

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

Luis Manuel Sarmiento-Machado

**Efeitos da ingestão de *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* na etapa
de promoção da carcinogênese química de cólon em animais alimentados
com hemin**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências: área de concentração em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Coorientadora: Profa. Dra. Nelci Antunes de Moura

**Botucatu
2022**

Luis Manuel Sarmiento-Machado

**Efeitos da ingestão de *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* na
etapa de promoção da carcinogênese química de cólon em animais
alimentados com hemin**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Ciências: área de concentração em
Patologia.**

Orientador: Prof. Dr Luís Fernando Barbisan

Coorientadora: Profa. Dra. Nelci Antunes de Moura

Botucatu

2022

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

Sarmiento-Machado, Luis Manuel.

Efeitos da ingestão de *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) spp. na etapa de promoção da carcinogênese química de cólon em animais alimentados com hemin / Luis Manuel

Sarmiento-Machado. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Nelci Antunes de Moura

Capes: 20600003

1. Ratos Sprague-Dawley. 2. Cólon (Anatomia) Câncer.
3. Spirulina. 4. Hemina. 5. 1,2-Dimetilidrazina. 6. Focos de Criptas Aberrantes.

Palavras-chave: 1,2-Dimetilhidrazina; *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) spp.; Focos de Cripta Aberrante; Hemin; Ratos Sprague-Dawley.

“Carpe Diem. Aproveitem o dia, rapazes. Façam a sua vida extraordinária”

Professor John Keating, Sociedade dos Poetas Mortos

Dedicatória

A Deus, pelas situações mais difíceis

A meus pais e minha irmã, pelo amor incondicional

Ao LCQE, pelas oportunidades, acolhimento e amizade

Ao Marcos, pela sua solidariedade e companheirismo, que descanse em paz

Agradecimentos

A Deus, por permitir que tudo o que é vida exista.

Ao meu pai Wismar, pelo seu esforço diário em busca de um futuro melhor para todos nós, pelos seus conselhos pertinentes e pela sua amabilidade.

A minha mãe Isamery, pela abnegação e empatia aos seus seres queridos, pela resiliência diante as adversidades e por ser a minha calma nas situações mais difíceis.

A minha irmã Alanis, por ser a melhor amiga que já tive.

À professora Isamery, por ter me aconselhado e ter sido exemplo de disciplina na vida acadêmica.

Ao professor Luis Fernando Barbisan, pelas orientações, acolhimento e a confiança que teve em mim.

Ao Guilherme, por ser uma das pessoas mais sensíveis que já conheci.

Ao Gabriel, por ser um grande amigo e por estarmos trilhando juntos esta vida acadêmica, sempre me ajudando.

À Sara, Anielly, Luis Artur, Jéssica, Ana Carolina, Letícia, Ariane e Vânia pelos bons momentos no dia-a-dia no laboratório.

À Nelci, por ter sido guia no Mestrado.

À Keila e o Ricardo, por ter aprendido com eles sobre histotécnica durante os meus primeiros anos no departamento.

Ao Leandro, José Carlos, por ter aprendido as técnicas de coloração com eles; ao Paulo César, por ter me ajudado no biotério.

Às servidoras da biblioteca da Unesp de Botucatu, por terem sido parte importante na minha vida na Graduação.

À Maria, por ter sido fundamental para o bom funcionamento do departamento de Morfologia.

Ao Murilo, Gabriel Ferrari, Vanessa, Andressa, Erick, Edgar, Pablo e o Lucas Viu por serem meus primeiros amigos em Botucatu.

À minha professora de português, Ana Paula, por ter um impacto fundamental na minha educação, além de ser uma pessoa excepcional.

À Bruna, Fernanda e Éverton, pelo apoio e a tranquilidade que vocês me deram na etapa final do Mestrado.

Ao Ivan, Isadora, Lucas Vilhegas, Fernanda France, Ciro, Carla, Marcelo, Joshua e a Beatrice pela amizade durante a Graduação.

Ao Mário e ao Bryan, pela sua amizade durante a pós-graduação.

Ao Ramón, Francisco, Paulo, Francesco e Efraín, pela sua amizade durante a minha infância na Venezuela.

Aos tutores do cursinho Atena (ex- IBB e Eukaipia) pela oportunidade que me deram de continuar estudando antes de ingressar na faculdade.

Ao Isaac Asimov, um dos responsáveis por eu ter optado a pesquisa como opção de vida.

À equipe da Squaresoft (hoje em dia Square Enix), por terem desenvolvido os melhores videogames que já joguei, os quais fizeram parte da minha vida.

À música, por me acompanhar nos momentos mais difíceis.

À cidade de Botucatu, por ser uma cidade de excelente qualidade de vida, principalmente em questão de segurança e saúde pública.

Aos venezuelanos, que buscam sobreviver mesmo em situações de crise, tanto os que ainda vivem na Venezuela quanto os que estão fora do país.

E finalmente, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. n de processo: nº 88887.481942/2020-00.

Resumo

O risco elevado de desenvolver câncer colorretal (CCR) pode estar associado à hábitos alimentares inadequados, incluindo o consumo elevado de carne vermelha e processada. Evidências sustentam, que o heme, uma porfirina contendo ferro encontrada na carne vermelha, promove o CCR por aumentar a citotoxicidade colônica e a proliferação epitelial regenerativa. A ingestão da microalga *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* (SP) poderia neutralizar os efeitos promotores do heme, dadas suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Assim, avaliamos os efeitos benéficos da ingestão de 2% SP sobre os efeitos promotores do heme em modelo de carcinogênese de cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos. 52 ratos Sprague Dawley machos foram divididos em cinco grupos. Após a exposição ao DMH, os grupos 2, 3 e 4 foram alimentados com dietas contendo heme (0,5 mmol / kg), heme + 2% SP (20g / kg) ou 2% SP por 16 semanas, respectivamente. A ingestão de heme aumentou o número, tamanho e multiplicidade de FCA, enquanto que 2% SP apresentou efeito antagônico em comparação a dieta heme. Não obstante, heme e 2% SP não modularam o desenvolvimento de tumores. Na análise de qRT-PCR na mucosa colônica, os níveis dos genes *Mmp3* e *Nox1* aumentados DMH + heme em comparação com o grupo DMH, enquanto os níveis de *Xrcc6* foram aumentados no DMH+heme+SP em comparação com o grupo alimentado com DMH+heme. Portanto, esses achados indicam que a ingestão de SP 2% reduziu os efeitos promotores da heme ao reduzir o desenvolvimento de FCA, sugerindo que esse alimento funcional pode ter potencial quimiopreventivo para a carcinogênese do cólon.

Palavras-Chaves: 1,2-Dimetilhidrazina, carcinogênese colorretal, Ratos Sprague-Dawley, Focos de Cripta Aberrante, Heme, promoção, progressão, *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.*

Abstract

The risk for developing colorectal cancer (CRC) has been associated with *westernized* dietary habits, including a high intake of red and processed meat. Hemin, an iron-containing porphyrin found in red meat, promotes CRC by increasing colonic cytotoxicity and compensatory hyperproliferative response. Dietary microalga *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) *spp.* (SP) may counteract hemin-promoting effects given its antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, we assessed the preventive effects of dietary SP on hemin-promoting effects in a dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis rat model. Fifty-two male Sprague Dawley rats were allocated into five groups. Groups 1–3 were given DMH doses (4 x 40 mg/kg b.w.) once a week for 2 weeks. Subsequently, groups 2, 3 and 4 were fed with diets containing hemin (0.5 mmol/kg), hemin + 2% SP (20g/kg) or 2% SP for 16 weeks, respectively. Dietary hemin promoted aberrant crypt foci (ACF) development in number and size when compared to DMH. In contrast, 2% SP significantly reduced ACF number, compared to DMH+hemin-fed group. Hemin upregulated *Mmp3* and *Nox1* mRNA levels in the colonic mucosa when compared to DMH group, whereas 2% SP upregulated *Xrcc6* in comparison to the DMH+hemin group. Therefore, these findings show that dietary 2% SP reduced hemin-promoting effects by counteracting ACF development.

Key Words: 1,2-Dimethylhydrazine, Sprague-Dawley Rats, Aberrant Crypt Foci, Hemin, promotion/progression, *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) *spp.*

Lista de Abreviaturas

4-HNE: 4-hidroxinonenal

ALA: Ácido 5-aminolevulínico

AOM: Azoximetano

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

CAC: *Colitis-Associated Colorectal Cancer*

CCL₄: Tetracloroeto de Carbono

CCR: Câncer Colorretal

C-FC: C-Ficocianina

CIMP: *CpG Island Methylator Phenotype*

COX-2: Ciclooxygenase-2

DEN: Dietilnitrosamina

DII: Doença Inflamatória Intestinal

DMH: 1,2-Dimetilhidrazina

DPPH: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FAP: *Familial adenomatous polyposis*

FCA: Foco de Criptas Aberrantes

FOBT: *Fecal Occult Blood Test*

GMP: *Guanosine monophosphate*

GSTP: *Glutathione S-transferase Pi*

HAA: *Heterocyclic aromatic amines*

HFD: *High Fat Diet*

HNPCC: *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*

HO: Heme Oxygenase

HP: *Hyperplastic Polyps*

IC: Instabilidade Cromossômica

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

iNOS: *Inducible Nitric Oxide Synthase*

KO: *Knock-Out (-/-)*

LDH: Lactato Desidrogenase

LOH: *Loss of Heterozygosity (+/-)*

MAM: Metilazoximetanol

Min: *Multiple intestinal neoplasia*

MDA: Malondialdeído

MSI-L: *Microsatellite instability-low*

MSI-H: *Microsatellite instability-high*

MSS: *Microsatellite Stable*

NOC: *N-nitroso Compounds*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARP: Poli-ADP-Ribose Polimerase

PB: *Phenobarbital*

PBG: Porfobilinogênio

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PGE2: Prostaglandina E2

PPAR- α : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*

PPAR- γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

SF: *Sigmoidoscopia Flexível*

SSA/P: *Sessile Serrated Adenoma/Polyp*

TNF- α : *Tumour Necrosis Factor-alpha*

UC: *Ulcerative Colitis*

UTR: *Untranslated Regions*

WD: *Western Diet*

Sumário

Capítulo 1- Revisão de Literatura	8
1. Câncer Colorretal: etiologia, sítios anatômicos, fatores de risco	9
1.1 Neoplasias: características gerais	9
1.2. Câncer Colorretal (CCR)	9
1.2.1 Epidemiologia e Etiologia	9
1.2.2 Localização anatômica e diagnóstico de CCR	13
1.2.3 Sequência Histopatológica do CCR esporádico	15
1.2.4 Sequência de alterações epigenéticas e moleculares do CCR	17
1.3. Carcinogênese Experimental de CCR	21
1.3.1 Etapas da Carcinogênese Química	21
1.3.2 Modelos Experimentais in vivo de CCR	23
1.3.3 Indutores químicos da Carcinogênese Colorretal in vivo	25
1.3.4 Focos de Criptas Aberrantes (FCA)	26
1.4 Heme presente na carne vermelha como fator de risco de CCR esporádico	30
1.4.1 Consumo de Carne Vermelha e Processada	30
1.4.2 Heme – Biossíntese, Epidemiologia e Efeitos Biológicos	30
1.5 Quimioprevenção da Carcinogênese	34
2. Arthrospira (Spirulina platensis) spp.	36
2.1 Aspectos Morfológicos e de Consumo Humano da Arthrospira spp. (Spirulina platensis)	36
2.1.1 Origem e Taxonomia	36
2.1.2 Morfologia e Distribuição	37
2.1.3 Métodos de Extração e Cultivo	40
2.1.4 Comercio e Aplicabilidade	40
2.1.5 Consumo e Contaminação	42
2.2 Aspectos Nutricionais e Funcionais da Arthrospira spp.	43

2.2.1 Composição da <i>Arthrospira</i> spp. – Perfil de Macro e Micronutrientes	43
2.2.2 C-FC Estrutura e Mecanismos anticarcinogênicos in vitro e in vivo.....	44
2.2.3 Efeitos in vitro de <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina platensis</i>) spp. em células tumorais de cólon ...	45
2.2.4 Efeitos de <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina platensis</i>) spp. na carcinogênese experimental in vivo .	45
3.1 Justificativa e hipótese	46
3.2 Objetivo Geral.....	46
3.3 Objetivos Específicos	46
4. Referências	47
Capítulo 2- Artigo Científico	74
1. Introduction	80
2. Materials and Methods	82
3. Results.....	85
4. Discussion.....	87
5. Conclusion.....	90
6. References	90
Figures & Tables	104

Capítulo 1- Revisão de Literatura

1. Câncer Colorretal: etiologia, sítios anatômicos, fatores de risco

1.1 Neoplasias: características gerais

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do organismo humano, sendo a causa mais comum de mortalidade no mundo com estimativas de 9,6 milhões de mortes em 2018 (World Cancer Report, 2020).

Há pelo menos duas lições importantes de saúde pública que devem ser consideradas no combate ao câncer, a saber: 1) alguns dos fatores comportamentais para a mortalidade por câncer, como tabagismo, alcoolismo e sedentarismo podem ser evitados/prevenidos, os quais são de difícil controle nos seres humanos 2) O fator de risco mais significativo para o câncer, assim como na maioria das outras doenças crônicas, é a idade. Portanto, é necessária uma atitude ativa, em relação à medicina preventiva e diagnóstica (Farrelly, 2021).

1.2. Câncer Colorretal (CCR)

1.2.1 Epidemiologia e Etiologia

O Câncer Colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais incidente e a segunda principal causa de morte no mundo. De acordo com a GLOBOCAN, 1,9 milhões de novos casos e 935.000 mortes foram estimadas (GLOBOCAN, 2020). Para 2020, estimou-se um gasto de 17 bilhões de dólares em custos anuais de assistência médica e tratamento do CCR nos EUA (Mariotto *et al.*, 2011; Afrin *et al.*, 2020). Fatores de risco genéticos e ambientais estão envolvidos no desenvolvimento do CCR, sendo os últimos a principal influência no CCR esporádico (Carethers e Jung, 2015; Keum e Giovannucci, 2019). Esses fatores ambientais se referem a um estilo de vida caracterizado pela alta ingestão de alimentos processados, amidos refinados, gorduras saturadas e carne vermelha e processada (Johnson *et al.*, 2013; Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020).

Existem diferenças de até 8 vezes em número de casos novos entre os países de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) muito alto (8,94 milhões de casos novos) e os de IDH muito baixo (0,65 milhões de casos novos). Embora o CCR seja altamente incidente principalmente nos países de IDH alto e muito alto, a incidência está aumentando consideravelmente nos países de IDH baixo e médio (Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020). A projeção para 2040 indica que os casos novos de CCR aumentem para 95% e 64% em

IDH baixo e médio, respectivamente, do que 32% em IDH muito alto, o que pode indicar importantes mudanças no padrão alimentar e no estilo de vida nesses países (GLOBOCAN, 2020). Além disso, a proporção da mortalidade é maior nos países de IDH médio e baixo (Figuras 1 e 2), o que poderia estar relacionado com piores condições de diagnóstico, em geral tardio, e de tratamento (Popkin, 1994; Arnold *et al.*, 2017; Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020).

Em relação à incidência de CCR para ambos os sexos, as taxas ajustadas são mais altas nos homens do que nas mulheres, nas quais há diferenças entre 1,4 a 1,5 vezes para incidência (23,4 versus 16,2 casos por 100.000 pessoas por ano) e óbito (11,0 versus 7,2 mortes por 100.000 pessoas por ano), respectivamente. Esta diferença tende a aumentar em relação à idade e crescimento econômico (Figuras 1 e 2) (GLOBOCAN, 2020). Para 2030 nos Estados Unidos (EUA), a taxa de incidência de CCR aumentará em 90,0% nos homens e 124,2% nas mulheres para pacientes de 20 a 34 anos de idade, e em 27,7% nos homens e 46,0% nas mulheres para pacientes de 35 a 49 anos de idade (Bailey *et al.*, 2015). As taxas mais altas de CCR nos homens do que nas mulheres pode ser indício da predominância de fatores ambientais sobre fatores genéticos na carcinogênese colorretal, sendo a herdabilidade do CCR estimada em 28% para homens e 45% para mulheres (Graff *et al.*, 2017). Consideravelmente, os homens são mais suscetíveis devido a estes fatores de risco, os quais em sua maioria são ambientais: diferenças de gordura visceral entre ambos os sexos (Karastergiou *et al.*, 2012), bebidas alcoólicas (Wilsnack *et al.*, 2009), tabagismo (Botteri *et al.*, 2020) e na dieta rica em gorduras saturadas e baixa em fibras (Imamura *et al.*, 2015).

A idade é um fator de risco inerente, já que as taxas de incidência e mortalidade de CCR aumentam exponencialmente após os 50 anos (Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020). No entanto, recentemente as taxas de incidência e mortalidade por CCR diminuíram entre os idosos, em parte devido a vários fatores, entre eles o aumento da cobertura do diagnóstico precoce em pessoas com mais de 50 anos de idade, principalmente nos países desenvolvidos (Bailey *et al.*, 2015; Crosby *et al.*, 2018).

Contudo, esses declínios não ocorreram em adultos mais jovens, onde a incidência aumentou, principalmente em casos de câncer retal (Murphy e Baron, 2017; Murphy e Singal, 2018). Para 2030 nos EUA, a taxa de incidência de CCR duplicará em pacientes de 20 a 34 anos de idade (Bailey *et al.*, 2015; Crosby *et al.*, 2018). Esta tendência aponta fatores relacionados ao estilo de vida, além da baixa cobertura do *screening* em indivíduos com menos

de 50 anos, que contribuem com os casos novos do CCR esporádico em indivíduos mais jovens (Murphy e Baron, 2017; Keum e Giovannucci, 2019).

