1.50E+11	1.89E+12	0	0	5.788.985.507.246.370	6.431.429.930.021.900	PIK3CA;MAPK1
Focal adhesion	3/233	1.53E+11	1.89E+12	0	0	12.890.217.391.304.300	14.288.697.438.603.100	PIK3CA;ARAF;MAPK1
ERBB2 role in signal transduction and oncology	26/fev	1.62E+10	1.89E+12	0	0	554.75	6.118.796.435.190.910	PIK3CA;MAPK1
BAD phosphorylation regulation	27/fev	1.75E+10	1.89E+12	0	0	5.325.333.333.333.330	5.832.818.995.426.610	PIK3CA;MAPK1
ERKS role in neuronal survival pathway	27/fev	1.75E+10	1.89E+12	0	0	5.325.333.333.333.330	5.832.818.995.426.610	PIK3CA;MAPK1
VEGFR1 pathway	27/fev	1.75E+10	1.89E+12	0	0	5.325.333.333.333.330	5.832.818.995.426.610	PIK3CA;MAPK1
ef4E and p70 S6 kinase regulation	27/fev	1.75E+10	1.89E+12	0	0	5.325.333.333.333.330	5.832.818.995.426.610	PIK3CA;MAPK1
TRAIL signaling pathway	28/fev	1.88E+11	1.97E+12	0	0	5.122.025.641.025.641	5.570.304.625.671.950	PIK3CA;MAPK1
Influence of Ras and Rho proteins on G1 to S transition	2/29	2.02E+11	2.05E+10	0	0	493.037.037.037.037	5.328.545.495.992.290	PIK3CA;MAPK1
Inactivation of GSK3 by Akt causes accumulation of beta-catenin in alveolar macrophages	2/30	2.17E+11	2.14E+12	0	0	4.754.047.619.047.610	5.105.230.681.141.120	GIA1;PIK3CA
Alpha-V beta-3 integrin/OPN pathway	2/31	2.32E+11	2.22E+12	0	0	45.898.850.574.712.600	4.898.376.430.167.520	PIK3CA;MAPK1
Netrin-mediated signaling events	2/32	2.47E+11	2.31E+12	0	0	4.436.666.666.666.660	4.706.270.584.187.540	PIK3CA;MAPK1
Insulin signaling pathway	3/277	2.57E+11	2.34E+12	0	0	10.796.167.883.211.600	1.140.857.454.848.980	PIK3CA;ARAF;MAPK1
N-cadherin signaling events	2/34	2.80E+10	2.47E+11	0	0	4.158.958.333.333.330	4.360.553.964.283.010	GIA1;PIK3CA
Interleukin-7 signaling pathway	2/35	2.97E+10	2.50E+11	0	0	40.327.272.727.272.700	4.204.515.497.040.660	PIK3CA;MAPK1
EGF receptor (ErbB1) signaling pathway	2/35	2.97E+10	2.50E+11	0	0	40.327.272.727.272.700	4.204.515.497.040.660	PIK3CA;MAPK1
GM-CSF-mediated signaling events	2/36	3.14E+11	2.52E+11	0	0	3.913.921.568.627.450	40.583.164.477.642.400	PIK3CA;MAPK1
Phospholipids as signaling intermediaries	2/36	3.14E+11	2.52E+11	0	0	3.913.921.568.627.450	40.583.164.477.642.400	PIK3CA;MAPK1
Interleukin-23-mediated signaling events	2/37	3.32E+10	2.57E+10	0	0	3.801.904.761.904.760	39.210.777.680.384.200	PIK3CA;NOS2
Signaling of hepatocyte growth factor receptor	2/38	3.50E+10	2.57E+10	0	0	3.696.111.111.111.110	37.920.209.099.703.400	PIK3CA;MAPK1
Trefoil factor initiation of mucosal healing	2/38	3.50E+10	2.57E+10	0	0	3.696.111.111.111.110	37.920.209.099.703.400	PIK3CA;MAPK1
ERBB4 signaling events	2/38	3.50E+10	2.57E+10	0	0	3.696.111.111.111.110	37.920.209.099.703.400	PIK3CA;MAPK1
Signaling events regulated by Ret tyrosine kinase	2/39	3.69E+10	2.65E+11	0	0	35.960.360.360.360.300	36.704.539.413.007.500	PIK3CA;MAPK1
Bioactive peptide-induced signaling pathway	2/41	4.08E+10	2.82E+11	0	0	34.112.820.512.820.500	344.738.699.212.753	PIK3CA;MAPK1
Fc epsilon receptor 1 signaling in mast cells	2/41	4.08E+10	2.82E+11	0	0	34.112.820.512.820.500	344.738.699.212.753	PIK3CA;MAPK1
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	2/42	4.29E+10	2.84E+12	0	0	3.325.833.333.333.330	33.448.402.322.963.700	PIK3CA;MAPK1
Bladder cancer	2/42	4.29E+10	2.84E+12	0	0	3.325.833.333.333.330	33.448.402.322.963.700	ARAF;MAPK1
Growth hormone receptor signaling	2/43	4.50E+10	2.93E+12	0	0	3.244.552.845.528.450	3.247.674.396.403.270	PIK3CA;MAPK1
ERBB2/ERBB3 signaling events	2/44	4.71E+10	3.01E+11	0	0	3.167.142.857.142.850	31.554.879.486.634.500	PIK3CA;MAPK1
Angiotensin receptor Tie2-mediated signaling	2/49	5.85E+10	3.67E+11	0	0	2.829.503.546.099.290	27.576.532.832.341.300	PIK3CA;MAPK1
Type 2 diabetes mellitus	2/50	6.10E+11	3.76E+12	0	0	2.770.416.666.666.660	26.878.505.476.905	PIK3CA;MAPK1