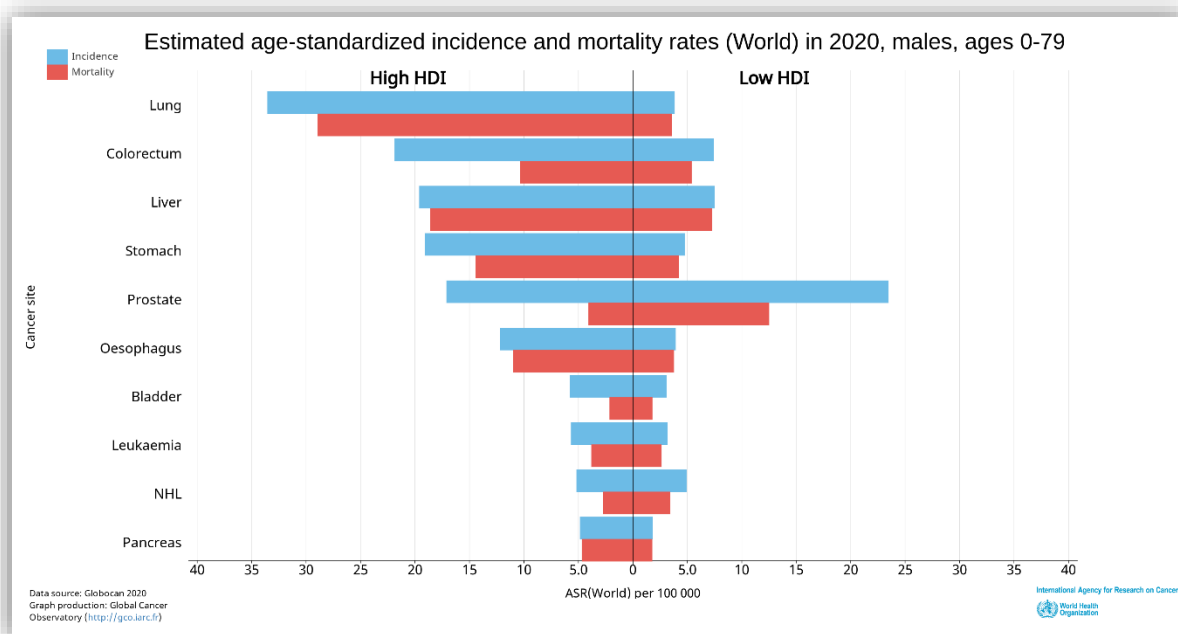


Figura 1 – Homens (IDH alto e IDH baixo) (GLOBOCAN, 2020)



Figura 2 – Mulheres (IDH alto e IDH baixo) (GLOBOCAN, 2020)

Aproximadamente dois terços dos casos (60-65%) de CCR surgem esporadicamente, ou seja, ocorrem em indivíduos sem histórico familiar de CCR ou mutações genéticas herdadas, as quais aumentam o risco de desenvolver o CCR. Como mencionado anteriormente, o CCR

esporádico é atribuível a fatores de risco de caráter ambiental/comportamental, os quais são passíveis de modificação (Jasperson *et al.*, 2010; Carethers e Jung, 2015; Keum e Giovannucci, 2019; GLOBOCAN, 2020). O desenvolvimento dos CCRs inclui um conjunto de alterações morfológicas e genéticas que envolvem o acúmulo de eventos genéticos somáticos e epigenéticos em células epiteliais clonais. Estas alterações incluem os defeitos de perda de função de genes supressores de tumor, ganho ou perda de função em proto-oncogenes e alterações epigenéticas, tais como metilação de DNA/metilação e acetilação de histonas (Fearon, 2011; Carethers e Jung, 2015). Estas alterações genômicas, “evento condutor”, permitem uma vantagem de crescimento seletivo às células clonais, levando à proliferação aumentada e descontrolada, passíveis de progressão maligna (Grady e Carethers, 2008; Carethers e Jung, 2015). Genes com altas taxas de mutação, como as observadas em TP53 (60-70%), KRAS (40%) e APC (70-80%), foram recorrentes no sequenciamento do genoma, porém genes caracterizados por baixa frequência de mutação podem ser mais prevalentes do que os de alta taxa em pacientes com CCR (Fearon, 2011; *The Cancer Genome Atlas* 2012; Carethers e Jung, 2015).

Há estimativas de que até 30% dos casos de CCR possam ser de caráter hereditário (Grady, 2003; Jasperson *et al.*, 2010). E apenas 5% dos casos são atribuídos a síndromes de câncer hereditárias cujas características clínicas são bem estabelecidas, e que apresentam um risco de desenvolvimento de CCR mais precoce durante a vida do indivíduo (Winawer *et al.*, 1997; Jasperson *et al.*, 2010; Conteduca *et al.*, 2013).

Dentre os CCR de caráter autossômico dominante estão: polipose adenomatosa familiar (FAP), câncer de cólon hereditário sem polipose (HNPCC)/Síndrome de Lynch (SL) (Grady, 2003; Jasperson *et al.*, 2010; Keum e Giovannucci, 2019). Pacientes com SL desenvolvem CCR de maneira precoce em relação aos pacientes esporádicos. SL evolui a partir de mutações em um dos alelos de genes de reparo de *mismatches* de DNA, sendo os mais recorrentes os MLH1 e MSH2 (mais de 90%), ou menos frequente o MSH6 (aproximadamente 10%) e PMS2 (em raras ocasiões) (Grady, 2003; Jasperson *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2018). A característica mais marcante das FAP é a presença de um grande número de pólipos adenomatosos a partir da infância ou início da adolescência. Ela é caracterizada por uma mutação heterozigótica germinativa no gene APC, localizado no cromossomo 5q21 (Grady, 2003; Jasperson *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2018).

1.2.2 Localização anatômica e diagnóstico de CCR

A relação entre etiologia molecular e morfológica pode explicar as diferenças no desenvolvimento de neoplasias que se desenvolvem no cólon ascendente em comparação com as do cólon descendente (Gervaz, Buchel e Morel, 2004; Johnson e Fleet, 2012). O cólon ascendente compreende do ceco até um ponto de aproximadamente metade a dois terços superiores do cólon transversal, enquanto o descendente, do terço do cólon transversal inferior ao reto (Gervaz, Buchel e Morel, 2004; Arnold *et al.*, 2017). Estas duas regiões do intestino grosso possuem diferentes origens embriológicas. O ceco, cólon ascendente e dois terços proximais do cólon transversal derivam do “intestino médio primitivo”, enquanto o segmento que compreende a flexura esplênica para a parte superior canal anal deriva do “intestino primitivo posterior” (Neves Jorge e Habr-Gama, 1998; Gervaz, Buchel e Morel, 2004). As distintas origens embriológicas de ambos os segmentos refletem no suprimento sanguíneo do intestino grosso; ramos da artéria mesentérica superior irrigam a região ascendente, enquanto o segmento localizado distalmente à flexura esplênica é irrigado por tributárias da artéria mesentérica inferior (Neves Jorge e Habr-Gama, 1998; Gervaz, Buchel e Morel, 2004).

As neoplasias da região ascendente e descendentes do cólon exibem características moleculares e histopatológicas distintas (Gervaz, Buchel e Morel, 2004; Nawa *et al.*, 2008). Histopatologicamente, a frequência de tumores de aparência plana é significativamente maior nos cânceres ascendentes, enquanto que as lesões do tipo polipóide são predominantes nos descendentes (Nawa *et al.*, 2008; Conteduca *et al.*, 2013). Além disso, observa-se que o CCR na porção ascendente é predominante nas mulheres e em idosos, enquanto que o CCR na porção descendente é predominante em homens e pacientes de meia idade (Nawa *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2019). Em relação ao diagnóstico, os tumores na região ascendente são mais difíceis de serem detectados, principalmente pelo surgimento de lesões serrilhadas, por serem planas, dificultando a sua visualização na colonoscopia (Colorectal Cancer Screening, 2021), além de serem menos vascularizadas que os adenomas polipoides, tendendo a sangrar com menor frequência (Nawa *et al.*, 2008, Colorectal Cancer Screening, 2021). Com relação aos fatores moleculares, os subtipos moleculares de CCR diferem entre as duas regiões (Johnson e Fleet, 2012; Missiaglia *et al.*, 2014; Keum e Giovannucci, 2019). Os subtipos de instabilidade de microsatélite alto (MSI-H) e a expressão aumentada do gene BRAF são mais comuns no cólon ascendente, enquanto o subtipo positivo de instabilidade cromossômica (IC) e amplificação do gene EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor* – Sinalização Celular) ocorre preferencialmente no cólon descendente (Roth *et al.*, 2010; Missiaglia *et al.*, 2014). Estas

diferenças histopatológicas e moleculares refletem na resposta aos diversos tratamentos contra CCR (Brulé *et al.*, 2015; Arnold *et al.*, 2017; Tejpar *et al.*, 2017).

Outro fator que difere entre as duas regiões são as diferenças na microbiota intestinal (Dejea *et al.*, 2014; Drewes, Housseau e Sears, 2016). A grande maioria de CCRs ascendentes está associada a um biofilme bacteriano denso, além da expressão reduzida de E-caderina nas junções *gap* nos colonócitos, aumentando a permeabilidade intestinal e favorecendo a invasão do tecido subjacente pelas bactérias ou de mediadores inflamatórios e posterior passagem à corrente sanguínea (Dejea *et al.*, 2014).

Essas diferenças histopatológicas entre o cólon proximal/ascendente; e distal/descendente, em humanos, foram também observadas em modelos animais (Johnson e Fleet, 2012; Deming *et al.*, 2014). Em modelos de CCR murino com *FCPIK3ca* mutado, ocorre a formação de múltiplos tumores, como os adenocarcinomas mucinosos, sésseis e moderadamente diferenciados no cólon proximal, diferentes daqueles de origem polipoide, que são lesões características da região distal (Deming *et al.*, 2014). Em modelos de indução com química com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos foi observado que a incidência de lesões pre-neoplásicas e de adenomas e adenocarcinomas foi maior nas regiões distais do cólon (Park, Goodlad e Wright, 1997; Rodrigues *et al.*, 2002; Persê e Cerar, 2011). Estas lesões neoplásicas distais também podem apresentar mutações comumente presentes em CCRs esporádicos humanos, visto que foram observadas mutações em ponto de *KRAS* e *CTNNB1* em adenomas e carcinomas de ratos F344 (Pandiri *et al.*, 2011). Portanto, estas semelhanças referentes às neoplasias colorretais em humanos e murinos demonstra uma das vantagens da aplicabilidade dos estudos experimentais em roedores (Johnson e Fleet, 2012; Ward e Treuting, 2014).

Com relação ao diagnóstico do CCR humano, em países de IDH alto e muito alto, os métodos de **triagem** (*screening*) para detecção de CCR têm contribuído consideravelmente na redução da incidência e da mortalidade, permitindo a remoção de neoplasias benignas ou a detecção e tratamento precoces de CCR (Brenner *et al.*, 2014; Simon, 2016; Colorectal Cancer Screening, 2021). As taxas de incidência reduziram de 30,8 em 2018 para 20,4 em 2020 com taxas padronizadas por idade por 100.000 pessoas por ano em países de IDH alto. No entanto, as taxas de mortalidade foram mantidas, de 10,6 em 2018 para 10,3 em 2020 (as taxas mundiais em 2020 são 19,5 de incidência e 9,0 de mortalidade) (GLOBOCAN, 2020). Nos países de IDH médio e baixo, atualmente os programas de triagem são limitados para a maior parte da população, o que explica uma menor incidência em relação aos países de IDH alto e muito alto,

porém a proporção da mortalidade é maior nos países de IDH médio e baixo em virtude do diagnóstico tardio (Schreuders *et al.*, 2015; Keum e Giovanucci, 2019).

Em relação à queda da incidência de CCR no mundo, o impacto da pandemia de COVID-19 é um dos principais fatores devido a atrasos no diagnóstico e tratamento associados às doenças, fechamentos dos centros de saúde, além da suspensão de programas de triagem e redução da disponibilidade e o acesso à atendimentos, devem causar, em contraste um aumento dos diagnósticos em estágio avançado e mortalidade por este tipo de neoplasia (GLOBOCAN, 2020).

Atualmente, existem técnicas de diagnóstico do estágio inicial do CCR, sendo as principais o teste de sangue oculto nas fezes (FOBT), a sigmoidoscopia flexível (SF) e a colonoscopia (Jenkinson e Steele, 2010; ESMO, 2012). Caso o diagnóstico do tumor seja confirmado na fase inicial da doença, por colonoscopia ou sigmoidoscopia, a ressecção da lesão poderá ser indicada (ESMO, 2012). No teste FOB, as amostras de fezes são coletadas e analisadas quanto à presença de pequenas quantidades de sangue, e há evidências da diminuição da mortalidade em longo prazo com a triagem do CCR por este teste, embora haja dificuldades em detectar lesões na região proximal (Shaukat *et al.*, 2013, Colorectal Cancer Screening, 2021). Em relação à sigmoidoscopia flexível (SF), técnica cujo enfoque é na visualização de lesões na área distal do cólon, o acompanhamento de participantes do *Prostate, Lung, Colorrectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO) por até 22 anos, indica que o seguimento com a SF reduz em longo prazo a incidência de CCR e mortalidade. O resultado é limitante apenas no cólon distal; em homens e idosos (Miller *et al.*, 2019). A colonoscopia, considerada o teste padrão-ouro, é altamente sensível, mas envolve custos mais elevados (Burt *et al.*, 2013; Conteduca *et al.*, 2013; Colorectal Cancer Screening, 2021). Em um estudo de caso-controle, a realização de colonoscopia foi associada a redução do risco para CCR tanto para o cólon distal quanto o proximal após o diagnóstico (Brenner *et al.*, 2011).

1.2.3 Sequência Histopatológica do CCR esporádico

Na sequência histopatológica do CCRs esporádicos, tanto na sequência adenoma-carcinoma quanto na sequência serrilhada, as células epiteliais das criptas colônicas progridem para o adenoma, capaz de evoluir para o adenocarcinoma (Vogelstein *et al.*, 2013; Conteduca *et al.*, 2013). Os adenomas são lesões neoplásicas benignas intraepiteliais, histologicamente caracterizada pela hiper celularidade com núcleos hipercromáticos, vários graus de

estratificação nuclear, e perda de polaridade, isto é, desproporção do volume nuclear em relação ao do citoplasma (Hamilton *et al.*, 2000). A grande maioria dos CCRs surge de pólipos adenomatosos benignos ao longo de várias décadas, de modo que a progressão para neoplasias malignas tende a aumentar a partir dos 60 anos de idade (Brenner *et al.*, 2011; Conteduca *et al.*, 2013). Estas neoplasias benignas caracterizam-se pelo crescimento anormal da mucosa do intestino grosso, projetando-se no lúmen intestinal (Hamilton *et al.*, 2000; Conteduca *et al.*, 2013, Burt *et al.*, 2013).

Dentre os adenomas colorretais, os pólipos adenomatosos e os pólipos serrilhados são os mais prevalentes, e que são precursoras para a maioria dos CCRs humanos (Fleming *et al.*, 2012; Conteduca *et al.*, 2013). Normalmente, estas lesões são assintomáticas (Rex *et al.*, 1996; Zalis *et al.*, 2012; Conteduca *et al.*, 2013). Os pólipos adenomatosos são lesões precursoras do CCR, pois aproximadamente 85 a 90% dos CCRs esporádicos evoluem a partir destas lesões iniciais (Conteduca *et al.*, 2013; Keum e Giovanucci., 2019). Adenomas são caracterizados como solitários ou múltiplos (>3 adenomas), ≥ 10 mm de diâmetro, com >25% de epitélio viloso e com alto grau de displasia, ou seja, definido como grau de diferenciação do epitélio neoplásico em relação ao normal. Possuem um risco particularmente maior de evoluir para malignidade (30-50%) em comparação com adenomas não avançados (1%) (Conteduca *et al.*, 2013; Burt *et al.*, 2013), com taxas de transição estimadas aumentando com a idade de detecção de adenomas avançados (Brenner *et al.*, 2007).

Dentre as características histológicas dos adenomas, aproximadamente 25% das lesões são classificadas, de acordo com a morfologia epitelial, como tubular, 15% como túbulo-viloso e 5% como viloso (Fleming *et al.*, 2012; Conteduca *et al.*, 2013; Nagtegaal *et al.*, 2019). Adenomas tubulares apresentam criptas displásicas com formato glandular, as quais estão circundadas pela lâmina própria, e constituem pelo menos 80% do tumor. Adenomas do tipo viloso caracteriza-se pelo epitélio displásico cujas projeções assemelham-se aos “dedos da mão” e compreendem pelo menos 80% do tumor. Adenomas de caráter túbulo-viloso são constituídos por estruturas tubulares e vilosas, e a proporção é de 80%/20% ou 20%/80%, respectivamente (Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019).

Os pólipos serrilhados é um conjunto de lesões adenomatosas e precursores de aproximadamente 13% dos CCR esporádicos (Conteduca *et al.*, 2013; Nagtegaal *et al.*, 2019). Pólipo serrilhado é um termo geral para qualquer pólipo que mostra uma arquitetura serrilhada, ou formato de dente de serra ou estrelada do epitélio. É um grupo heterogêneo de lesões que

incluem os pólipos hiperplásicos (HP), os adenomas serrilhados sésseis/pólipos (SSA/P) e adenomas serrilhados tradicionais (Fleming *et al.*, 2012; Conteduca *et al.*, 2013; Nagtegaal *et al.*, 2019). Os pólipos hiperplásicos representam de 80-90% dos pólipos serrilhados e são predominantes no cólon distal. Histologicamente, são caracterizados por uma arquitetura tubular simples e a presença do epitélio serrilhado é mais pronunciada nas porções superiores das criptas (Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019). O diagnóstico histológico de SSA/P é caracterizado pelo epitélio serrilhado ao longo da cripta, epitélio hipermucinoso e dilatação da cripta (Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019). Os adenomas serrilhados tradicionais exibem baixo grau de displasia nuclear e apresenta uma arquitetura serrilhada semelhante àquele visto para HP e SSA/P (Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019).

Aproximadamente 90% dos CCRs são diagnosticados como adenocarcinomas, definidas como neoplasias malignas de origem epitelial, localizadas em sua maioria no cólon sigmoide e no reto (Nolte *et al.*, 2016; Nagtegaal *et al.*, 2019). A característica que define o adenocarcinoma colorretal é a invasão através da muscular da mucosa em direção à submucosa e parede muscular externa (Nolte *et al.*, 2016; Nagtegaal *et al.*, 2019). A maioria dos adenocarcinomas colorretais apresenta epitélio neoplásico que varia no tamanho e na forma das estruturas glandulares. Em adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados, as células epiteliais são geralmente hiperplásicas, e no lúmen dessas estruturas glandulares frequentemente se observam detritos celulares (Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019).

Os adenocarcinomas são classificados predominantemente com base na morfologia das estruturas glandulares, e devem ser divididos em bem, moderadamente e pouco diferenciados. Adenocarcinomas pouco diferenciados devem mostrar pelo menos alguma estrutura glandular ou presença de mucinas; os túbulos são normalmente dobrados de forma irregular e distorcidos, e normalmente apresentam um prognóstico desfavorável em relação aos bem ou moderadamente diferenciados (Hamilton *et al.*, 2000, Fleming *et al.*, 2012; Nagtegaal *et al.*, 2019). As lesões com as características morfológicas de adenocarcinoma que são confinados na mucosa intestinal são denominadas de “neoplasia de alto grau intraepitelial”, um termo mais apropriado do que “adenocarcinoma *in situ*” (Hamilton *et al.*, 2000).

1.2.4 Sequência de alterações epigenéticas e moleculares do CCR

À medida que a carcinogênese avança, há um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que determinam as características daquele tumor (Fearon *et al.*, 2011; Vogelstein

et al., 2013; Carethers e Jung, 2015). Apesar de ser possível determinar uma sequência para as alterações genéticas na carcinogênese colorretal, o acúmulo progressivo dessas alterações é a característica mais consistente da progressão clínica e experimental das neoplasias colorretais (Vogelstein e Fearon, 1990). Notavelmente, cerca de 95% das mutações em tumores de cólon são substituições de base única (como C>G), enquanto o restante são deleções ou inserções de uma ou algumas bases (como CTT>CT). Dessas mutações de base única, aproximadamente 90% são mutações *missense*: substituição de nucleotídeo único que resulta em uma substituição de aminoácido, 8% são *nonsense*: substituição de nucleotídeo único que resulta na produção de um códon de parada e 2% em regiões de *splicing* ou em regiões não traduzíveis (UTR) do DNA (Vogelstein *et al.*, 2013). Estas mutações são derivadas por erros de reparo de DNA e/ou defeitos na regulação do ponto de checagem do ciclo celular, concomitante ao processo de proliferação celular aumentada, características que são determinantes na evolução da carcinogênese colorretal (Vogelstein *et al.*, 2013; Bakhoun *et al.*, 2014; Okugawa, Grady e Goel, 2015).

A carcinogênese colorretal abrange três grandes aberrações genéticas e epigenéticas: instabilidade cromossômica, metilação da região de ilha de nucleotídeos CpG (CIMP) e instabilidade de microssatélites (MSI) (Grady e Carethers, 2008; Fearon *et al.*, 2011; Armaghany *et al.*, 2012). A instabilidade cromossômica é caracterizada por anormalidades na estrutura dos cromossomos, ou no seu número de cópias (por exemplo, aneuploidia e poliploidia) que são causadas por erros durante a mitose, tais como defeitos nas proteínas envolvidas no ponto de checagem do ciclo celular e/ou nos centrôssomos (Bakhoun *et al.*, 2014). As instabilidades cromossômicas são altamente prevalentes na sequência adenoma-carcinoma da CCR (Dunican *et al.*, 2002; Pino e Chung, 2010), tanto em modelos murinos (Hoevenaer *et al.*, 2020) quanto nos estudos clínicos (Walther, Houlston e Tomlinson, 2008).

O CIMP é um conjunto de modificações epigenéticas, descobertas por Toyota *et al.* 1999, caracterizado pela hipermetilação de regiões de repetição de dinucleotídeos CG (as chamadas ilhas CpG) nas regiões promotoras dos genes supressores de tumores (como MLH1), ocorrendo o silenciamento da expressão gênica. Contudo, não há consenso sobre os marcadores e critérios para classificar os subtipos de CIMP (Ju *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2016). A hipermetilação do DNA é um mecanismo epigenético envolvido em muitos cânceres. Pode afetar múltiplos processos celulares, incluindo proliferação e apoptose, silenciando genes supressores de tumores (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Okugawa, Grady e Goel, 2015).

A MSI geralmente ocasiona a inativação do sistema do reparo de *mismatches* de DNA, por hipermetilação (80% dos CCR MSI) ou por mutação dos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (20% dos CCR MSI), gerando acúmulo de erros de reparo de DNA, e acometem cerca de 15% a 20% dos CCRs esporádicos e em 95% dos CCRs que surgem em pacientes com síndrome de Lynch (Boland *et al.*, 1998; Grady e Carethers, 2008; Okugawa, Grady e Goel, 2015). Caracteriza-se pelo encurtamento ou alongamento de sequências repetitivas de nucleotídeos de DNA de tumores em comparação com o DNA de células normais do mesmo indivíduo. Estas mutações se devem a erros de pareamento de nucleotídeos ao longo da fita recém-sintetizada durante a síntese de DNA, gerando mutações *frameshift*, ou alterações no quadro de leitura, decorrendo em proteínas truncadas (Grady e Carethers, 2008; Vilar e Gruber, 2010). Três categorias de MSI foram estabelecidos com base nos seguintes critérios: MSI-High (MSI-H), indicando instabilidade em dois ou mais loci, ou > 30% dos loci se um painel maior de marcadores for usado; MSI-Low (MSI-L), indicando instabilidade em um locus, ou em 10-30% dos loci em painéis maiores, e microssatélite estável (MSS), indicando nenhum loci com instabilidade, ou <10% de loci em painéis maiores (Boland *et al.*, 1998; Vilar e Gruber, 2010).

As três sequências de carcinogênese colorretal esporádica são as seguintes: sequência adenoma-carcinoma, via serrilhada e a via inflamatória (Figura 3) (Itzkowitz e Yio, 2004; Grady e Carether., 2008; Fearon, 2011).

A sequência adenoma-carcinoma, em que o adenoma serve como precursor do CCR, é a via clássica desta neoplasia. A inativação por mutações na *APC*, um gene supressor de tumor, resulta na ativação ininterrupta da via de sinalização Wnt/ β -catenina, desencadeando proliferação celular desregulada e desenvolvimento de adenomas (Grady e Carethers, 2008; Fearon *et al.*, 2011). O gene *APC* regula uma série de funções celulares, incluindo mitose, migração e manutenção da estabilidade do genoma. Além disso, as proteínas APC, AXIN1 e GSK3 β fazem parte de um complexo modulador da via de sinalização *Wnt*, o qual regula a localização e estabilidade da β -catenina. No entanto, o truncamento das proteínas deste complexo impede a regulação eficaz da β -catenina, permitindo o seu acúmulo no citoplasma e posterior translocação ao núcleo, servindo como fator transcricional que sinaliza a ativação de *Wnt* (Segditsas e Tomlinson, 2006; Fearon *et al.*, 2011; Nelson e Naëthke, 2013; Dow *et al.*, 2015). A inativação de *APC* é considerada o evento inicial na maioria CCRs, assim como a perda da heterozigose (LOH) deste gene são suficientes para induzir tumores benignos e displásicos adenomas no intestino delgado e grosso em camundongos (Su *et al.*, 1992; Cheung *et al.*, 2010). Em modelo murino de CCRs estabelecidos induzidos pelo nocaute de *Apc*, a

restauração da função de *APC* levou à diferenciação das células tumorais e a regressão sustentada, independentemente de mutação *Kras* e *Tp53* nas lesões (Dow *et al.*, 2015). Mutações subsequentes do oncogene *KRAS* promovem o crescimento de adenoma e a inativação subsequente do gene supressor de tumor *TP53*, contribuindo para a progressão do CCR humano (Grady e Carethers, 2008; Fearon *et al.*, 2011; Armaghany *et al.*, 2012).

Na via serrilhada, na qual o CCR se desenvolve através de adenomas serrilhados onde se destaca a progressão de células epiteliais normais para pólipos hiperplásicos, que progridem para adenoma serrilhado séssil e, finalmente, para o CCR (Leggett e Whitehall, 2010; Kedrin e Gal., 2015). Um dos principais eventos moleculares da via serrilhada é a mutação do oncogene ^{V600E}*BRAF*, que, ao induzir a proliferação celular descontrolada através da ativação constitutiva da via MAPK, contribui para a formação de pólipos hiperplásicos (Jass *et al.*, 2007; Kedrin e Gala, 2015).

Na via inflamatória, a lesão do DNA é induzida pela produção de radicais livres via óxido nítrico sintase (iNOS) na mucosa do cólon com inflamação persistente, seguido por mutação p53 e posterior desenvolvimento de displasia (Itzkowitz e Yio, 2004; Ullman e Itzkowitz, 2011; Tanaka, 2012). A ativação contínua do fator de transcrição NF-κB favorece a progressão do CCR associado à colite (CAC) (Itzkowitz e Yio, 2004), e é altamente expresso na mucosa intestinal em pacientes com Colite Ulcerativa (UC) com alto grau de inflamação (Rogler *et al.*, 1998). O NF-κB está sob influência de diversos desencadeantes, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), radiação UV e radicais livres (Sarkar e Li, 2008). A incidência da doença inflamatória intestinal (DII) é observada em 2% dos casos de CCR (Eaden, Abrams e Mayberry, 2001; Triantafillidis, Nasioulas e Kosmidis, 2009). Apesar dessa baixa incidência, pacientes com UC após diagnóstico apresenta maior risco de desenvolver o CCR, com 3%, 5,9% e 8,7% de risco em 10, 20 e 30 anos após o diagnóstico, respectivamente (Eaden, Abrams e Mayberry, 2001). Em metanálise de oito estudos de coorte com acompanhamento médio 14 anos após o diagnóstico inicial de UC, há um risco estimado de 2,4 vezes maior de desenvolver CCR em comparação com a população em geral (Jess, Rungoe e Peyrin-Biroulet, 2012). A evolução da CAC ocorre mediante a sequência **inflamação-displasia-carcinoma**, diferentemente da sequência tradicional do CCR **adenoma-adenocarcinoma** (Itzkowitz e Yio, 2004; Rogler, 2014). Para o estudo da CAC a nível histopatológico quanto molecular, são empregados modelos murinos de indução química por AOM e promoção através do dextrano sulfato de sódio na água (DSS) por períodos de 7 dias consecutivos (Tanaka, 2012). Nestes

modelos, é possível o desenvolvimento de neoplasias em 12 semanas após indução/promoção do protocolo experimental (Tanaka *et al.*, 2003).

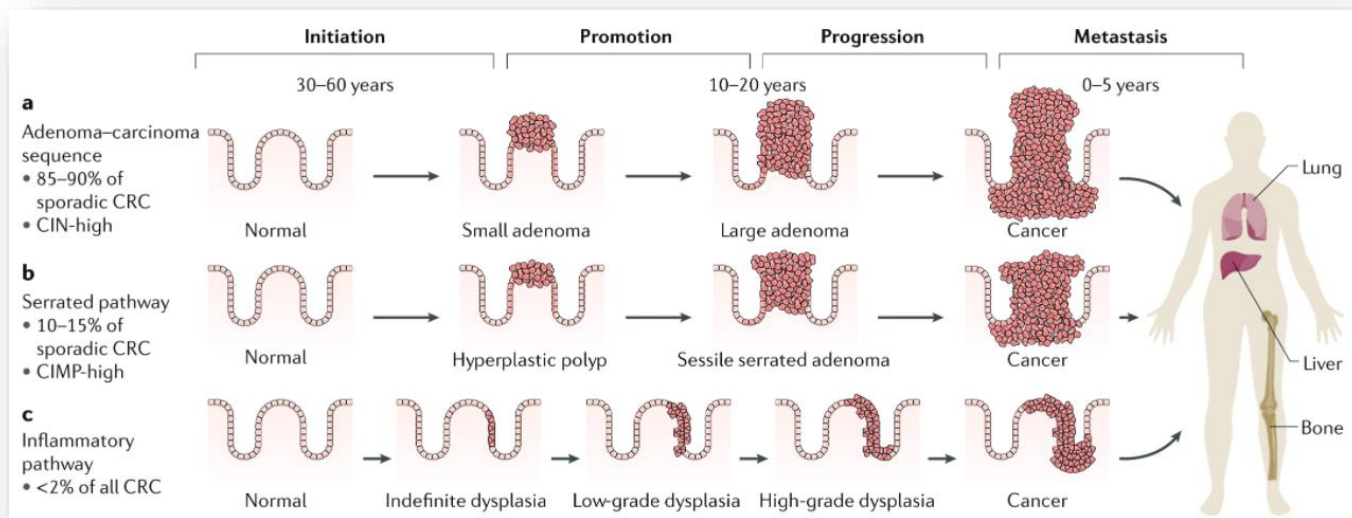


Figura 3 – Ilustração das três vias de carcinogênese colorretal. **a** Via adenoma-adenocarcinoma. **b** Via serrilhada. **c** Via inflamatória (Keum e Giovannucci, 2019).

1.3. Carcinogênese Experimental de CCR

1.3.1 Etapas da Carcinogênese Química

A carcinogênese química é um processo complexo de múltiplas etapas: iniciação, promoção, progressão, invasão e metástase (Figura 4) (Pitot *et al.*, 2000; Koh, Ho e Pan, 2020). A **iniciação** envolve a fixação de dano genético irreversível por lesão direta ou indireta pela presença de adutos de DNA, e após um ciclo de divisão celular, predispondo as células-alvo à transformação neoplásica subsequente. A iniciação ocorre após a administração de um **agente iniciador**, ou carcinógeno iniciador ou completo, não exibindo um limite de exposição seguro (*threshold*) (Pitot *et al.*, 2000). Dentre os agentes iniciadores mais comuns temos as substâncias químicas, como os hidrocarbonetos policíclico aromáticos (HPA), aminas aromáticas, e agentes físicos como a radiação ou a luz ultravioleta (Pitot *et al.*, 2000; Koh, Ho e Pan, 2020). Moore *et al.*, (1987) foram uns dos primeiros a identificar células iniciadas, em hepatócitos com expressão de glutathione-S-transferase-pi (GSTP) em fígados de animais expostos a dietilnitrosamina (DEN). Além disso, mutações no **proto-oncogene ras** foram relatadas em lesões pré-neoplásicas precoces que desenvolveram a partir de células iniciadas, o que é

possível inferir que o início das neoplasias no trato gastrointestinal surge de células únicas e iniciadas (Buchmann *et al.*, 1989; Pitot *et al.*, 2000).

Na fase de **promoção**, diferentemente da fase de iniciação, não ocorrem alterações na estrutura do genoma da célula iniciada em expansão clonal, porém ocorrem na expressão gênica (Pitot *et al.*, 2000; Koh, Ho e Pan, 2020). As células iniciadas proliferam, fenômeno denominado expansão clonal, e como efeito podem ocorrer a formação de lesões pré-neoplásicas derivadas das células iniciadas, as quais posteriormente podem progredir para neoplasias benignas e malignas. É um processo de médio e longo-prazo e pode ser revertido após a intervenção com agentes preventores, ou a interrupção da aplicação de um agente promotor, conforme descrito em vários modelos animais (Pitot e Dragan, 1991; Pitot *et al.*, 2000). A expansão de células iniciadas depende principalmente da administração contínua do agente promotor, assim como também depende de fatores biológicos: idade, dieta e hormônios; e fatores farmacodinâmicos: dosagem e eficácia do promotor (Pitot e Dragan, 1991; Pitot *et al.*, 2000). A grande parte dos agentes promotores de tumores podem ocasionar efeitos pró-inflamatórios após a aplicação, mas geralmente não resultam em tumorigênese sem a aplicação prévia dos agentes iniciadores (Pitot e Dragan, 1991; Pitot *et al.*, 2000). Por exemplo, após a administração de DEN, a promoção dos hepatócitos iniciados pode ser realizada de diferentes maneiras, por exemplo, a administração de fenobarbital sódico (PB), tetracloreto de carbono (CCL₄), dieta hiperlipídica (HFD – *High Fat Diet*) ou realização de hepatectomia parcial (Aydinlik *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2010; Bakiri e Wagner, 2013). Outro exemplo é o modelo murino de indução química por AOM e promovida por DSS por períodos de 7 dias consecutivos na água para o estudo da colite associada ao câncer colorretal (CAC), na qual é induzida a inflamação crônica no cólon, possibilitando a formação de lesões displásicas (Tanaka, 2012; Parang, Barrett e Williams, 2016).

A **progressão** envolve alterações genômicas mais complexas e irreversíveis. Nesta fase, é possível observar mudanças morfológicas resultantes de instabilidades cariotípicas (Pitot e Dragan, 1991; Pitot *et al.*, 2000). Nesta fase, as células neoplásicas benignas tornam-se malignas, adquirindo características agressivas e potencial metastático após sofrer alterações genéticas e epigenéticas adicionais que podem conferir uma vantagem seletiva de crescimento às células em transformação maligna (Tysnes e Bjerkvig, 2007). Esse processo continua, aumenta a malignidade do tumor e promovendo assim o crescimento do tumor ao longo do processo de desenvolvimento do tumor (Tysnes e Bjerkvig, 2007; Koh, Ho e Pan, 2020).

A **metástase** é caracterizada pela disseminação de células tumorais do órgão primário para outros órgãos ou tecidos através da corrente sanguínea ou linfática. É difícil estimar com precisão a duração de cada fase, pois esses processos geralmente levam muito tempo e podem evoluir em décadas. Para os CCR de tipo hereditário, a progressão em alguns estágios ocorre mais rapidamente (Tysnes e Bjerkvig, 2007). Quanto aos possíveis mecanismos envolvidos, existem vários que promovem /facilitam a invasão das células cancerosas, como por exemplo, as proteases, entre elas as metaloproteinases de matriz, as quais clivam proteínas transmembranas de adesão celular, como a E-caderina, levando a ruptura das junções célula-célula e componentes da lâmina basal como o colágeno IV e proteínas de adesão (Masterson e O'Dea, 2007; Joyce e Pollard, 2009).