Interleukin-2 receptor beta chain in T cell activation	2/52	6.60E+10	3.99E+12	0	0	26.593.333.333.333.330	25.599.590.632.869.200	PIK3CA;MAPK1
Thrombin signaling through protease-activated receptors	2/53	6.85E+10	4.08E+12	0	0	26.070.588.235.294.000	2.499.635.583.784.040	PIK3CA;MAPK1
ATF2 transcription factor network	2/59	8.51E+10	4.90E+10	0	0	23.319.298.245.614.000	2.185.509.468.895.310	NOS2;MAPK1
Natural killer cell receptor signaling pathway	2/60	8.80E+10	4.90E+10	0	0	22.916.091.954.022.900	2.139.974.518.717.940	PIK3CA;MAPK1
Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling	2/60	8.80E+10	4.90E+10	0	0	22.916.091.954.022.900	2.139.974.518.717.940	PIK3CA;MAPK1
Ephrin receptor B forward pathway	2/60	8.80E+10	4.90E+10	0	0	22.916.091.954.022.900	2.139.974.518.717.940	PIK3CA;MAPK1
FGF signaling pathway	2/61	9.10E+10	4.98E+11	0	0	22.526.553.672.316.300	2.096.111.196.622.330	PIK3CA;MAPK1
Signaling events mediated by focal adhesion kinase	2/62	9.40E+10	5.07E+11	0	0	221.5	2.053.831.797.040.210	PIK3CA;MAPK1
ERK1/ERK2 MAPK pathway	2/65	1.03E+12	5.49E+11	0	0	2.109.206.349.206.340	19.357.063.858.142.500	ARAF;MAPK1
Thyroid-stimulating hormone signaling pathway	2/66	1.07E+12	5.57E+11	0	0	20.761.458.333.333.330	18.989.974.725.350.400	PIK3CA;MAPK1
NFAT involvement in hypertrophy of the heart	2/69	1.17E+12	5.83E+11	0	0	19.828.855.721.393.000	17.959.929.959.337.500	PIK3CA;MAPK1
CDC42 signaling events	2/70	1.20E+12	5.83E+11	0	0	19.536.274.509.803.900	1.763.848.974.466.870	PIK3CA;MAPK1
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	2/70	1.20E+12	5.83E+11	0	0	19.536.274.509.803.900	1.763.848.974.466.870	PIK3CA;MAPK1
Long-term depression	2/70	1.20E+12	5.83E+11	0	0	19.536.274.509.803.900	1.763.848.974.466.870	ARAF;MAPK1
Long-term potentiation	2/70	1.20E+12	5.83E+11	0	0	19.536.274.509.803.900	1.763.848.974.466.870	ARAF;MAPK1
Hemostasis pathway	3/468	1.23E+10	5.83E+10	0	0	63	6.572.489.364.122.940	PIK3CA;NOS2;MAPK1
Interleukin-6 signaling pathway	2/71	1.23E+12	5.83E+10	0	0	19.252.173.913.043.040	17.327.169.589.409.000	PIK3CA;MAPK1
Leishmaniasis	2/72	1.27E+11	5.92E+10	0	0	18.976.190.476.190.400	17.025.513.515.192.300	NOS2;MAPK1
Integrins in angiogenesis	2/74	1.34E+11	6.17E+10	0	0	18.447.222.222.222.200	16.449.500.813.633.000	PIK3CA;MAPK1
VEGF signaling pathway	2/76	1.41E+11	6.42E+11	0	0	17.946.846.846.846.800	15.907.302.830.047.600	PIK3CA;MAPK1
Signaling by SCF-KIT	2/78	1.49E+12	6.68E+11	0	0	1.747.280.701.754.380	15.396.113.796.153.300	PIK3CA;MAPK1
Signaling events mediated by hepatocyte growth factor receptor (c-Met)	2/79	1.53E+11	6.68E+11	0	0	17.245.021.645.021.600	1.515.135.337.944.880	PIK3CA;MAPK1
Fc epsilon receptor 1 signaling pathway	2/79	1.53E+11	6.68E+11	0	0	17.245.021.645.021.600	1.515.135.337.944.880	PIK3CA;MAPK1
Small cell lung cancer	2/84	1.73E+12	7.46E+11	0	0	16.189.430.894.308.900	14.024.787.757.621.700	PIK3CA;NOS2
MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	2/85	1.77E+12	7.46E+11	0	0	15.993.574.297.188.700	13.817.196.834.139.800	PIK3CA;MAPK1
Gap junction pathway	2/90	1.98E+12	8.35E+11	0	0	15.081.060.606.606.600	1.285.621.177.900.280	GIA1;MAPK1
Signaling by ERBB4	2/93	2.12E+12	8.81E+11	0	0	1.458.168.498.168.490	12.334.790.185.692.200	PIK3CA;MAPK1
Fc gamma receptor-mediated phagocytosis	2/94	2.17E+12	8.89E+11	0	0	1.442.246.376.811.590	12.169.230.483.638.300	PIK3CA;MAPK1
Interferon-gamma signaling pathway	2/97	2.31E+11	9.36E+11	0	0	13.964.912.280.701.700	11.695.372.707.339.700	PIK3CA;MAPK1
Integrin-mediated cell adhesion	2/100	2.45E+11	9.83E+11	0	0	13.535.374.149.659.800	11.253.170.126.751.400	ARAF;MAPK1
Signaling by ERBB2	2/102	2.55E+12	0.00101116	0	0	13.263.333.333.333.330	10.974.471.319.948.800	PI