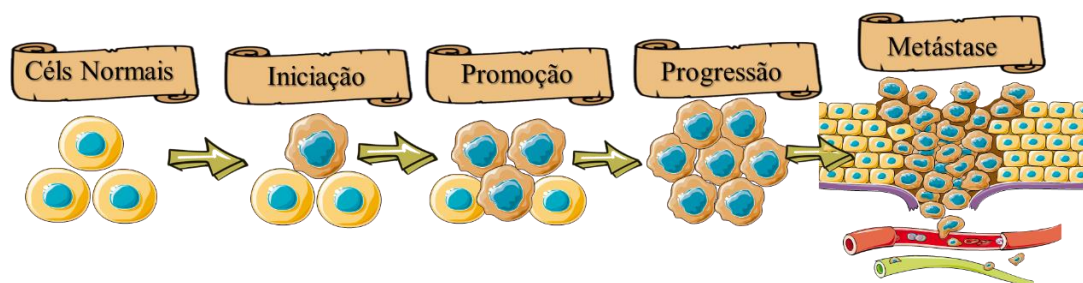


Figura 4 – Ilustração dos estágios da carcinogênese experimental.

(Pitot *et al.*, 2000; Ilustração realizada com auxílio da webpage <https://smart.servier.com/>)

1.3.2 Modelos Experimentais *in vivo* de CCR

Para o estudo de intervenções sobre o desenvolvimento do CCR, os modelos em roedores são os mais indicados na busca de potenciais agentes quimiopreventivos e/ou avaliação de agentes iniciadores ou promotores da carcinogênese de cólon. Esses modelos permitem estudar mecanismos e identificação de novos biomarcadores e/ou genes-alvo, para posterior avaliação da quimioprevenção em ensaios clínicos (Corpet e Pierre, 2005; Johnson e Fleet, 2012; Afrin *et al.*, 2020).

Apesar das contribuições dos ensaios *in vivo* para a saúde humana, é importante ter em consideração os princípios dos 3Rs: “*Reduce, Refine, Replace*”. É fundamental que os animais não sejam submetidos a pesquisas desnecessariamente, e que os dados obtidos nos ensaios pré-clínicos não sejam desperdiçados. O número de animais usados deve ser minimizado em todos os casos e alternativas *in vitro* devem ser consideradas quando disponíveis (Taylor, 2010; Robinson *et al.*, 2019).

Visto que o padrão alimentar é um fator determinante para o risco de desenvolvimento do CCR (Mehta *et al.*, 2017; GLOBOCAN, 2020), vários modelos experimentais foram conduzidos para estudar como os componentes da dieta ocidental "*Western Diet*" (WD) atuam na carcinogênese colorretal *in vivo* (Newmark *et al.*, 2001; Johnson e Fleet, 2012). Esta dieta WD apresenta variações entre as proporções de gordura (20% vs 5%), cálcio (5 vs 0,5 mg/g) e vitamina D₃ (1 vs 0,11 IU/g) em relação a dieta basal (AIN76) (Newmark *et al.*, 2001; Newmark *et al.*, 2009). Após 18 meses, camundongos C57BL/6 que consumiram somente a WD desenvolveram tumores no cólon sem a necessidade do uso de carcinógenos (Newmark *et al.*, 2009). Além disso, o índice de proliferação de células epiteliais Ki-67-positivas foi 40% maior nas criptas de camundongos C57BL/6 que consumiram WD por 12 meses em comparação com camundongos que consumiram apenas dieta basal (Dermadi *et al.*, 2017).

Camundongos geneticamente modificados oferecem o potencial para precisamente recapitular etiologias moleculares específicas relevantes de doenças específicas em humanos, incluindo o CCR (Heyer *et al.*, 2010; Johnson e Fleet, 2012). Os modelos em camundongos para a pesquisa translacional precisam reproduzir o perfil genético/molecular, assim como o contexto e a heterogeneidade dos tumores humanos (Heyer *et al.*, 2010).

O modelo de camundongo *Min* (C57BL/6) descrito pela primeira vez por Moser *et al* (1990), é um modelo de carcinogênese do cólon humano para polipose adenomatosa familiar (FAP) com um dos alelos de *Apc* inativado (LOH). No entanto, uma das limitações deste modelo é o desenvolvimento espontâneo de tumores no intestino delgado, onde se desenvolve até 30 pólipos por camundongo, levando a anemia, caquexia e menor tempo de sobrevivência, aproximadamente 120 dias (Moser *et al.*, 1990). Em relação às alterações moleculares, as mutações de *K-ras* (Shoemaker, 1997) e inativação de *p53* (Sohn *et al.*, 2003) são raramente detectadas em pólipos deste modelo. Os focos de criptas aberrantes (FCAs), lesões pre-neoplásicas no cólon, estão presentes em camundongos *Min*, porém, não apresentam elevação em nível da mucosa, diferentemente do FCA "clássico" (Paulsen *et al.*, 2000).

Outros modelos, como os *Cre-Lox*, em células-tronco pluripotentes de camundongos transgênicos, apresentam genes flanqueados por sítios *loxP* que são modificados pela Cre recombinase. Tradicionalmente, esses alelos tornam-se ativados ou inativados constitutivamente em animais transgênicos compostos pela recombinase Cre sob o controle de um promotor específico do tecido. Os sites *LoxP* podem ser usados de duas maneiras. Quando a exclusão de função do gene é desejada, os locais *LoxP* são introduzidos no flanco um exon,

que quando excluído, impede a codificação de proteínas funcionais (Heyer *et al.*, 2010; Johnson e Fleet, 2012; McLellan, Rosenthal e Pinto, 2017). Não obstante, uma das desvantagens desta abordagem incluem a imprevisibilidade do efeito, bem como a acessibilidade limitada de certos tecidos alvo para infecção (Heyer *et al.*, 2010). IRF8KO em camundongos C57BL/6 para avaliação de CD4⁺ e CD8⁺ em modelos de IBD em cólon (Ibrahim *et al.*, 2018) e RORYKO C57BL/6 para o estudo do efeito da IL-6 em modelo de CAC (Rizzo *et al.*, 2018) são exemplos do uso destes modelos.

Um campo de estudo recente é a relação da microbiota intestinal com a homeostase na fisiologia humana (Wong e Jung, 2018; Hanahan, 2022). Evidentemente, a drástica mudança no perfil de microorganismos e posterior ruptura da barreira intestinal –disbiose, é uma característica prevalente na carcinogênese, principalmente colorretal (Wong e Jung, 2018; Hanahan, 2022). Ensaios *in vivo* em roedores tem possibilitado o estudo deste fenômeno. É possível encontrar bactérias com atividade promotora ou anti-promotora da carcinogênese colorretal, em ratos F344 Fischer induzidos com DMH foi observado que ratos com inoculação bacteriana (GB) apresentaram um número maior de FCAs e multiplicidade em comparação a ratos *Germ-Free* (GF), assim como a presença de *Bifidobacterium breve*, produtoras de ácido láctico, inibiram o desenvolvimento de FCA em relação ao GB (Onoue *et al.*, 1997). Wong *et al.*, 2017 em modelo de indução por AOM em camundongos C57BL/6 observaram mudanças no perfil da microbiota intestinal no grupo AOM+CRC fezes em comparação ao AOM-HC fezes após ingestão por gavagem das fezes de pacientes saudáveis ou com CCR. O grupo AOM+CRC fezes desenvolveu maior número de pólipos intestinais e maior grau de displasia, aumentou os níveis protéicos de marcadores de proliferação celular Ki-67 e PCNA em 32 semanas, além de aumentar a porcentagem de linfócitos pró-inflamatórios Th1 (CD4⁺ e IFN- γ) e Th17 (CD4⁺ IL-17⁺) em comparação ao AOM-HC fezes, o que indica um papel importante da disbiose na tumorigênese colorretal.

1.3.3 Indutores químicos da Carcinogênese Colorretal *in vivo*

Para o estudo da carcinogênese translacional do cólon, modelos induzidos quimicamente em roedores são relevantes, uma vez que os padrões histopatológicos e moleculares são semelhantes aos seres humanos. (Corpet, 2005; Clapper *et al.*, 2020). Além disso, tanto ratos quanto camundongos apresentam baixa probabilidade de desenvolver tumores de maneira espontânea no cólon (Corpet e Pierre, 2005; Johnson e Fleet, 2012). A indução

química pelo DMH e seu metabólito a azoximetano (AOM) são os modelos mais utilizados (Pandiri *et al.*, 2011; Boudreau *et al.*, 2013; Ward e Treuting, 2014).

DMH é um procarcinógeno usado principalmente para indução da carcinogênese do cólon em roedores (Wolters, 1982; Persê e Cerar, 2011). O DMH sofre metabolismo hepático, formando azoximetano (AOM) e, posteriormente, metilazoximetanol (MAM) (Wolters, 1982). CYP2E1, uma isoenzima hepática da família do citocromo P450, converte AOM em MAM por hidroxilação, enquanto o MAM se decompõe em cerca de 12 horas em metildiazônio em tecidos extra-hepáticos, como o cólon, causando a metilação do DNA, formando adutos de O₆-metilguanina, e posteriormente podendo iniciar a carcinogênese colorretal (Sohn *et al.*, 2001).

Em modelos de carcinogênese colorretal, os tumores induzidos pelo AOM e DMH em ratos e camundongos têm em comum características semelhantes às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em humanos (Boudreau *et al.*, 2013; Ward e Treuting, 2014). Ratos machos F344, Wistar e Sprague-Dawley são os mais utilizados (Rodrigues *et al.*, 2002; Femia e Caderni, 2008; Pêrse e Cerar, 2011). Assim como nos tumores de cólon humanos, mutações em *K-ras* são frequentes (30-60%), contudo raros ou ausentes em camundongos (Jackson *et al.*, 1999), e mutações de β -catenina ocorrem frequentemente em FCA, adenomas e adenocarcinomas de cólon, porém diferentemente dos humanos, raramente apresentam mutações do *Apc* (8%) e raramente mutações do *TP53* (Corpet e Pierre, 2005; Takahashi e Wakabayashi, 2005; Pêrse e Cera., 2011). Assim como nos tumores de cólon humanos, a expressão de enzimas associadas à inflamação, óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), estão aumentadas na carcinogênese do cólon de rato induzida por AOM, assim como o aumento de óxido nítrico (NO) e de prostaglandinas estão envolvidas no desenvolvimento de tumor de cólon (Takahashi *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2004).

1.3.4 Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

A identificação de lesões precursoras de CCR têm sido um desafio de longa data em roedores e nos seres humanos. E visto que o desenvolvimento de tumores é um processo relativamente longo, podendo demorar de 6 a 8 meses para desenvolver em modelos *in vivo* induzidos pela DMH/AOM, lesões pré-neoplásicas em roedores podem ser usadas como biomarcadores para avaliar o risco de desenvolver neoplasias no cólon ou para identificar moduladores da carcinogênese do cólon em estudos de curto a médio prazos (Femia e Caderni, 2008; Pêrse e Cerar, 2011).

Os FCA (Figura 5) são lesões consideradas biomarcadores morfológicos empregados para a avaliação da carcinogênese do cólon em roedores e humanos (Bird, 2000; Pêrse e Cerar, 2011; Suzui *et al.*, 2013; Clapper *et al.*, 2020). Além disso, os FCAs são importantes tanto no estudo da toxicidade quanto no estudo de ações preventivas de diversos compostos (Bird, 2000; Cheng e De Lai, 2003; Clapper *et al.*, 2020). Estas lesões foram relatadas pela primeira vez em 1987 por Bird. Os FCAs são lesões pré-neoplásicas na mucosa colônica, caracterizada como um conjunto de criptas aberrantes, causadas por defeitos de replicação/diferenciação celular, identificadas por seu revestimento epitelial mais espesso, coloração mais escura em amostras de cólon coradas com azul de metileno (Bird, 1987; Pretlow, 1995; Di Gregorio *et al.*, 1997). Pretlow *et al.*, 1991, relataram que o FCA era pelo menos três vezes maior em diâmetro do que as criptas colônicas normais, e a maioria dos FCA apresentam luz de forma oval ou como fenda com formato de “foice”, diferentemente das normais. O tamanho dos FCA pode variar, de 1 a 412 criptas aberrantes por foco (Otori *et al.*, 1995; Fenoglio-Preiser e Noffsinger, 1999). Diversos fatores podem afetar o número, tamanho, padrão morfológico dos FCA, tais como: idade, sexo e linhagem do modelo animal, protocolo experimental, frequência de exposição ao carcinógeno, região do cólon examinado, dentre outros (Bird, 2000). Em termos de distribuição dos FCA ao longo do cólon em roedores induzidos com DMH ou AOM, a localização da maioria dos FCA ocorre nas regiões mediais e distais do cólon (McLellan *et al.*, 1988; Shi, Chiang e Kuo, 2004; Suzui *et al.*, 2013). É importante destacar que as FCA podem regredir ao longo do tempo, conforme observado em camundongos com dupla mutação *Apc/Kras* (Choi *et al.*, 2015), e em humanos (Schoen *et al.*, 2008).

FCA podem ser classificadas morfológicamente como lesões hiperplásicas ou displásicas (Bird, 2000; Clapper, 2020). FCA hiperplásicos são caracterizadas por criptas mais longas ou maiores do que as normais; apresentam na porção apical morfologia serrátil e uma marcante hiperproliferação na porção basal da cripta. Ademais, estas lesões assemelham-se aos pólipos hiperplásicos, apesar de apresentarem uma camada de colágeno subepitelial de espessura normal em relação a estas lesões neoplásicas (Fenoglio-Preiser e Noffsinger, 1999; Bouzourene *et al.*, 1999). Enquanto que os FCA displásicos possuem semelhanças morfológicas e moleculares com os adenomas, e assim alcunhadas como "microadenomas" por alguns autores (Roncucci *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2015; Clapper *et al.*, 2020). Entretanto, existe a possibilidade de que FCA hiperplásicos possam progredir em displásicos, através de um estágio de transição epitelial identificado por núcleos marcados por PCNA nos dois terços inferiores da cripta e por depleção de mucina (Otori *et al.*, 1995).

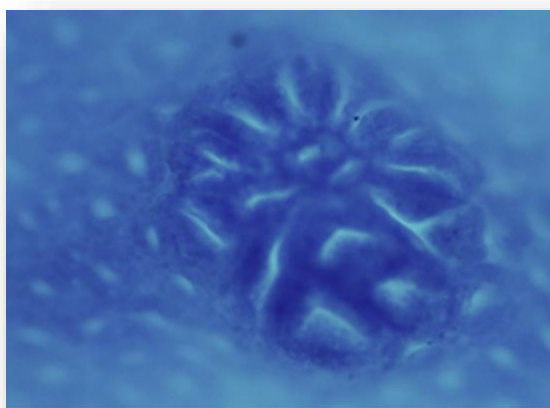


Figura 5 – FCA com > de 9 criptas aberrantes (De Moura *et al.*, 2019).

Mutações de *K-ras* são mais frequentes em FCAs hiperplásicos em ratos (Stopera, Murphy e Bird, 1992; Vivona *et al.*, 1993), enquanto que a inativação de *p53* é incomum em FCA humanos (Yamashita *et al.*, 1995; Shivapurkar *et al.*, 1997) assim como em *Apc* (encontrada em 5 de 84 FCAs em pacientes) (Jen *et al.*, 1994; Otori *et al.*, 1998), sendo mutações mais comuns de encontrar em adenomas e adenocarcinomas. Ademais, metilações de ilhas CpG foram encontradas em amostras de FCA em 53% de pacientes com CCR esporádico, principalmente nas regiões promotoras de MINT31, MGMT e MINT1 (Chan *et al.*, 2002). A perda de heterozigose do gene *protein tyrosine phosphatase receptor type J* (PTPRJ - 11p11), caracterizado como supressor tumoral, em FCAs, pode ser indício de ser uma alteração precursora da carcinogênese colorretal (Luo *et al.*, 2006).

Os FCA displásicos são considerados lesões precursoras de adenomas (Di Gregorio *et al.*, 1997; Clapper *et al.*, 2020). Os FCAs displásicos são caracterizados por distorções da estrutura da cripta, diminuição do número de células caliciformes, existência de estratificação nuclear e núcleos aumentados (Roncucci *et al.*, 1991; Bird, 2000; Clapper *et al.*, 2020). Estas lesões geralmente exibem acúmulo de β -catenina nuclear e/ou depleção de mucina (Takahashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2004). A administração de uma dieta hiperlipídica 20% (5% de óleo de soja + 15% de carne bovina por peso), aumentou a incidência de microadenomas em ratos *Sprague-Dawley* induzidos por AOM administrada por *via* subcutânea (2x 15mg/kg *bw*) (Baijal, Fitzpatrick e Bird, 1998). FCA displásicos são mais comuns em pacientes de FAP (Chan *et al.*, 2002).

Evidentemente, é possível confirmar a presença dos FCA displásicos em humanos através da cromoendoscopia (Hurlstone *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2008; Kowalczyk *et al.*, 2016). Thorup (1997) encontrou uma correlação entre o grau de displasia e a multiplicidade de criptas (número de criptas aberrantes por foco), em ratos Wistar, indicando que os FCA podem crescer em número e tamanho, assim como, há indício de progressão em neoplasias ao longo do tempo.

Contudo, a predição do risco dos FCA e/ou recorrência de CCR permanece controverso (Lance e Hamilton, 2008; Schoen *et al.*, 2008). Alguns autores não encontraram correlação entre os FCA e a formação adenomas ou adenocarcinomas em roedores, levantando o questionamento se poderiam ser as lesões precursoras dos tumores colorretais (Hardman *et al.*, 1991; Cameron, Garza e Hardman, 1996; Paulsen *et al.*, 2005). Paulsen *et al.* (2005) encontraram que os FCA hiperplásicos e displásicos em ratos machos Fisher F344 induzidos pela AOM (15 mg/kg peso corpóreo, duas doses) não apresentaram expressão alterada de β -catenina ou baixa expressão de ciclina D1, as quais estão relacionadas com ativação da via WNT e a progressão da carcinogênese. Magnunson, Carr e Bird (1993) encontraram que o consumo do Ácido Cólico (AC) em ratos machos *Sprague Dawley* não promoveu o maior número de FCA em comparação ao grupo que recebeu apenas AOM, em contraste ao número de adenomas e adenocarcinomas ser maior no grupo AC do que o controle positivo. Não obstante, foi observado que alguns FCA, principalmente os de maior multiplicidade, poderiam ser precursores dos adenomas, indicando um possível papel seletivo do AC em alguns FCA.