RSK activation	06/jan	0.00149922	0.004274635	0	0	999.5	64.995.590.198.897.200	MAPK1
PIK3C1/B pathway	06/jan	0.00149922	0.004274635	0	0	999.5	64.995.590.198.897.200	MAPK1
PELP1 modulation of estrogen receptor activity	07/jan	0.001748917	0.004945707	0	0	852.875	5.287.722.499.803.600	MAPK1
Immune system signaling by interferons, interleukins, prolactin, and growth hormones	2/280	0.001893922	0.005327365	0	0	4.728.297.362.110.310	29.626.733.747.366	PIK3CA;MAPK1
NfκB co-activator effects	09/jan	0.002248161	0.006204923	0	0	62.459.375	3.808.549.663.430.720	NOS2
cAMP receptor, G-protein-independent pathways inferred from amoeba model	09/jan	0.002248161	0.006204923	0	0	62.459.375	3.808.549.663.430.720	NOS2
MAPK signaling pathway	2/314	0.002381349	0.006520361	0	0	4.205.769.230.769.230	25.403.216.604.797.100	ARAF;MAPK1
Phospholipase C signaling pathway	10/jan	0.002497708	0.006628532	0	0	5.551.666.666.666.660	33.267.706.415.121.600	PIK3CA
Gap junction degradation	10/jan	0.002497708	0.006628532	0	0	5.551.666.666.666.660	33.267.706.415.121.600	GJA1
Activation of the AP-1 family of transcription factors	10/jan	0.002497708	0.006628532	0	0	5.551.666.666.666.660	33.267.706.415.121.600	MAPK1
Splicing regulation through Sam68	10/jan	0.002497708	0.006628532	0	0	5.551.666.666.666.660	33.267.706.415.121.600	MAPK1
Osteopontin signaling	11/jan	0.002747205	0.007235006	0	0	499.625	29.463.741.195.064.300	MAPK1
ERK inactivation	12/jan	0.002986653	0.007832161	0	0	4.541.818.181.818.180	2.638.914.119.276.580	MAPK1
Advanced glycosylation endproduct receptor signaling	13/jan	0.003246051	0.008234467	0	0	4.163.125	23.856.022.367.218.300	MAPK1
Keap1-Nrf2 pathway	13/jan	0.003246051	0.008234467	0	0	4.163.125	23.856.022.367.218.300	PIK3CA
MAP kinase downregulation by phosphorylation of MEK1 by Cdk5/p35	13/jan	0.003246051	0.008234467	0	0	4.163.125	23.856.022.367.218.300	MAPK1
Melanocyte development and pigmentation pathway	13/jan	0.003246051	0.008234467	0	0	4.163.125	23.856.022.367.218.300	MAPK1
S1P/S1P4 pathway	14/jan	0.003495399	0.008738497	0	0	3.842.692.307.692.300	21.735.450.385.769.100	MAPK1
T cell receptor/Ras pathway	14/jan	0.003495399	0.008738497	0	0	3.842.692.307.692.300	21.735.450.385.769.100	MAPK1
Arf6 vesicle-mediated transport	15/jan	0.003744697	0.009162557	0	0	35.680.357.142.857.100	1.993.609.466.758.910	MAPK1
Signaling to p38 via RIT and RIN	15/jan	0.003744697	0.009162557	0	0	35.680.357.142.857.100	1.993.609.466.758.910	MAPK1
TrkA receptor signaling pathway	15/jan	0.003744697	0.009162557	0	0	35.680.357.142.857.100	1.993.609.466.758.910	MAPK1
B cell survival pathway	16/jan	0.003993945	0.009437748	0	0	333	38.391.509.089.009.800	PIK3CA
Inhibition of platelet activation by aspirin	16/jan	0.003993945	0.009437748	0	0	333	38.391.509.089.009.800	MAPK1
Interleukin-9 signaling pathway	16/jan	0.003993945	0.009437748	0	0	333	38.391.509.089.009.800	MAPK1
Sprouty regulation of FGF signaling	16/jan	0.003993945	0.009437748	0	0	333	38.391.509.089.009.800	MAPK1
PI3K subunit p85 role in regulation of actin organization and cell migration	16/jan	0.003993945	0.009437748	0	0	333	38.391.509.089.009.800	PIK3CA
Atypical NF-κappaB pathway	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	PIK3CA
SHC-related events	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	MAPK1
SHC1 events in EGFR signaling	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	MAPK1
Beta-arrestin-dependent recruitment of Src kinases in GPCR signaling	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	MAPK1
Cadmium-induced DNA biosynthesis and proliferation in macrophages	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	MAPK1
NO2-dependent IL-12 pathway in NK cells	17/jan	0.004243144	0.00963082	0	0	312.171.875	17.052.235.013.634.900	NOS2
CDL signaling regulation	18/jan	0.004492293	0.009934878	0	0	29.379.411.764.705.800	1.588.072.397.289.770	PIK3CA
Corticosteroids and cardioprotection	18/jan	0.004492293	0.009934878	0	0	29.379.411.764.705.800	1.588.072.397.289.770	PIK3CA
Tie2 signaling	18/jan	0.004492293	0.009934878	0	0	29.379.411.764.705.800	1.588.072.397.289.770	PIK3CA
Nicotinic acetylcholine receptor role in the regulation of apoptosis	18/jan	0.004492293	0.009934878	0	0	29.379.411.764.705.800	1.588.072.397.289.770	PIK3CA
G-protein-independent seven transmembrane receptor signaling	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	MAPK1
Gap junction assembly	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	GJA1
IGF-1 receptor and longevity	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	PIK3CA
STAT3 pathway	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	MAPK1
Signaling by FGFR1 fusion mutants	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	PIK3CA
Signaling by constitutively active EGFR	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	PIK3CA
MAL role in Rho-mediated activation of SRF	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	MAPK1
FRS2-mediated activation	19/jan	0.004741392	0.009974269	0	0	2.774.583.333.333.330	18.474.973.498.875.900	MAPK1
Skeletal muscle hypertrophy is regulated by AKT/mTOR pathway	20/jan	0.004990441	0.010309593	0	0	2.628.421.052.631.570	1.393.123.889.480.940	PIK3CA
Sprouty regulation of tyrosine kinase signals	20/jan	0.004990441	0.010309593	0	0	2.628.421.052.631.570	1.393.123.889.480.940	MAPK1
Nerve growth factor (NGF) pathway	20/jan	0.004990441	0.010309593	0	0	2.628.421.052.631.570	1.393.123.889.480.940	PIK3CA
IGF1 signaling pathway	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	PIK3CA
S1P/S1P1 pathway	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	MAPK1
CD28-dependent PI3K/Akt signaling	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	PIK3CA
T cell activation co-stimulatory signal	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	PIK3CA
E-cadherin keratinocyte pathway	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	PIK3CA
Oxidative stress-induced gene expression via Nrf2	21/jan	0.00523944	0.010448594	0	0	2.496.875	13.112.440.590.040.100	MAPK1
AKT signaling pathway	22/jan	0.005488389	0.010697708	0	0	23.778.571.428.571.400	12.377.032.790.036.200	PIK3CA
CCR3 signaling in eosinophils	22/jan	0.005488389	0.010697708	0	0	23.778.571.428.571.400	12.377.032.790.036.200	MAPK1
Nephrin interactions	22/jan	0.005488389	0.010697708	0	0	23.778.571.428.571.400	12.377.032.790.036.200	PIK3CA
Epstein-Barr virus LMP1 signaling	22/jan	0.005488389	0.010697708	0	0	23.778.571.428.571.400	12.377.032.790.036.200	MAPK1
Progesterone-initiated oocyte maturation	23/jan	0.005737289	0.010935717	0	0	2.269.659.090.909.090	11.713.185.051.583.300	MAPK1
Signaling events mediated by PRL	23/jan	0.005737289	0.010935717	0	0	2.269.659.090.909.090	11.713.185.051.583.300	MAPK1
Signaling events mediated by the hedgehog family	23/jan	0.005737289	0.010935717	0	0	2.269.659.090.909.090	11.713.185.051.583.300	PIK3CA
Mitochondrial pathway of apoptosis: antiapoptotic Bcl-2 family	23/jan	0.005737289	0.010935717	0	0	2.269.659.090.909.090	11.713.185.051.583.300	MAPK1
Ras-independent pathway in NK cell-mediated cytotoxicity	24/jan	0.005986139	0.011103322	0	0	21.708.695.652.173.900	11.111.180.475.941.800	PIK3CA
Inhibition of cellular proliferation by Gleevec	24/jan	0.005986139	0.011103322	0	0	21.708.695.652.173.900	11.111.180.475.941.800	MAPK1
Signal transduction of S1P receptor	24/jan	0.005986139	0.011103322	0	0	21.708.695.652.173.900	11.111.180.475.941.800	MAPK1