Como biomarcador clínico, é possível identificar os FCA em seres humanos, contudo, estão presentes em menor número em relação aos roedores (Hurlstone *et al.*, 2005), o que é evidente em outras lesões preneoplásicas, tais como os focos depletares de mucina (MDF) no cólon (Gupta *et al.*, 2017). Ademais, os FCA podem regredir de maneira espontânea, o que dificulta o seu acompanhamento na evolução da carcinogênese colorretal nos pacientes (Schoen *et al.*, 2008). Portanto, o seu valor preditivo no CCR não demonstra ter importância clínica quando comparado aos adenomas colônicos (Lance e Hamilton, 2008). Não obstante, isto não reduz a sua relevância no estudo da carcinogênese colorretal *in vivo*, principalmente no delineamento de ensaios clínicos avaliando compostos quimiopreventivos (Corpet e Pierre, 2005; Afrin *et al.*, 2020). Wargovich *et al.*, 2000 avaliaram 78 compostos potenciais quimiopreventivos, dentre eles a aspirina e a epigalocaquetina-galato, na modulação de FCA em ratos F344 Fischer.

1.4 Heme presente na carne vermelha como fator de risco de CCR esporádico

1.4.1 Consumo de Carne Vermelha e Processada

A carne vermelha contém proteínas e micronutrientes de alto valor, como vitaminas do complexo B, ferro e zinco. A denominação de carne processada refere-se à carne transformada através de processos para melhorar o sabor ou a sua preservação (IARC, 2015). Vários estudos prospectivos mostraram uma associação entre o risco de CCR e o alto consumo de carne vermelha e processada (Norat *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2005; Oba *et al.*, 2006). Norat *et al.* (2005) concluíram que o consumo de carne vermelha está positivamente, mas não significativamente relacionado ao risco de CCR, enquanto o consumo de carne processada está significativamente relacionado. Um estudo de metanálise concluiu que o consumo de 100 g / dia de carne vermelha e 50g / dia de carne processada está associado a 17% e 18% de risco de CCR, respectivamente (Chan *et al.*, 2011; IARC, 2015). Consonantemente, um consumo de 100 g/dia de carne vermelha e 50g/dia de carne processada está associado a um risco de 27% e 29% de adenomas colorretais, respectivamente (Aune *et al.*, 2013). Portanto, há evidências suficientes da ingestão elevada de carne vermelha processada em seja carcinogênica seres humanos, contudo, há evidências limitadas da carcinogenicidade do alto consumo da carne vermelha não processada (IARC, 2015).

O risco de CCR pelo consumo de carne vermelha e processada pode ser explicado por seus componentes químicos, que podem ser carcinogênicos, como aminas aromáticas heterocíclicas (HAA), gordura saturada alta, N-nitroso-compostos (NOC), e ferro heme. Os HAA são formados durante o processo de aquecimento no cozimento da carne (Alaejos e Afonso, 2011). Em um estudo de coorte, HAA como MeIQx e DiMeIQx, compostos de nitrito e nitrato (NOC) e ferro heme estão associados ao risco de CCR e podem explicar a associação entre ingestão de carne vermelha e processada e CCR (Cross *et al.*, 2010). Uma abordagem experimental desses fatores de risco foi avaliada, onde o ferro heme promoveu a carcinogênese do cólon independentemente do NOC e HAA em modelo de roedores (Bastide *et al.*, 2015).

1.4.2 Heme – Biossíntese, Epidemiologia e Efeitos Biológicos

Heme, ou ferro heme-conjugado ao átomo de ferro (ferriprotoporfirina IX) consiste em um átomo de ferro presente no centro do anel heterocíclico chamado porfirina (Ryder e Tyrell, 2000; Sesink, 2000). A síntese de heme é indispensável para a vida e está presente em todas as células do organismo, exceto em eritrócitos maduros (Meyer, 2007). Heme é

sintetizado e degradado continuamente, processo que ocorre de maneira homeostática pela enzima heme oxigenase (HO), pois o excesso ou a deficiência de heme são prejudiciais para a célula. Heme livre, não apropriadamente ligado, é um agente pró-oxidante e potencialmente tóxico (Sesink, 2000; Meyer, 2007; Correia, Sinclair e De Matteis, 2011; Khan e Quigley, 2011).

Heme exerce uma função prostética em proteínas denominadas hemoproteínas (Figura 5), as quais estão envolvidas em várias funções biológicas, incluindo ligação de oxigênio, como as hemoglobinas e mioglobinas (Ponka, 1999; Ryter e Tyrell, 2000; Correia, Sinclair e De Mateis, 2011), metabolismo do oxigênio, dentre elas as oxidases e peroxidases (Naussef, McCormick e Hong Yi, 1992; Gatterman *et al.*, 1997) e transferência de elétrons, como o citocromo c (Dumont *et al.*, 1991; Howe e Merchant, 1994). Além disso, participa na síntese ou na regulação de outras proteínas, tanto a nível proteico quanto a nível molecular; tais como a catalase (Hamilton, Hofbauer, e Ruis, 1982; Hörtner *et al.*, 1982), GMP cíclico (Stone e Marletta., 1998; Ikuta, Ausenda e Cappellini, 2001), óxido nítrico (White, 1992) e atividade neurotrófica (Kimura *et al*, 2008; Ohta *et al*, 2015). O destino da hemoglobina heme é bem definida: sofre síntese nos eritrócitos e degradação final do sistema retículo endotelial (Ponka, 1999; Sesink, 2000; Meyer, 2007) (Figura 6).

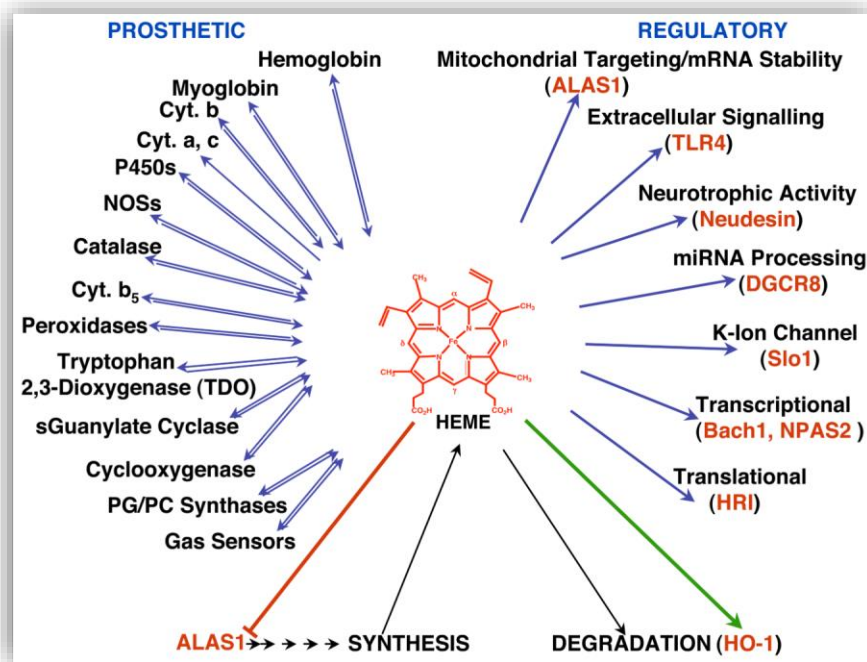


Figura 6 – Papel do heme em diversas funções biológicas, tanto prostéticas quanto regulatórias (Correia *et al*, 2011).

A biossíntese do heme envolve 8 enzimas, 4 das quais são citoplasmáticas e 4 das quais são mitocondriais (Figura 7). A primeira etapa ocorre na mitocôndria e envolve a condensação de succinil coenzima A (CoA) e glicina para formar o ácido 5-aminolevulínico (ALA), catalisado pela ALA sintase (ALA-S). As próximas 4 etapas biossintéticas ocorrem no citosol. ALA desidratase (ALA-D) converte duas moléculas de ALA para um porfobilinogênio monopirrol (PBG). Duas etapas enzimáticas subsequentes convertem 4 moléculas de PBG no tetrapirrol uroporfirinogênio cíclico III, que é então descarboxilado para formar coproporfirinogênio III. As três etapas finais desta via, incluindo a inserção de Fe^{2+} em protoporfirina IX por ferroquelatase, ocorre nas mitocôndrias (Ponka, 1999; Rytter e Tyrell, 2000).

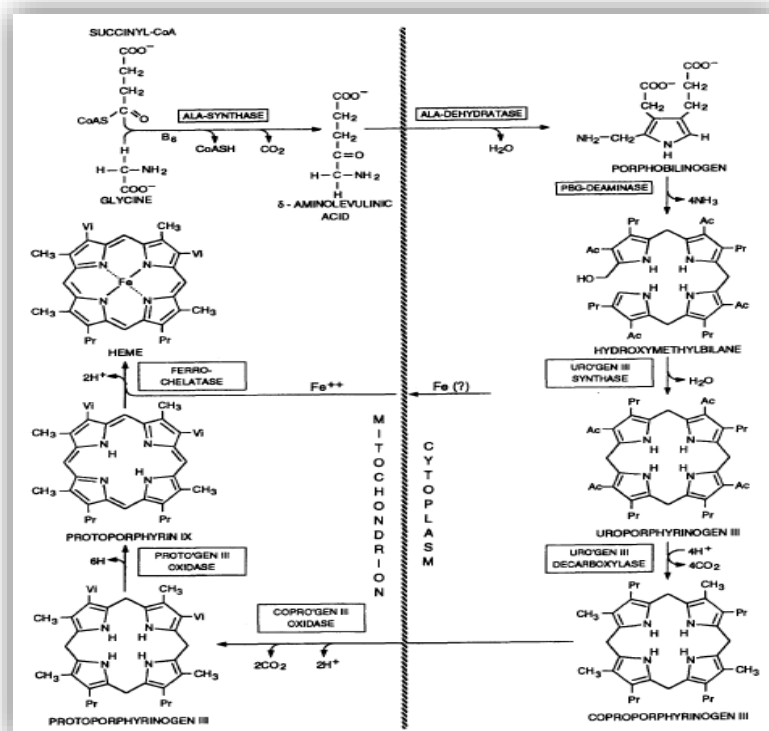


Figura 7– Via da biossíntese do heme (Polka, 1999) na mitocôndria condensação de succinil coenzima A (CoA) e glicina para formar o ácido 5-aminolevulínico (ALA), catalisado pela ALA sintase (ALA-S). no citosol. ALA desidratase (ALA-D) converte duas moléculas de ALA para um porfobilinogênio monopirrol (PBG). 4 moléculas de PBG no tetrapirrol uroporfirinogênio cíclico III, há descarboxilação para formar coproporfirinogênio III. A inserção de Fe^{2+} em protoporfirina IX por ferroquelatase, ocorre nas mitocôndrias (Ponka, 1999; Rytter e Tyrell, 2000).

Na via da degradação, heme oxigenase microsossomal catalisa a etapa limitadora da taxa no metabolismo do heme (Figura 8). Ambas as isozimas de heme oxigenase (HO-1 e HO-2)

oxidam heme, ou ferriprotoporfirina IX, ao pigmento biliar biliverdina-IXa (BV), de caráter antioxidante, em uma reação que requer 3 moles de oxigênio molecular. NADPH: citocromo p-450 redutase, reduz o heme férrico como um pré-requisito para cada ciclo de ligação e ativação de oxigênio. A clivagem do anel heme libera o α -meteno e faz a ponte de carbono como monóxido de carbono, gerando o complexo biliverdina-ferro (BV-Fe-III). Um NADPH adicional a redução dependente libera Fe-II do BV. O BV é reduzido à bilirrubina por NAD(P)H: biliverdina redutase (Polka, 1999; Ryter e Tyrell, 2000).

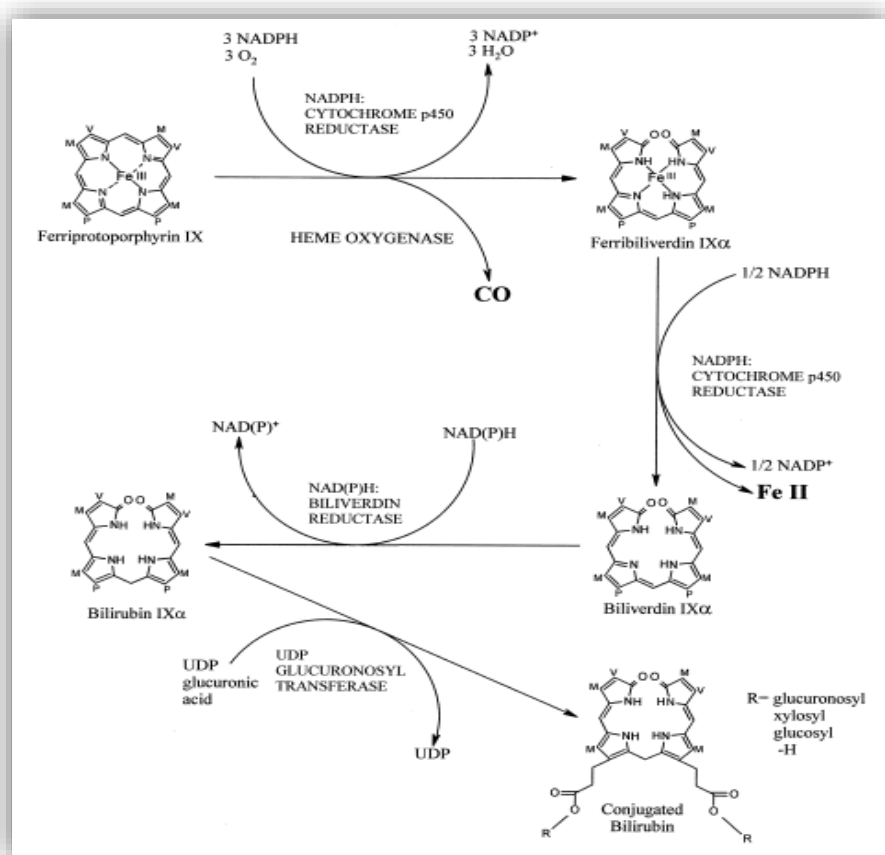


Figura 8 – Via da degradação do heme (Ryter e Tyrell, 2000). Heme oxigenase oxida heme, ou ferriprotoporfirina IX, ao pigmento biliar biliverdina-IXa (BV). NADPH: citocromo p-450 redutase, reduz o heme férrico para ativação de oxigênio. A clivagem do anel heme libera o α -meteno e faz a ponte de carbono como monóxido de carbono, gerando o complexo biliverdina-ferro (BV-Fe-III). NADPH dependente libera Fe-II do BV. O BV é reduzido à bilirrubina por NAD (P)H: biliverdina redutase (Polka, 1999; Ryter e Tyrell, 2000).

Heme, um complexo hidrofóbico de baixo peso molecular, pode promover reações deletérias dependentes de ferro levando à geração de ROS e lipoperoxidação (Ryter e Tyrell, 2000). O consumo de heme presente em carnes vermelhas e processadas pode estar associado a um risco maior de desenvolver o CCR (Sesink, 1999; Santarelli, 2008). Foi demonstrado que

o heme é um potencial carcinógeno por causa de seus efeitos genotóxicos e citotóxicos na mucosa colônica, sendo assim um indutor ou promotor de carcinogênese colorretal (Bastide *et al.*, 2011). O ferro heme catalisa a oxidação de gorduras poliinsaturadas, gerando aldeídos, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE). Estes produtos são tanto mutagênicos quanto citotóxicos (Bastide *et al.*, 2011, 2015). O ferro heme teve um papel importante na promoção da carcinogênese do cólon no modelo de ratos Fisher F344 induzido quimicamente e validado em tumores em camundongos APC *min* (Bastide *et al.*, 2015). Ademais, 0,2 $\mu\text{mol/g}$ heme induziu hiperproliferação nos dias 4 e 7 de ingestão, como uma compensação para a citotoxicidade gerada pelo estresse oxidativo. A nível molecular, heme induziu a curto prazo o aumento de genes relacionados com a lipoperoxidação e lipogênese: *Ppara* e *Ppar γ* , enquanto que a longo prazo modulou genes envolvidos com a carcinogênese colorretal: aumento de *Myc* e redução de *TP53* (Ijssennagger *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos do consumo estimado de ferro heme na carne vermelha foram realizados. A metanálise de Bastide *et al.* (2011) concluiu que há um risco moderado entre CCR e o alto consumo de ferro heme, no entanto o estudo apresenta limitações apontadas pelos autores, tais como o baixo número de estudos coorte incluídos: cinco; e a mensuração do consumo de ferro heme diferia entre os estudos. O consumo de heme é geralmente avaliado pela aplicação de um fator para o teor total de ferro (0.4), estimando-se um valor total para todas as carnes (Bastide *et al.*, 2011), enquanto Balder *et al.* (2006) estimaram a proporção do heme em diferentes carnes, tais como bife, porco, frango, peixe, etc; com base ao *Dutch Food Composition Database*. Cross *et al.* (2003) demonstrou que a ingestão suplementada de 8mg de ferro heme, proporcional a 50g de patê de fígado, aumentou a concentração de compostos nitrosos nas fezes de pacientes homens de 25 a 74 anos por um período de 15 dias, sugerindo um papel mutagênico ou carcinogênico do ferro heme no cólon em humanos. Por sua vez, Balder *et al.* (2006) indicaram que o consumo de pelo menos 1g/dia de heme poderia estar associado a um risco maior de CCR em homens entre 55 a 69 anos.