Dorso-ventral axis formation	24/jan	0.005986139	0.011103322	0	0	21.708.695.652.173.900	11.111.180.475.941.800	MAPK1
Tumor suppressor Arf inhibits ribosomal biogenesis	24/jan	0.005986139	0.011103322	0	0	21.708.695.652.173.900	11.111.180.475.941.800	PIK3CA
Ghrelin pathway	25/jan	0.006234939	0.011262063	0	0	20.803.125	10.562.966.607.689.300	NOS2
Alpha-9 beta-1 integrin pathway	25/jan	0.006234939	0.011262063	0	0	20.803.125	10.562.966.607.689.300	NOS2
SHC1 events in ERBB2 signaling	25/jan	0.006234939	0.011262063	0	0	20.803.125	10.562.966.607.689.300	MAPK1
Corticotropin releasing hormone pathway	25/jan	0.006234939	0.011262063	0	0	20.803.125	10.562.966.607.689.300	GJA1
TPO signaling pathway	25/jan	0.006234939	0.011262063	0	0	20.803.125	10.562.966.607.689.300	PIK3CA
ALK1 pathway	26/jan	0.006483689	0.011530272	0	0	199.7	10.061.815.770.136.400	MAPK1
Physiological and pathological hypertrophy of the heart	26/jan	0.006483689	0.011530272	0	0	199.7	10.061.815.770.136.400	MAPK1
Ras signaling pathway	26/jan	0.006483689	0.011530272	0	0	199.7	10.061.815.770.136.400	PIK3CA
CTCF pathway	27/jan	0.00673239	0.011790226	0	0	1.920.096.153.846.150	9.602.065.018.708.710	MAPK1
Mammalian calpain regulation of cell motility	27/jan	0.00673239	0.011790226	0	0	1.920.096.153.846.150	9.602.065.018.708.710	MAPK1
FSH signaling pathway	27/jan	0.00673239	0.011790226	0	0	1.920.096.153.846.150	9.602.065.018.708.710	MAPK1
Recycling pathway of cell adhesion molecule L1	28/jan	0.006981041	0.012042295	0	0	18.488.888.888.888.800	9.178.914.803.082.980	MAPK1
Interleukin receptor SHC signaling	28/jan	0.006981041	0.012042295	0	0	18.488.888.888.888.800	9.178.914.803.082.980	MAPK1
Nitric oxide stimulation of guanylate cyclase	28/jan	0.006981041	0.012042295	0	0	18.488.888.888.888.800	9.178.914.803.082.980	NOS2
Reelin signaling pathway	29/jan	0.007229642	0.012166958	0	0	17.827.678.571.428.500	8.788.271.482.248.970	PIK3CA
IGF1 pathway	29/jan	0.007229642	0.012166958	0	0	17.827.678.571.428.500	8.788.271.482.248.970	PIK3CA
S1P/S1P3 pathway	29/jan	0.007229642	0.012166958	0	0	17.827.678.571.428.500	8.788.271.482.248.970	MAPK1
Skeletal myogenesis control by HDAC and calcium/calmodulin-dependent kinase (CaMK)	29/jan	0.007229642	0.012166958	0	0	17.827.678.571.428.500	8.788.271.482.248.970	PIK3CA
Thyroid cancer	29/jan	0.007229642	0.012166958	0	0	17.827.678.571.428.500	8.788.271.482.248.970	MAPK1
Gap junction trafficking and regulation	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	GJA1
Retinoic acid receptor-mediated signaling	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	MAPK1
Interleukin-2/STAT5 pathway	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	PIK3CA
Signaling by FGFR1 mutants	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	PIK3CA
Nectin adhesion pathway	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	PIK3CA
Nuclear events mediated by MAP kinases	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	MAPK1
PDGFA signaling pathway	30/jan	0.007478193	0.012169701	0	0	1.721.206.896.551.720	8.426.622.961.465.410	PIK3CA
Alpha-6 beta-4 integrin signaling pathway	31/jan	0.007726694	0.012456587	0	0	166.375	8.090.939.625.056.950	MAPK1
CD28 co-stimulation	31/jan	0.007726694	0.012456587	0	0	166.375	8.090.939.625.056.950	PIK3CA
Alpha-synuclein signaling	1/32	0.007975146	0.01267938	0	0	161	7.778.594.770.432.690	PIK3CA
Hypothetical network for drug addiction	1/32	0.007975146	0.01267938	0	0	161	7.778.594.770.432.690	MAPK1
Serotonin HTR1 group and FOS pathway	1/32	0.007975146	0.01267938	0	0	161	7.778.594.7	

Negative regulation of FGFR signaling	1/40	0.009960969	0.014259479	0	0	12.792.307.692.307.600	5.896.078.070.933.970	MAPK1
Plasma membrane estrogen receptor signaling	1/41	0.010208974	0.014484222	0	0	12.471.875	5.717.716.333.774.790	PI3CA
ERBB1 internalization pathway	1/41	0.010208974	0.014484222	0	0	12.471.875	5.717.716.333.774.790	PI3CA
BMP receptor signaling	1/42	0.010456928	0.014605831	0	0	12.167.073.170.731.700	5.548.782.187.239.770	MAPK1
Signaling events mediated by T cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP)	1/42	0.010456928	0.014605831	0	0	12.167.073.170.731.700	5.548.782.187.239.770	MAPK1
TWEAK signaling pathway	1/42	0.010456928	0.014605831	0	0	12.167.073.170.731.700	5.548.782.187.239.770	MAPK1
VEGF, hypoxia, and angiogenesis	1/42	0.010456928	0.014605831	0	0	12.167.073.170.731.700	5.548.782.187.239.770	MAPK1
Cell differentiation by G alpha (i/o) pathway inferred from mouse Neuro2A model	1/43	0.010704833	0.014891804	0	0	11.876.785.714.285.700	5.388.568.863.241.950	MAPK1
G-protein-mediated events	1/44	0.010952688	0.015054492	0	0	116	5.236.437.583.425.850	MAPK1
Heart development	1/44	0.010952688	0.015054492	0	0	116	5.236.437.583.425.850	MAPK1
PI3K events in ERBB2 signaling	1/44	0.010952688	0.015054492	0	0	116	5.236.437.583.425.850	MAPK1
Signaling by FGFR mutants	1/45	0.011200494	0.01515361	0	11.335.795.454.545.400	50.918.096.448.649.400	PI3CA	
Interleukin-3 signaling pathway	1/45	0.011200494	0.01515361	0	11.335.795.454.545.400	50.918.096.448.649.400	MAPK1	
Interleukin-3, interleukin-5, and GM-CSF signaling	1/45	0.011200494	0.01515361	0	11.335.795.454.545.400	50.918.096.448.649.400	PI3CA	
Wnt interactions in lipid metabolism and immune response	1/45	0.011200494	0.01515361	0	11.335.795.454.545.400	50.918.096.448.649.400	GIA1	
Alpha-6 beta-1 and alpha-6 beta-4 integrin signaling	1/46	0.01144825	0.015368273	0	11.083.333.333.333.300	49.541.595.635.428.400	PI3CA	
Syndecan 1 pathway	1/46	0.01144825	0.015368273	0	11.083.333.333.333.300	49.541.595.635.428.400	MAPK1	
Actions of nitric oxide in the heart	1/47	0.011695956	0.015579556	0	10.841.847.826.086.900	4.823.009.144.981.250	MAPK1	
Agrin in postsynaptic differentiation	1/47	0.011695956	0.015579556	0	10.841.847.826.086.900	4.823.009.144.981.250	MAPK1	
Presenilin action in Notch and Wnt signaling	1/48	0.011943613	0.015848256	0	1.061.063.829.787.230	4.697.92.320.558.710	MAPK1	
G alpha 12 pathway	1/49	0.01219122	0.015992285	0	103.890.625	4.578.500.644.039.370	MAPK1	
Interleukin-5 signaling pathway	1/49	0.01219122	0.015992285	0	103.890.625	4.578.500.644.039.370	MAPK1	
Ceramide signaling pathway	1/49	0.01219122	0.015992285	0	103.890.625	4.578.500.644.039.370	MAPK1	
Phosphatidylinositol metabolism	1/50	0.012438777	0.016193988	0	10.176.530.612.244.800	4.464.379.351.400.600	PI3CA	
Type II interferon signaling (interferon-gamma)	1/50	0.012438777	0.016193988	0	10.176.530.612.244.800	4.464.379.351.400.600	NOS2	
Signaling events mediated by PTP1B	1/52	0.012933743	0.016712124	0	9.776.470.588.235.290	4.25.072.693.906.196	PI3CA	
Signaling events mediated by stem cell factor receptor (c-Kit)	1/52	0.012933743	0.016712124	0	9.776.470.588.235.290	4.25.072.693.906.196	PI3CA	
PI3K pathway	1/53	0.013181152	0.016968273	0	958.798.076.923.077	4.150.605.599.326.820	PI3CA	
RANKL signaling pathway	1/54	0.013428511	0.017095336	0	9.406.603.773.584.900	40.545.991.459.490.000	MAPK1	
Arginine and proline metabolism	1/54	0.013428511	0.017095336	0	9.406.603.773.584.900	40.545.991.459.490.000	NOS2	
Kit receptor signaling pathway	1/54	0.013428511	0.017095336	0	9.406.603.773.584.900	40.545.991.459.490.000	MAPK1	
SH2 signaling	1/57	0.014172029	0.017777273	0	8.901.339.285.714.280	3.788.951.003.721.930	PI3CA	
Inositol phosphate metabolism	1/57	0.014172029	0.017777273	0	8.901.339.285.714.280	3.788.951.003.721.930	PI3CA	