1.5 Quimioprevenção da Carcinogênese

Durante décadas, a incidência, morbidade e mortalidade do câncer no mundo permanecem constantes, juntamente com os custos crescentes referentes aos cuidados ou tratamento do câncer. Portanto, há um interesse crescente em estratégias para a prevenção, contudo, desde um ponto de vista global, a prevenção do câncer está entre um dos desafios mais significativos que enfrentam as populações em envelhecimento (Mariotto *et al.*, 2011; Farrelly,

2021). A quimioprevenção é definida como o uso de agentes naturais, sintéticos ou biológicos para reverter, suprimir ou impedir as fases iniciais da carcinogênese ou a progressão de células pré-malignas com potencial invasivo/metastático (Sporn., 1976; De Flora e Ferguson, 2005; Steward e Brown, 2013). A quimioprevenção tem como princípio intervir nas etapas de iniciação, promoção e/ou progressão do tumor/neoplasia. Inúmeros mecanismos potenciais foram descritos, e foram propostas tentativas para classificar os agentes de acordo com os efeitos que eles exercem sobre os diferentes estágios da carcinogênese (De Flora e Ferguson, 2005; Steward e Brown, 2013).

Os compostos que inibem a iniciação ao câncer são tradicionalmente denominados "agentes bloqueadores". Eles podem agir impedindo a interação entre agentes cancerígenos químicos ou radicais livres endógenos e o DNA, reduzindo assim o nível de dano e mutação resultantes que contribuem não apenas para a iniciação da carcinogênese, mas também para a instabilidade genômica progressiva e a transformação neoplásica geral. A proteção pode ser alcançada como consequência da diminuição da captação celular e ativação metabólica de pró-carcinógenos e/ou desintoxicação aprimorada de eletrófilos reativos e eliminação de radicais livres, bem como indução de vias de reparo (Yu e Kong, 2007; Valko *et al.*, 2007). A regulação negativa das respostas inflamatórias crônicas, assim como a produção de ROS e ENOS também podem contribuir para a atenuação da carcinogênese (Stewart e Brown, 2013; Kim, Kacew e Lee, 2016).

Os agentes preventivos podem atenuar a promoção e/ou a progressão das células iniciadas; esses compostos são frequentemente denominados "agentes supressores". Os principais mecanismos relatados que contribuem para essa atividade envolvem a inibição das vias de transdução de sinal de vias pró-inflamatórias, por exemplo, vias que envolvem o NF- κ B para reduzir a promoção tumoral, que de outra forma levariam ao desequilíbrio da proliferação celular, assim como a ativação de vias pró-apoptóticas (De Flora e Ferguson, 2005; Karin, 2006; Stewart e Brown, 2013).

Compostos naturais ou sintéticos foram avaliados para determinação do perfil preventivo em ensaios pré-clínicos quanto clínicos. Como exemplo, a aspirina tem demonstrado potencial anticarcinogênico no cólon pela inibição do desenvolvimento de ACF em ratos F344 Fischer (Wargovich *et al.*, 2000). A aspirina faz parte do grupo de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) com capacidade supressora da COX-2 e subsequente supressão da promoção da carcinogênese (Fernández, Prescott e Burt, 2003). O efeito preventivo da aspirina

in vivo foi observado em em quatro estudos de triagem em pacientes nos quais foram administrados o fármaco, há redução de 10% do risco de desenvolver CCR ascendentes e 32% o câncer retal (Rothwell *et al.*, 2010). Conforme comentado no tópico **1.3.4**, ensaios pré-clínicos são necessários para o delineamento de posteriores estudos clínicos.

Contudo, cautela deve ser tomada sobre os resultados obtidos nestes modelos de carcinogênese colorretal *in vivo*, para se evitar categorização de compostos carcinogênicos ou quimiopreventivos em seres humanos, pois nem o sempre o agente estudado em roedores apresentará os mesmos efeitos em humanos (Bruce, 2003). O β -caroteno, em ensaios clínicos em 14.564 pacientes, não demonstrou efeito protetor contra o CCR, assim como em câncer pulmonar e outros cânceres (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994). Por outro lado, ratos Fisher F344 que receberam por 5 semanas baixas doses de β -caroteno (100 e 200 ppm) apresentaram menor número total de FCA ($74 \pm 6,6$ e $62 \pm 5,4$, respectivamente) em comparação ao grupo controle iniciado com a AOM ($98 \pm 8,2$), porém, em concentrações maiores de β -caroteno (1,000 e 2,000 ppm), o número total de FCA aumentou, indicando que o efeito dose-resposta nem sempre é evidente (Raju *et al.*, 2004).

2. *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.*

2.1 Aspectos Morfológicas e de Consumo Humano da *Arthrospira spp. (Spirulina platensis)*

2.1.1 Origem e Taxonomia

As cianobactérias (*cyanoprokaryotes*) são um dos grupos mais antigos de organismos da Terra, com alguns representantes fósseis com morfologia muito semelhante às espécies atuais (Schopf, 1974; Komárek, 2014). No entanto, é difícil discernir sua história evolutiva longa e complexa simplesmente pela morfologia. Aparentemente surgiram e/ou desapareceram várias vezes durante a evolução das espécies e gêneros modernos (Gugger e Hoffmann, 2004, Schirrmeister *et al.*, 2011).

O gênero *Arthrospira* (*Oscillatoriales, Microcoleaceae*) (Komárek *et al.*, 2014) tornou-se universalmente aceito, de acordo com os taxonomistas. Desde que *Arthrospira* foi relatada pela primeira vez em 1852 por Stizenberger, muitas espécies desse gênero de cianobactérias helicoidais foram descritas e isoladas. No entanto, sua classificação há muito tempo não tem sido bem esclarecida. Geitler (1925) invalidou o gênero *Arthrospira* em sua revisão das Cyanophyceae e incluiu todos os *Oscillatoriales*, no gênero descrito como *Spirulina* (Turpin

1829). A maioria dos autores tinha seguido a descrição de acordo a Geitler por um longo tempo, porém, cada vez mais os pesquisadores observavam que os gêneros *Arthrospira* ou *Spirulina* eram distintos morfologicamente, o que depende de fatores ambientais, como temperatura e pH. As evidências que sustentaram isso foram resumidas por Komárek e Anagnostidis (2005). Inclusive, o nome “*Spirulina platensis*”, produzida e comercializada em larga escala, é muito diferente de acordo com todos os aspectos filogenéticos e critérios citológicos, não pertencendo a esta ordem e devendo ser classificada no gênero *Arthrospira* (Komarek *et al.*, 2014).

Viti *et al.* (1997), utilizando a análise do perfil total de restrição de DNA, realizada em 10 cepas pertencentes a *Arthrospira maxima* (*Spirulina maxima*) e *Arthrospira fusiformis* (*Spirulina platensis*), encontraram um grande consenso entre esses agrupamentos genotípicos e aqueles agrupados segundo critérios morfológicos. Posteriormente, Scheldeman *et al.* (1999), por meio de estudo filogenético empregando a Análise Amplificada de Restrição ao DNA Ribossômico (ARDRA), testaram 51 culturas de *Arthrospira spp.* que teoricamente representavam 37 genótipos únicos obtidos de diferentes coleções de culturas, provenientes de quatro continentes. Os estudos confirmaram uma clara separação entre *Spirulina* e *Arthrospira* e a presença de dois grupos principais de genótipos dentro de *Arthrospira spp.*, que não estavam relacionados quanto à origem geográfica das linhagens, sua denominação ou características fenotípicas.

Em 2002, Manen e Falquet investigaram a diversidade genética de 23 linhagens naturais, cultivadas e comerciais de *Arthrospira spp.*, comparando o gênero com outras 20 linhagens de cianobactérias não pertencentes a *Arthrospira spp.*, utilizando o locus da ficocianina (*cpcB-cpcA*). Esses estudos confirmaram mais uma vez que *Arthrospira* não está relacionado à *Spirulina* e, pela primeira vez, mostraram que o gênero anterior constitui um grupo monofilético fortemente sustentado. Além disso, as três linhagens geneticamente agrupadas, de acordo com as quais *Arthrospira spp.* foram divididas, confirmaram a incompatibilidade geral entre sua origem geográfica e morfologia.

2.1.2 Morfologia e Distribuição

As principais características morfológicas do gênero *Arthrospira* são os arranjos dos tricomas cilíndricos multicelulares em uma hélice aberta à esquerda ao longo de todo o comprimento, cujo diâmetro é relativamente grande, além do arranjo transversal das paredes celulares característicos deste gênero (Figura 9) (Vonshank *et al.*, 1997; Gershwin e Belay,

2008). Em contraste, as microalgas do gênero *Spirulina* apresentam um tricoma em forma de parafuso, com diâmetro uniforme e estreito (0,5–3 mm), sem vacúolos gasosos e com grânulos proeminentes (Gershwin e Belay, 2008; Sili, Torzillo e Vonshank, 2012).

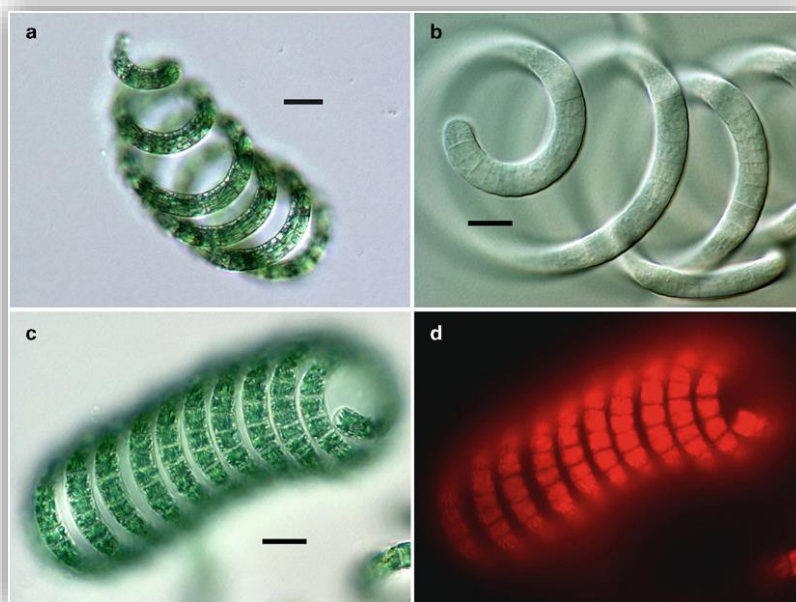


Figura 9 – Visualização microscópica da *Arthrospira fusiformis* (*Spirulina platensis*) isolada do lago Kailala. **a.** *A. fusiformis* cultivada em laboratório **b.** *A. fusiformis* cultivada em laboratório **c.** *A. fusiformis* cultivada em cultura celular **d.** *A. fusiformis* em fluorescência como mostrado em **c.** (Sili, Torzillo e Vonshank, 2012)

A organização celular do gênero *Arthrospira*, observada por microscopia eletrônica, é característico de organismos procarióticos, sendo desprovidos de envelope nuclear, ou carioteca, e exibe uma parede celular característica de bactérias gram-negativas (Van Eykelenburg, 1979; Vonshak *et al.*, 1997).

Com relação as alterações morfológicas relacionadas a luz e temperatura, a intensidade da luz não afeta o tamanho do passo da hélice nem seu diâmetro, enquanto a temperatura influencia ambas as características, é evidente que a ondulação da hélice e o diâmetro da hélice diminuem com o aumento da temperatura, ou seja, tornam-se mais fortemente enrolada com o aumento da temperatura (Van Eykelenburg, 1979; Vonshak *et al.*, 1997). Não há mudanças significativas na espessura da camada de peptidoglicano em *Arthrospira spp.* cultivado em temperaturas variando de 13,5 a 38,5 °C (Figura 10). Com o aumento da temperatura, o tricoma tende a se encurtar. Em baixas temperaturas, filamentos foram observados em 20 mm, enquanto em altas temperaturas (acima de 30 ° C), o comprimento dos filamentos nunca excede alguns milímetros.

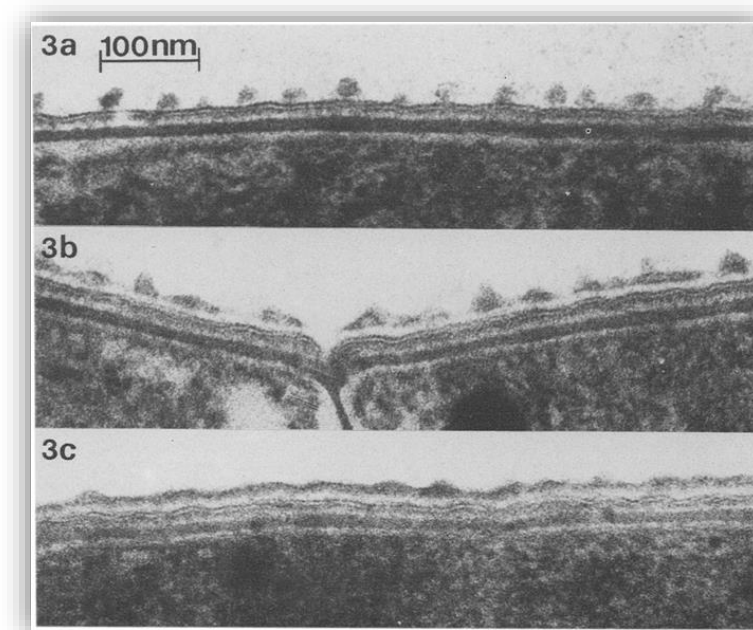


Figura 10– Alteração do comprimento (tricoma) e espessura da parede celular de *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) spp. em diferentes temperaturas (Van Eykelenburg, 1979). **3a.** Parede celular de crescido em 16.5°C. **3b.** *A. (Spirulina platensis) spp.* em 25.0°C. **3c.** O mesmo organismo em 37.0°C.

As espécies de *Arthrospira* foram isoladas principalmente de águas alcalinas e salinas em regiões tropicais e semitropicais (Vonshak *et al.*, 1997; Komárek e Anagnostidis 2005; Gershwin e Belay, 2008). Um dos fatos marcantes sobre os lagos alcalinos é que, apesar da sua aparente condição desfavorável, esses ambientes são extremamente produtivos devido à temperatura ambiente, luz altamente incidente e altas concentrações de CO₂ (Gershwin e Belay, 2008; Sili, Torzillo e Vonshank, 2012). Entre as várias espécies, *A. fusiformis* (*Spirulina platensis*) está amplamente distribuída (*A. platensis* sensu Rich 1931), principalmente na África: Chade, Quênia, Egito, Etiópia; leste: Rússia, Paquistão; e sudeste asiático: Índia, Sri Lanka, Mianmar; e América do Sul: Uruguai, Peru. *A. maxima* está majoritariamente distribuída na América do Norte: México e EUA (Vonshak *et al.*, 1997; Komárek e Anagnostidis, 2005; Gershwin e Belay, 2008).

Cabe salientar, *Arthrospira spp.* podem tolerar níveis muito elevados de pH (acima de 10); luz e salinidade, devido a mecanismos de homeostase celular e o aumento da produção de antioxidantes (Dhiab *et al.*, 2007; Ürek e Tarhan, 2012; Ismaiel *et al.*, 2016). Valores de pH de 9,5 são considerados ótimos para o crescimento de *Arthrospira spp.* (Ismaiel *et al.*, 2016).

2.1.3 Métodos de Extração e Cultivo

A disponibilidade de luz, temperatura e nutrientes são os principais fatores a serem considerados para um crescimento adequado das microalgas do gênero *Arthrospira* (Vonshank e Guy, 1992; Gershwin e Belay, 2008; Vonshank *et al.*, 2014). A determinação da composição do meio de cultivo da *Arthrospira spp.* é necessária a fim de otimizar a produção com valor terapêutico e nutricional (Lafarga, 2019; Papalia *et al.*, 2019).

O nitrogênio é essencial na fotossíntese e no metabolismo do carbono nas cianobactérias, por isso um meio acrescido de nitrogênio é determinante na composição da biomassa, pois apesar da diminuição na concentração de compostos carotenoides e de carboidratos, há um aumento considerável nas concentrações de proteínas e compostos essenciais para as microalgas, tais como as c-ficocianina e clorofila *a* (Turpin, 1991; Gordillo *et al.*, 1998). Por sua vez, a amônia (NH_3) é requerida para o crescimento das cianobactérias, é empregado como um recurso de baixo custo (Rodrigues *et al.*, 2010), contudo, concentrações de amônia acima de 2,5 mM é tóxica para muitos organismos fotossintéticos, inibindo a captação de CO_2 , e, portanto, a fotossíntese (Abeliovich e Azov, 1976), no entanto em pH alcalinos (9,5-10), a *Arthrospira spp.* é mais resistente aos efeitos tóxicos da amônia (Belkin e Boussiba, 1991). Assim, a adição de nitrogênio em forma de nitrato (NO_3) à base de amônia no meio de cultura é necessário para prevenir qualquer efeito danoso à microalga (Rodrigues *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2011).

2.1.4 Comercio e Aplicabilidade

A biomassa produzida dessa cianobactéria é vendida principalmente para o mercado de aditivos alimentares naturais na forma de pó ou em comprimidos/capsulas. Além disso, o produto comercializado é empregado principalmente como corante natural na indústria de cosméticos (Papalia, Sidari & Panuccio, 2019; Lafarga, 2020; Grosshagauer, Kraemer e Somoza, 2020). Assim como foi selecionado pela NASA como um dos principais alimentos para missões espaciais (Tadros, 1993).

Há um grande interesse no uso passado e presente de *Arthrospira spp.* como alimento. Foi descrito como as tribos africanas que vivem ao longo do lago Chade coletam essa alga. A biomassa é colhida nos corpos d'água perto do lago e seca ao sol nas margens para produzir um bolo escuro endurecido chamado “dihé”, dividido em pequenas porções e usado de diferentes formas pelas populações locais como parte de sua alimentação diária (Figura 11) (Ciferri, 1983;

Gerswhin e Belay, 2008; Carcea *et al.*, 2015). Assim como *Arthrospira spp.* também foi encontrada nas águas do lago Texcoco, no México (Ciferri, 1983; Gerswhin e Belay, 2008; Sili, Torzillo e Vonshank, 2012). Nessa região, tinha sido usado como alimento pelos nativos que residiam na área. Expedicionários espanhóis no México durante o século XVI descreveram como os astecas usavam uma massa macia, verde-azulada, colhida com redes finas do lago, para produzir uma variante de pão chamado “tecuitlatl” (Ciferri 1983). Posteriormente, a *Arthrospira spp.* chamou a atenção do *Institute Française du Pétrole* sobre florações de cianobactérias nas lagoas de evaporação da instalação industrial de produção de refrigerante no lago Texcoco, perto da Cidade do México, levando ao primeiro estudo detalhado dos requisitos de crescimento e fisiologia da *Arthrospira spp.* (Ciferri, 1983; Sili, Torzillo e Vonshank, 2012). A pesquisa de Zarrouk (1966) foi a base para o estabelecimento do crescimento em grande escala da biomassa de *Arthrospira spp.*

Para fins de comercialização, os processos de armazenamento e distribuição de *Arthrospira spp.* são importantes passos a serem considerados para a preservação do produto, mantendo suas propriedades nutricionais e funcionais (Papalia, Sidari e Panuccio, 2019; Lafarga, 2020; Grosshagauer, Kraemer e Somoza, 2020). Além da biomassa fresca, a maioria dos produtos da *Arthrospira spp.* estão principalmente compostos na forma seca, tais como comprimidos, cápsulas e também como extratos ou processados em massas, biscoitos e outros produtos alimentares funcionais (Papalia, Sidari e Panuccio, 2019; Lafarga, 2020).