Keratinocyte differentiation	1/57	0.014172029	0.017777273	0	8.901.339.285.714.280	3.788.951.003.721.930	PI3CA	
PI3K cascade	1/57	0.014172029	0.017777273	0	8.901.339.285.714.280	3.788.951.003.721.930	MAPK1	
RAGE pathway	1/60	0.014911623	0.018639529	0	8.447.457.627.118.640	35.526.748.708.331.000	GIA1	
Leptin signaling pathway	1/61	0.015158635	0.018879888	0	830.625	3.479.641.755.392.500	MAPK1	
Shigellosis	1/62	0.015405597	0.019118457	0	8.169.672.131.147.540	34.092.241.011.491.500	MAPK1	
Angiotensin II-stimulated signaling through G-proteins and beta-arrestin	1/64	0.015899373	0.019520583	0	790.952.380.952.381	32.757.099.739.379.000	MAPK1	
MAPK cascade role in angiogenesis	1/64	0.015899373	0.019520583	0	790.952.380.952.381	32.757.099.739.379.000	MAPK1	
Endothelins	1/64	0.015899373	0.019520583	0	790.952.380.952.381	32.757.099.739.379.000	MAPK1	
Interleukin-12-mediated signaling events	1/65	0.016461857	0.019753314	0	7.785.546.875	32.123.721.893.054.000	NOS2	
HIF-1 transcriptional activity in hypoxia	1/66	0.016392951	0.019984434	0	7.665.384.615.384.610	31.511.658.961.920.100	NOS2	
Telomerase regulation	1/67	0.016639666	0.020213679	0	7.548.863.636.363.630	3.091.988.806.923.380	MAPK1	
AMPK signaling	1/68	0.016886331	0.020698975	0	7.435.820.895.522.380	3.034.744.977.483.950	PI3CA	
CD8/T cell receptor downstream pathway	1/68	0.016886331	0.020698975	0	7.435.820.895.522.380	3.034.744.977.483.950	MAPK1	
AP-1 transcription factor network	1/70	0.017379514	0.020819209	0	7.219.565.217.391.300	29.257.021.981.956.100	GIA1	
NCAM signaling for neurite out-growth	1/70	0.017379514	0.020819209	0	7.219.565.217.391.300	29.257.021.981.956.100	MAPK1	
Rac1 cell motility signaling pathway	1/71	0.01762603	0.020968898	0	7.116.071.428.571.420	28.737.389.642.812.400	PI3CA	
Bacterial invasion of epithelial cells	1/71	0.01762603	0.020968898	0	7.116.071.428.571.420	28.737.389.642.812.400	PI3CA	
Costimulation by the CD28 family	1/72	0.017872498	0.021189044	0	7.015.492.957.746.470	2.823.379.658.506.000	PI3CA	
Adherens junction cell adhesion	1/74	0.018365284	0.021624652	0	6.822.602.739.726.020	27.71.943.060.410.200	MAPK1	
Seven transmembrane receptor signaling through beta-arrestin	1/74	0.018365284	0.021624652	0	6.822.602.739.726.020	27.71.943.060.410.200	MAPK1	
Arrhythmic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1/75	0.018611603	0.021840146	0	6.730.067.567.567.560	2.681.238.775.998.320	GIA1	
G alpha (12/13) signaling events	1/77	0.019104993	0.022665959	0	6.552.302.631.578.940	25.933.048.567.400.600	PI3CA	
Mitochondrial pathway of apoptosis: caspases	1/77	0.019104993	0.022665959	0	6.552.302.631.578.940	25.933.048.567.400.600	MAPK1	
Peroxisome	1/78	0.019350263	0.024202151	0	6.466.883.116.883.110	2.551.217.234.964.780	NOS2	
Phosphatidylinositol signaling system	1/78	0.019350263	0.024202151	0	6.466.883.116.883.110	2.551.217.234.964.780	MAPK1	
Opioid signaling	1/80	0.019842457	0.022895142	0	630.253.164.556.962	247.054.914.696.706	MAPK1	
MAP kinase signaling pathway	1/81	0.020088479	0.023101751	0	62.234.375	24.318.759.198.592.100	MAPK1	
ATM-dependent DNA damage response	1/82	0.020334452	0.023153089	0	6.146.296.296.296.290	23.942.520.346.643.700	MAPK1	
Platelet homeostasis	1/82	0.020334452	0.023153089	0	6.146.296.296.296.290	23.942.520.346.643.700	NOS2	
Regular glucocorticoid receptor pathway	1/82	0.020334452	0.023153089	0	6.146.296.296.296.290	23.942.520.346.643.700	MAPK1	
T cell signal transduction	1/83	0.020580376	0.023356019	0	6.071.036.585.365.850	23.576.368.433.833.300	MAPK1	
TGF-beta regulation of skeletal system development	1/85	0.021072075	0.023577732	0	5.925.892.857.142.850	22.872.800.210.045.200	MAPK1	
NOD signaling pathway	1/85	0.021072075	0.023577732	0	5.925.892.857.142.850	22.872.800.210.045.200	MAPK1	
Signaling by GPCR	2/977	0.021599005	0.024272498	0	13.005.128.205.128.200	4.987.607.131.809.570	PI3CA;MAPK1	
HIF-1 degradation in normoxia	1/88	0.021809254	0.024429196	0	57.206.896.551.724.100	21.884.045.903.047.900	MAPK1	
Immune system	2/998	0.022489526	0.025109665	0	12.716.867.469.879.500	4.825.676.779.636.020	PI3CA;MAPK1	
L1CAM interactions	1/94	0.023282279	0.025827608	0	53.5	2.011.633.589.371.270	MAPK1	
Cell surface interactions at the vascular wall	1/94	0.023282279	0.025827608	0	53.5	2.011.633.589.371.270	MAPK1	
Senescence and autophagy	1/99	0.024508444	0.027100683	0	5.075.765.306.122.440	18.824.681.569.293.300	MAPK1	
GnRH signaling pathway	1/101	0.024998565	0.027379398	0	497.375	1.834.784.976.020.630	MAPK1	
Melanogenesis	1/101	0.024998565	0.027379398	0	497.375	1.834.784.976.020.630	MAPK1	
TNF-alpha signaling pathway	1/101	0.024998565	0.027379398	0	497.375	1.834.784.976.020.630	MAPK1	
G alpha i pathway	1/108	0.026712437	0.029163895	0	46.467.289.719.626.100	16.833.361.194.919.500	MAPK1	
Oocyte meiosis	1/113	0.027935156	0.030402615	0	4.438.169.642.857.140	15.879.190.942.444.000	MAPK1	
Leukocyte transendothelial migration	1/117	0.028912446	0.031367277	0	4.28.426.724.137.931	15.181.228.623.104.200	PI3CA	
Prolectin regulation of apoptosis	1/118	0.029156646	0.031533005	0	4.247.435.897.435.890	15.014.993.433.803.400	NOS2	
G alpha s pathway	1/120	0.029644898	0.031861339	0	417.563.025.210.084	14.691.809.941.275.800	MAPK1	
Interleukin-1 regulation of extracellular matrix	1/120	0.029644898	0.031861339	0	417.563.025.210.084	14.691.809.941.275.800	NOS2	
p75 neurotrophin receptor-mediated signaling	1/124	0.030620812	0.032808013	0	40.390.243.902.439.000	1.408.034.339.839.890	PI3CA	
Cell-cell communication	1/129	0.031839601	0.034008243	0	38.802.734.375	13.375.474.969.906.200	PI3CA	
Membrane trafficking	1/133	0.032813715	0.034940567	0	3.761.931.818.181.810	12.854.173.618.163.700	GIA1	
Adrenergic pathway	1/137	0.033787114	0.035866321	0	36.505.514.705.882.300	12.366.884.861.369.400	MAPK1	
Calcium relaxation in the cardiac cell	1/149	0.036702505	0.038841609	0	3.352.533.783.783.780	11.079.823.292.863.100	GIA1	
Myometrial relaxation and contraction pathways	1/155	0.03815756	0.040257976	0	3.220.941.558.441.550	10.519.696.189.979.900	GIA1	
Toll receptor cascades	1/159	0.039126619	0.041154523	0	313.876.582.278.481	10.172.590.142.076.700	MAPK1	
Alzheimer's disease	1/169	0.041545851	0.043566317	0	29.504.464.285.714.200	9.385.245.072.850.300	MAPK1	
Calcium signaling pathway	1/178	0.04371899	0.045706217	0	27.991.525.423.728.800	8.761.271.057.875.050	NOS2	
TGF-beta signaling pathway	1/185	0.045405484	0.0473227	0	2.691.711.956.521.730	8.323.043.531.553.790	MAPK1	
Transmission across chemical synapses	1/190	0.046610377	0.048435482	0	2.61.984.126.984.127	8.032.255.387.898.530	MAPK1	
Jak-STAT signaling pathway	1/199	0.048774324	0.050531957	0	2.499.621.212.121.210	7.550.233.978.585.430	PI3CA	
Phospholipid metabolism	1/205	0.050214771	0.051868551	0	24.253.676.470.588.200	7.255.356.464.153.550	PI3CA	
Metabolism	2/1615	0.055277427	0.0569275	0	7.597.437.487.084.100	21.997.549.367.126.200	PI3CA;NOS2	
Wnt signaling pathway	1/231	0.056436559	0.057948253	0	21.483.695.652.173.900	6.175.850.506.759.700	GIA1	
Apoptosis	1/242	0.059059018	0.060461013	0	20.491.701.244.813.200	5.797.549.052.862.450	PI3CA	
Neuronal system	1/283	0.06878232	0.070206806	0	17.476.063.829.787.200	4.678.007.694.714.770	MAPK1	
Oncostatin M	1/311	0.075376307	0.076710401	0	15.875	4.104.103.882.356.380	NOS2	
Innate immune system	1/319	0.077253425	0.078389505	0	1.546.933.962.264.150	39.611.781.428.237.200	MAPK1	
Axon guidance	1/325	0.078659263	0.079581952	0	1.517.824.074.074.070	3.859.264.851.035.010	MAPK1	