Para processar *Arthrospira spp.*, a secagem em estufa é um dos métodos convencionais mais usados, mas a perda de água e a temperatura durante o processo de secagem podem danificar as moléculas sensíveis ao calor e reduzem o número e a qualidade dos compostos em comparação com o produto original (Ratti, 2001). A liofilização é uma técnica que resulta em produtos desidratados de melhor qualidade, preservando a matéria-prima de choques térmicos. As baixas temperaturas necessárias e o estado sólido da água durante a liofilização protegem a estrutura das proteínas, porém é frequentemente considerado um processo de secagem demorado e de alto-custo (Ratti, 2001; Papalia, Sidari e Panuccio, 2019).



Figura 11 – Coleta da *Arthrospira fusiformis* e preparação do “dihé”

(Sili, Torzillo e Vonshank, 2012)

No entanto, a liofilização pode levar a diminuição das propriedades antioxidantes causada pela degradação de certos bioativos (Rahman *et al.*, 2015; Papalia, Sidari e Panuccio, 2019). Outro método é o congelamento em -30 a -40°C, cujo intuito é evitar o extravasamento de solutos pelo rompimento da membrana celular causada pela hipertonidade celular, contudo, este método reduz a capacidade antioxidante medida pelo DPPH. Portanto, não existe métodos de conservação e estocagem ideais, e dependerá com que fim será empregada a biomassa, seja na indústria alimentar ou na área médica (Papalia, Sidari e Panuccio, 2019).

2.1.5 Consumo e Contaminação

O crescente interesse pela *Arthrospira spp.* é dado ao seu alto teor de proteína, bem como a presença de vitamina B12 e outros micronutrientes (Lafarga, 2020; Grosshagauer, Kraemer e Somoza, 2020). Assim como todas as cianobactérias, *Arthrospira spp.* tem alta digestibilidade devido à falta de celulose em sua parede celular, o que facilita o seu consumo humano (Tomaselli, 2004).

No entanto, o consumo e comercialização de *Arthrospira spp.* podem ser afetados pela poluição durante o seu desenvolvimento e produção no ecossistema marinho visto que, como em outras cianobactérias, é capaz de absorver e acumular metais tóxicos, ligando-os a suas proteínas, polissacarídeos e grupos amino (Sayadi *et al.*, 2019). O acúmulo de oligoelementos

como B, Ba, Li, Ni, Sr e V e metais tóxicos como Al, Cd e Pb foram relatados (Rúbio *et al.*, 2017; Paz *et al.*, 2019, Rúbio *et al.*, 2020).

A presença das toxinas é possível ou pela ação da própria *Arthrospira spp.* ou por outras microalgas (Ballot *et al.*, 2004). As cianobactérias produzem metabólitos e alguns gêneros têm o potencial de produzir toxinas, tais como as microcistinas, nodularinas, saxitoxinas, anatoxina *smf*, dentre outras (Jiang *et al.*, 2008; Rellán *et al.*, 2008; Roy-Lachapelle *et al.*, 2017). Anatoxina A, um potencial agonista receptor da acetilcolina causa paralisia, espasmos musculares e dificuldades respiratórias. LD50 em camundongos é de 200-250 µg/kg quando administrado intraperitonealmente (Devlin *et al.*, 1977; Rogers *et al.*, 2005). A contaminação em produtos de *Arthrospira spp.* ocorre pela presença de outras cianobactérias indesejadas, principalmente em ambientes não controlados e de baixo monitoramento, como nas lagoas ou lagos (Rogers *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008; Rellán *et al.*, 2008; Roy-Lachapelle *et al.*, 2017).

2.2 Aspectos Nutricionais e Funcionais da *Arthrospira spp.*

2.2.1 Composição da *Arthrospira spp.* – Perfil de Macro e Micronutrientes

Produtos extraídos *Arthrospira spp.* compõe-se nutricionalmente de 64-74% de proteínas, 9-14% de lipídios e 12-20% de carboidratos, valores totalmente dependentes dos métodos de extração e cultivo (Ciferri, 1983; Rosa *et al.*, 2015; Lafarga *et al.*, 2019; Grosshagauer, Kraemer e Somoza, 2020) Alguns dos lipídios mais comuns encontrados na *Arthrospira spp.* incluem ácido γ -linolênico (18: 3, n-6) e ácido palmítico (16: 0), (Morist *et al.*, 2001; Ljubic *et al.*, 2018). β -caroteno é comumente presente na biomassa da *Arthrospira spp.* cuja concentração varia entre 33,5 e 231,6 mg/100 g (Carcea *et al.*, 2015).

Devido a sua alta concentração protéica, bem como um alto teor de aminoácidos essenciais, produtos derivados de *Arthrospira spp.* têm sido recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ciferri, 1983; Ortega-Calvo *et al.*, 1993; Morist *et al.*, 2001). As proteínas mais relevantes encontradas em *Arthrospira spp.* são as ficobiliproteínas, sendo a mais representativa a C-ficocianina (C-FC) (Eriksen, 2008; Kuddus *et al.*, 2013).

2.2.2 C-FC – Estrutura e Mecanismos anticarcinogênicos em ensaios *in vitro* e *in vivo*

C-FC é uma proteína de pigmentação azul presente nas cianobactérias, principalmente a *Arthrospira spp.*, constituindo 20% do peso seco, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Finamore *et al.*, 2017). C-FC é composto por duas subunidades relativamente homólogas: a cadeia α com uma ficocianobilina ligada à cisteína 84 e a cadeia β com duas ficocianobilinas acopladas nas cisteínas 84 e 155 (Duerring *et al.*, 1991; Eriksen, 2008). Além da C-FC, existem outras ficocianinas, como a R-ficocianina (RPC) e a aloficocianina. Assim como a C-FC com pigmentação fluorescente azul-esverdeada, existe a ficoeritrina, cujo pigmento é avermelhado (Eriksen, 2008; Kuddus *et al.*, 2013)

Estudos *in vitro* têm mostrado propriedades anticarcinogênicas da C-FC isolada da *Arthrospira spp.* C-FC na concentração de 20 μ M induziu apoptose em células de leucemia mielóide crônica humana, com a observação de retração do citoplasma, formação de bolhas na membrana e condensação cromatínica, picnose e fragmentação nuclear. A apoptose induzida por C-FC em macrófagos RAW 264,7 parece ser mediado pela liberação do citocromo c das mitocôndrias e independente da expressão de Bcl-2. Esses efeitos da C-FC podem ser devidos a níveis reduzidos de PGE2 como resultado da inibição da COX-2 (Reddy *et al.*, 2003). A apoptose de células K562 causado pela C-FC pode estar relacionada com a liberação do citocromo c, clivagem e inativação de poli-ADP-ribose polimerase (PARP) pelas caspases, e regulação negativa de Bcl-2. Análise por FACS mostrou o aumento de células apoptóticas hipodiploides e a diminuição de células na fase S e G2 do ciclo celular, o que pressupõe a possibilidade de apoptose induzida pela C-FC ocorrer nestas fases. Estes efeitos foram mais evidentes em 50 μ M de C-FC. (Subhashini *et al.*, 2004). C-FC proveniente de *Oscillatoria tenuis* mostrou atividade antioxidante, antiproliferativa e de indução de apoptose em linhagens de células de adenocarcinomas: HT-29 (cólon) e A549 (pulmão), como demonstrado por maior liberação de lactato desidrogenase (LDH) devido à citotoxicidade induzida por C-FC. O efeito apoptótico pode estar associado à modulação do ciclo celular, com maior proporção de células em fase G0 / G1 do que as células sem tratamento, sendo que a morfologia das células tratadas com C-FC apresentava características típicas de células em apoptose (Thangam *et al.*, 2013).

Os efeitos do C-FC na carcinogênese colorretal em modelo animal foram avaliados. A administração oral de C-FC reduziu a expressão de COX-2 na mucosa do cólon em ratos iniciados com DMH, e em comparação ao piroxicam, um anti-inflamatório não esteroideal

(AINE). Subsequentemente, a expressão da prostaglandina PGE₂, sintetizada pela COX-2, foi reduzida com o tratamento com a C-FC (Saini *et al*, 2012). Tanto a piroxicam como a C-FC inibiram a via de PI3-K / Akt, estimulando o *feedback positivo* de PTEN e GSK3 β , resultando no efeito pró-apoptótico nas células iniciadas (Saini e Sanyal *et al*, 2012). Além disso, foi relatado que C-FC foi capaz de estimular a apoptose pela expressão aumentada de calpain-9 e Ppar γ , além da estimulação do *feedback negativo* da sinalização Wnt/ β -catenina na mucosa do cólon, e, por sua vez, atenuando a carcinogênese colorretal em ratos (Saini e Sanyal, 2014).

2.2.3 Efeitos *in vitro* de *Arthrospira (Spirulina platensis)* spp. em linhagens de adenocarcinoma de cólon

Estudos *in vitro* avaliaram os efeitos da *Arthrospira spp.* em modelos de carcinogênese. Smieszek *et al.* (2017) encontrou que o filtrado desta microalga apresenta efeitos anticarcinogênicos em células de cólon Caco-2. Reduziram a proliferação e atividade metabólica em 72 horas, diminuíram a expressão gênica de marcadores envolvidos na tumorigênese: metaloproteinase-7 (MMP-7); survivina; e c-myc, e a secreção de Wnt-10 β . Além disso, estimularam a apoptose pela alteração do potencial de membrana das mitocôndrias e o aumento a razão de Bax/Bcl-2, eventos que podem estar relacionados pela indução do estresse oxidativo nestas células.

2.2.4 Efeitos de *Arthrospira (Spirulina platensis)* spp. SP na carcinogênese experimental *in vivo*

SP foi classificada como alimento funcional com propriedades anticarcinogênicas detectadas em diversos bioensaios *in vivo* (Yogianti *et al.*, 2014; Ouhtit *et al.*, 2014; Mahmoud *et al.*, 2021). SP demonstrou um efeito protetor contra tumores cutâneos induzidos por exposição crônica de UVB no fenótipo selvagem e inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , Cxcl1; e receptor tipo Toll 4 (TLR4) nos grupos Ogg1-KO (Yogianti *et al.*, 2014). SP a 1% na dieta resultou em menor incidência de tumor e índices de marcação positiva para receptor de estrogênio alfa (ER α) e Ki-67 na carcinogênese mamária induzida por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) em ratas Sprague-Dawley (Ouhtit *et al.*, 2014). Em modelo de HCC de camundongo induzido por (DEN) e CCL4, SP liofilizado (250 e 500 mg / kg de peso corporal), administrada por gavagem durante as semanas 25-28 de indução do tumor, reduziu o número e o tamanho de nódulos hepáticos macroscópicos e biomarcadores tumorais séricos, como alfa fetoproteína (AFP), MDA e capacidade antioxidante total (TAC), assim

como aumentou a estimativa de sobrevivência nos animais (Mahmoud *et al.*, 2021). Contudo, o papel da *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) *spp.* nas etapas de promoção/progressão da carcinogênese colorretal a nível histopatológico e molecular está a ser elucidado.

3.1 Justificativa e hipótese

O CCR esporádico é altamente incidente e mortal a nível global. O alto consumo de carne vermelha e processada está associada ao risco de desenvolver este câncer, principalmente pela presença da porfirina hemin. A microalga *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) *spp.* (SP) é um candidato agente preventivo dado os seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes testados em ensaios *in vivo*.

Diante dos potenciais efeitos biológicos, o consumo da dieta contendo 2 % SP poderia atenuar o efeito promotor da carcinogênese pela porfirina heme em modelo *in vivo* induzido quimicamente.

3.2 Objetivo Geral

Portanto, nós avaliamos os efeitos da ingestão de 2% SP na carcinogênese colorretal promovida por hemin em ratos Sprague-Dawley induzidos por DMH. Aqui, investigamos o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do cólon e a análise gênica das principais alterações envolvidas na carcinogênese de cólon.

3.3 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito da ingestão de 2% SP associada ao heme sobre o número médio de lesões preneoplásicas: FCAs, e a incidência e multiplicidade de tumores colônicos.
- 2) Avaliar o efeito da ingestão de 2% SP associada ao heme sobre o perfil gênico na mucosa colônica.
- 3) Avaliar o efeito de hemin e 2% SP no perfil de produção de mucinas na região do cólon distal.

4. Referências

Abeliovich A, Azov Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976; 31: 801–06.

Afrin S, Giampieri F, Gasparini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodriguez P, et al. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology Advances*. 2020; 38: 107322.

Alaejos MS, Afonso AM. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011; 10: 52-108.

Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*. 1994; 330: 1029–35.

Anderson JC, Swede H, Rustagi T, Protiva P, Pleau D, Brenner BM, et al. Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy. *Cancer Causes & Control: CCC*. 2012; 23: 355–61.

Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*. 2012; 5: 19–27.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017; 66: 683–91.

Arthur-Ataam J, Bideaux P, Charrabi A, Sicard P, Fromy B, Liu K, et al. Dietary supplementation with silicon-enriched *spirulina* improves arterial remodeling and function in hypertensive rats. *Nutrients*. 2019; 11: 2574.

Aune D, Chan DS, Vieira AR, Navarro RDA, Vieira R, Greenwood DC, et al. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes & Control: CCC*. 2013; 24: 611–27.

Aydinlik H, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A, Schwarz M. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene*. 2001; 20: 7812-6.

Baijal PK, Fitzpatrick DW, Bird RP. Comparative effects of secondary bile acids, deoxycholic and lithocholic acids, on aberrant crypt foci growth in the postinitiation phases of colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*. 1998; 31: 81–9.

Bailey CE, Hu CY, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surgery*. 2015; 150: 17-22.

Bakhoun SF, Swanton C. Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014; 4: 161.

Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer. *Molecular Oncology*. 2013; 7: 206-23.

Balder HF, Vogel J, Jansen MC, Weijenberg MP, van den Brandt PA, Westenbrink S, et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006; 15: 717–25.

Ballot A, Dadheech PK, Krienitz L. Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies. *Algological Studies*, 2004; 113: 37–56.

Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prevention Research*. 2011; 4: 177-84.

Bastide NM, Chenni F, Audebert M, Santarelli RL, Taché S, Naud N, et al. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Research*. 2015; 75: 870–9.

Belkin S, Boussiba S. High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*. 1991; 38: 167–9.

Bird, RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. *Cancer Pathogenesis Letters*. 1987; 37: 147-51.

Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicological Letters*. 2000; 112-113: 395–402.

Boland CR., Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*. 1998; 58: 5248–57.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System (eds). Hamilton SR, Aaltonen, LA, Lyon: IARC Press; 2000: p.134-46.

Botteri E, Borroni E, Sloan EK, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, et al. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2020; 115: 1940–9.

Boudreau MD, Mellick PW, Olson GR, Felton RP, Thorn BT, Beland FA. Clear evidence of carcinogenic activity by a whole-leaf extract of *Aloe barbadensis* miller (aloe vera) in F344/N rats. *Toxicological Sciences*. 2013; 131: 26–39.

Bouzourene H, Chaubert P, Seelentag W, Bosman FT, Saraga E. Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and non-neoplastic colonic disease. *Human Pathology*. 1999; 30: 66–71.

Brenner H, Hoffmeister M, Arndt V, Haug U. Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *British Journal of Cancer*. 2007; 96, 828–31.

Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Annals of Internal Medicine*. 2011; 154:22-30.

Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ*. 2014; 348: g2467.

Bruce WR. Counterpoint: From animal models to prevention of colon cancer. Criteria for proceeding from preclinical studies and choice of models for prevention studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003; 12: 401–4.

Brulé SY, Jonker DJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, Moore MJ, Wong R, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *European Journal of Cancer*. 2015; 51: 1405–14.

Buchmann A, Mahr J, Bauer-Hofmann R, Schwarz M. Mutations at codon 61 of the Ha-ras proto-oncogene in precancerous liver lesions of the B6C3F1 mouse. *Molecular Carcinogenesis*. 1989; 2:121-5.

Burt RW, Cannon JA, David DS, Early DS, Ford JM, Giardiello FM, et al. National Comprehensive Cancer Network. Colorectal cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. 2013; 11:1538–75.

Cameron IL, Garza J, Hardman WE. Distribution of lymphoid nodules, aberrant crypt foci and tumours in the colon of carcinogen-treated rats. *British Journal of Cancer*. 1996; 73: 893–8.

Cancer. Geneva: World Health Organization. c2021 – [citado dia 17 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Carcea M, Sorto M, Batello C, Narducci V, Aguzzi A, Azzini E, et al. Nutritional characterization of traditional and improved dihé, alimentary blue-green algae from the lake Chad region in Africa. *LWT - Food Science and Technology*, 2015; 62: 753–63.

Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149: 1177–90 e3.

Carpenter CE, Mahoney AW. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992; 31, 333–67.

Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009; 18: 1688–94.

Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *The American Journal of Pathology*. 2002; 160: 1823–30.

Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One*. 2011; 6, e20456.

Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2003; 9: 2642–9.

Cheung AF, Carter AM, Kostova KK, Woodruff JF, Crowley D, Bronson RT, et al. Complete deletion of *Apc* results in severe polyposis in mice. *Oncogene*. 2010; 29: 1857–64.

Cho NL, Redston M, Zauber AG, Carothers AM, Hornick J, Wilton A, *et al.* Aberrant crypt foci in the adenoma prevention with celecoxib trial. *Cancer Prevention Research*. 2008; 1:21–31.

Choi JW, Kim P, Kim JK, Kim YR, Fukumura D, Yun SH. Longitudinal Tracing of Spontaneous Regression and Anti-angiogenic Response of Individual Microadenomas during Colon Tumorigenesis. *Theranostics*. 2015; 5: 724–32.

Ciferri, O. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*. 1983; 47:551-78.

Clapper ML, Chang WL, Cooper HS. Dysplastic Aberrant Crypt Foci: Biomarkers of Early Colorectal Neoplasia and Response to Preventive Intervention. *Cancer Prevention Research*. 2020; 13: 229–40.

Colorectal Cancer Screening. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. NIH.gov. 2021 [Acessado em 7 de julho de 2021] Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65825/>

Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *International Journal of Oncology*. 2013; 43: 973–84.

Corpet DE, Taché S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutrition and Cancer*. 2002; 43: 1–21.

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. *European Journal of Cancer*. 2005; 41: 1911–22.

Correia MA, Sinclair PR., De Matteis F. Cytochrome P450 regulation: the interplay between its heme and apoprotein moieties in synthesis, assembly, repair, and disposal. *Drug Metabolism Reviews*. 2011; 43: 1–26.

Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Research*. 2003; 63: 2358–60.

Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Research*. 2010; 70: 2406–14.

De Flora S, Ferguson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*. 2005; 591: 8–15.

Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, White JR, Mark Welch JL, Rossetti BJ, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111:18321-6.

Deming DA, Leystra AA, Nettekoven L, Sievers C, Miller D, Middlebrooks M, et al. PIK3CA and APC Mutations are Synergistic in the Development of Intestinal Cancers. *Oncogene*. 2014; 33: 2245–54.

Dermadi D, Valo S, Ollila S, Soliymani R., Sipari N, Pussila M, et al. Western Diet Deregulates Bile Acid Homeostasis, Cell Proliferation, and Tumorigenesis in Colon. *Cancer Research*. 2017; 77: 3352–63.

Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Stavric B, et al. Anatoxina, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry*. 1977; 55: 1367–71.

Dhiab RB, Ouada HB, Boussetta H, Franck F, Elabed A, Brouers M. Growth, fluorescence, photosynthetic O₂ production and pigment content of salt adapted cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 2007; 19: 293–301.

Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*. 1997; 30: 328–34.

Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, et al. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell*. 2015; 161: 1539–52.

Drewes JL, Housseau F, Sears CL. Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British Journal of Cancer*. 2016; 115: 273–80.

Duerring M, Schmidt GB, Huber R. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1991; 217: 577–92.

Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman, F. Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1991; 11: 5487–96.

Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene*. 2002; 21: 3253–7.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 4: 526–35.

Eriksen NT. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 80: 1–14.

Farrelly C. 50 years of the “war on cancer”: lessons for public health and geroscience. *GeroScience*. 2021; 43:1229–35.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759–67.

Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011; 6:479–507.

Femia AP, Caderni G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*. 2008; 74: 1602–7.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicologic Pathology*. 1999; 27: 632–42.

Finamore A, Palmery M, Bensehaila S, Peluso I. Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly *Spirulina*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 3247528.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2012; 3:153-73.

Gattermann N, Retzlaff S, Wang YL, Hofhaus G, Heinisch J, Aul C, et al. Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood*. 1997; 90: 4961–72.

Geitler L. Cyanophyceae. In: Pascher A (12). Jena: G Fisher-Verlag Süßwasser flora; 1925. p.481

Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *Journal of Surgical Oncology*. 2004; 88: 261–6.

Gershwin ME, Belay A. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRC Press, 2008.

Gordillo FJL, Jiménez C, Figueroa FL, Niell FX. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). *Journal of Applied Phycology*. 1998; 10: 461–9.

Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*. 2003; 124: 1574–94.

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008; 135: 1079–99.

Graff RE, Möller S, Passarelli MN, Witte JS, Skytthe A, Christensen K, et al. Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 15: 1256–64.

Grosshagauer S, Kraemer K, Somoza V. The True Value of Spirulina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020; 68:4109-15.

Gugger MF, Hoffmann L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54: 349-57.

Gupta, B., Das, P., Ghosh, S., Manhas, J., Sen, S., Pal, S., Sahni, P., Upadhyay, A. D., Panda, S. K., Gupta, S. D. Identification of High-Risk Aberrant Crypt Foci and Mucin-Depleted Foci in the Human Colon With Study of Colon Cancer Stem Cell Markers. *Clinical colorectal cancer*, 2017. 16, 204–213.

Hamilton B, Hofbauer R, Ruis H. Translational control of catalase synthesis by hemin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*. 1982; 79: 7609–13.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12:31–46.

Hardman WE, Cameron IL, Heitman DW, Contreras E. Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. *Cancer Research*, 51(23 Pt 1), 1991; 6388–92.

Heyer J, Kwong LN, Lowe SW, Chin L. Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 470–80.

Hoevenaer WHM, Janssen A, Quirindongo AI, Ma H, Klaasen SJ, Teixeira A. Degree and site of chromosomal instability define its oncogenic potential. *Nature Communications*. 2020; 11:1501

Howe G, Merchant S. Role of heme in the biosynthesis of cytochrome c6. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 5824–32.

Hörtner H, Ammerer G, Hartter E, Hamilton B, Rytka J, Bilinski T, et al. Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *European Journal of Biochemistry*. 1982; 128: 179–84.

Hurlstone DP, Cross SS. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopic colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005; 20: 173–81.

Ibrahim ML, Klement JD, Lu C, Redd PS, Xiao W, Yang D, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Produce IL-10 to Elicit DNMT3B-Dependent IRF8 Silencing to Promote Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Cell Reports*, 2018; 25:3036–46.e6.

Ijssennagger N, Rijnierse A, de Wit NJ, Boekschoten MV, Dekker J, Schonewille A, et al. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis*. 2013; 34:1628-35.

Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*. 2001; 98: 1847–52.

Imamura F, Micha R, Khatibzadeh S, Fahimi S, Shi P, Powles J, et al. Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment. *The Lancet. Global health*. 2015; 3: 132–142.

International Agency for Research on Cancer. Consumption of red meat and processed meat. IARC Working Group, Lyon. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2015; 114: 6–13

Ismaiel MMS, El-Ayouty YM, Piercey-Normorea M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Brazilian Journal of Microbiology. 2016; 47: 298–304.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004; 287: 7–17.

Jackson PE, Cooper DP, O'Connor PJ, Povey AC. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumors: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. Carcinogenesis. 1999; 20: 509–13.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology. 2010; 138: 2044–58.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological, and molecular features. Histopathology. 2007; 50: 113–130.

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW 1994;. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. Cancer Research. 1994; 54: 5523–6.

Jenkinson F, Steele RJC. Colorectal cancer screening – Methodology. 2010; 8: 164–71.

Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2012; 10: 639–45.

Jia M, Jansen L, Walter V, Tagscherer K, Roth W, Herpel E, et al. No association of CpG island methylator phenotype and colorectal cancer survival: population-based study. British Journal of Cancer. 2016; 115: 1359–66.

Jiang Y, Xie P, Chen J, Liang G. Detection of the hepatotoxic microcystins in 36 kinds of cyanobacteria *Spirulina* food products in China. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 2008; 25: 885–94.

Johnson RL, Fleet JC. Animal models of colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Review*. 2012; 32:39–61.

Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control*. 2013; 24: 1207–22.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9: 239–52.

Ju H, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, et al. Distinct Profiles of Epigenetic Evolution between Colorectal Cancers with and without Metastasis. *Tumorigenesis and Neoplastic Progression. The American Journal of Pathology*. 2011; 178: 1835-46

Karastergiou K, Smith SR, Greenberg AS, Fried SK. Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. *Biology of Sex Differences*. 2012; 3: 3-13.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006; 441:431–6.

Kedrin D, Gala MK. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2015; 9; 6: e84.

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019; 16: 713-32.

Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochimica et biophysica acta*. 2011; 1813; 668–82.

Kim HS, Kacew S, Lee BM. Genetic and epigenetic cancer chemoprevention on molecular targets during multistage carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 2016; 90: 2389–404.

Kimura I, Nakayama Y, Yamauchi H, Konishi M, Miyake A, Mori M, et al. Neurotrophic activity of neudesin, a novel extracellular heme-binding protein, is dependent on the binding of heme to its cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 4323–31.

Koh Y, Ho C, Pan M. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2020; 28: 14-37.

Komárek J, Anagnostidis K . Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. – In: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M. Süßwasserflora von Mitteleuropa (19/2), Heidelberg: Elsevier/Spektrum;: 2005 p.759

Komárek J, Kastovsky J, Mares J, Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia*. 2014; 86: 295–335.

Kowalczyk M, Siermontowski P, Mucha D, Ambroży T, Orłowski M, Zinkiewicz K, et al. Chromoendoscopy with a Standard-Resolution Colonoscope for Evaluation of Rectal Aberrant Crypt Foci. *PloS One*, 2016; 11: e0148286.

Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed Research International*. 2013; 742859, 9 pp.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2021. Chapter 7, Neoplasia – Nomenclature; p.268

Lafarga T. Cultured Microalgae and Compounds Derived Thereof for Food Applications: Strain Selection and Cultivation, Drying, and Processing Strategies. *Food Reviews International*. 2019; 36: 559-83.

Lafarga T, Fernández-Sevilla JM, González-López C, Acién-Fernández FG. Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*. 2020; 137: 109356.

Lance P, Hamilton SR. Sporadic aberrant crypt foci are not a surrogate endpoint for colorectal adenoma prevention. *Cancer prevention research*. 2008; 1: 4–8.

Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*. 2006; 119: 2657–64.

Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010; 138, 2088–100.

Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. 2016; 7803846, 14 pp.

Ljubic A, Safafar H, Holdt SL, et al. Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. *Journal of Applied Phycology*. 2018; 30: 943–54.

Luo L, Shen GQ, Stiffler KA, Wang QK, Pretlow TG, Pretlow TP. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis*. 2006; 27:1153–9.

Ma, H., Brosens, L., Offerhaus, G., Giardiello, F. M., de Leng, W., Montgomery, E. A. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*. 2018; 50: 49–59.

Magnuson BA, Carr I, Bird RP. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Research*. 1993; 53: 4499–504.

Mahmoud YI, Shehata A, Fares NH, Mahmoud AA. Spirulina inhibits hepatocellular carcinoma through activating p53 and apoptosis and suppressing oxidative stress and angiogenesis. *Life Sciences*. 2021; 265: 118827.

Manen JF, Falquet J. The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52 (Pt 3): 861–7.

Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011; 103:117-128.

Masterson J, O'Dea S. Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. *Cells, Tissues, Organs*. 2007; 185: 175–179.

McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*. 2017; 7: 1–12.

Meyer UA. Endo-xenobiotic crosstalk and the regulation of cytochromes P450. *Drug Metabolism Reviews*. 2007; 39, 639–46.

Miller EA, Pinsky PF, Schoen RE, Prorok PC, Church TR. Effect of flexible sigmoidoscopy screening on colorectal cancer incidence and mortality: long-term follow-up of the randomised US PLCO cancer screening trial. *Lancet Gastroenterology Hepatology*. 2019; 4:101-10.

Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Soneson C, Budinska, E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Annals of Oncology*. 2014; 25:1995–2001.

Moore MA, Nakagawa K, Satoh K, Ishikawa T, Sato K. Single GST-P positive liver cells — putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis*. 1987; 8:483-6

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

Morist A, Montesinos J, Cusidó J, Gòdia F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*. 2001; 37: 535–47.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*. 1990; 247: 322–4.

Murphy CC, Singal AG. Establishing a research agenda for early-onset colorectal cancer. *PLOS Medicine*. 2018; 15: e1002577

Murphy CC, Baron JA. Colorectal Cancer in Older Ages: What's Ahead? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 15: 901–2.

Nagtegaal ID, Arends MJ, Odze RD, Lam AK. Tumours of the colon and rectum In WHO classification of tumours of the digestive system. International Agency for Research on Cancer. 5th ed. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. Lyon: IARC Press, 2019; p.158-91.

Nauseef WM, McCormick S, Yi, H. Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood*. 1992; 80: 2622–33.

Nawa T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008; 23: 418–23.

Newmark HL, Yang K, Lipkin M, Kopelovich L, Liu Y, Fan K, et al. A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis*. 2001; 22: 1871–5.

Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, Lipkin M. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 88–92.

Nelson S, Näthke IS. Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. *Journal of Cell Science*. 2013; 126: 873–7.

Neves Jorge JM, Habr-Gama A. Anorectal anatomy and physiology In: Beck DE, Wexner SD, editors. *Fundamentals of anorectal surgery* 2nd edition. London: WB Saunders; 1998; 1–24.

Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J Toxicol Pathol*. 2016; 29(1 Suppl):1S-125S.

Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005; 97: 906–16.

Oba S, Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, et al. The relationship between the consumption of meat, fat, and coffee and the risk of colon cancer: a prospective study in Japan. *Cancer Letters*, 2006; 244: 260–7.

Ohta H, Kimura I, Konishi M, Itoh N. Neudesin as a unique secreted protein with multi-functional roles in neural functions, energy metabolism, and tumorigenesis. *Frontiers in Molecular Biosciences*: 2015; 2: 24.

Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 2015; 149, 1204–25.e12.

Onoue, M., Kado, S., Sakaitani, Y., Uchida, K., Morotomi, M. Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer letters*, 113, 1997; 179–86. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(97\)04698-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(97)04698-3)

Ortega-Calvo JJ, Mazuelos C, Hermosin B, Saiz-Jimenez C. Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology*. 1993; 5: 425–35.

Otori K, Sugiyama K, Hasebe T, Fukushima S, Esumi H. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with a concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Research*. 1995; 55: 4743–6.

Otori K, Konishi M, Sugiyama K, Hasebe T, Shimoda T, Kikuchi-Yanoshita R, et al. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*. 1998; 83: 896–900.

Ouhtit A, Ismail MF, Othman A, Fernando A, Abdraboh ME, El-Kott AF, et al. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Spirulina*. *The American Journal of Pathology*. 2014; 184: 296–303.

Pandiri AR, Sills RC, Hoenerhoff MJ, Peddada SD, Ton TV, Hong HH, et al. Aloe vera non-decolorized whole leaf extract-induced large intestinal tumors in F344 rats share similar molecular pathways with human sporadic colorectal tumors. *Toxicologic Pathology*. 2011; 39: 1065–74.

Papalia T, Sidari R, Panuccio MR. Impact of Different Storage Methods on Bioactive Compounds in *Arthrospira platensis* Biomass. *Molecules*. 2019; 24: 2810.

Paulsen JE, Namork E, Steffensen IL, Eide TJ, Alexander J. Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of Min mice--a murine model of familial adenomatous polyposis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2000; 35: 534–9.

Paulsen JE, Løberg EM, Olstørn HB, Knutsen H, Steffensen IL, Alexander J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. *Cancer Research*. 2005; 65: 121–9.

Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Gastrointestinal Physiology and Diseases*, 2016; 297–307.

Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010; 140: 197–208.

Paz S, Rubio C, Frías I, Gutiérrez ÁJ, González-Weller D, Martín V, Revert C, et al. Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere*. 2019; 218: 879–84.

Perše M, Cera A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011; 2011: 473964.

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2059–72.

Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB Journal*. 1991; 5:2280-6.

Pitot HC, Dragan YP, Sargent L, Haas M. Review article: the stages of gastrointestinal carcinogenesis--application of rodent models to human disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2000;14: 153-60.

Ponka P. Cell biology of heme. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1999; 318: 241–56.

Popkin BM. The Nutrition Transition in Low-Income Countries: An Emerging Crisis. *Nutrition Reviews*. 1994; 52: 285-98

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, Ashton VVS, Riordan MAO, Pretlow TG, et al. Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic. *Cancer Research*. 1991; 1564–7.

Pretlow TP. Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology*. 1995; 108: 600–3.

Rahman MM, Das R, Hoque MM, Zzaman W. Effect of freeze drying on antioxidant activity and phenolic contents of Mango (*Mangifera indica*). *International Food Research Journal*. 2015; 22: 613-7.

Raju J, Swamy MV, Cooma I, Patlolla JM, Pittman B, Reddy BS, et al. Low doses of beta-carotene and lutein inhibit AOM-induced rat colonic ACF formation but high doses augment ACF incidence. *International Journal of Cancer*. 2005; 113: 798–802.

Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*. 2001; 49: 311-9.

Reddy MC, Subhashini J, Mahipal SVK et al. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 304: 385–92.

Rellán S, Osswald J, Saker M, Gago-Martinez A, Vasconcelos V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47: 2189–95.

Rex DK, Cummings OW, Helper DJ, Nowak TV, McGill JM, Chiao GZ, et al. 5-year incidence of adenomas after negative colonoscopy in asymptomatic average-risk persons. *Gastroenterology*. 1996; 111: 1178–81.

Rizzo A, Di Giovangiulio M, Stolfi C, Franzè E, Fehling HJ, Carsetti R, et al. ROR γ t-Expressing *Tregs* Drive the Growth of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Controlling IL6 in Dendritic Cells. *Cancer Immunology Research*. 2018; 6: 1082–92.

Robinson NB, Krieger K, Khan FM, Huffman W, Chang M, Naik A, et al. The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*. 2019; 72: 9–13.

Rodrigues MA, Silva LA, Salvadori DM, De Camargo JL, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:351-5.

Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 4491–8.

Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresource Technology*. 2011; 102: 6587–92.

Rogers EH, Hunter ES, Moser VC, Phillips PM, Herkovits J, Muñoz L, et al. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *Journal of Applied Toxicology: JAT*. 2005; 25: 527–34.

Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998; 115: 357–69.

Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;345:235-241.

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Human Pathology*. 1991; 22: 287–94.

Rosa GM, Moraes L, Cardias BB, Souza Mda R. de, Costa JAV. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. *Bioresource Technology*. 2015; 192: 321–7.

Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28: 466–74.

Rothwell, P. M., Wilson, M., Elwin, C. E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C. P., & Meade, T. W. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet (London, England)*, 2010, 376, 1741–1750.

Roy-Lachapelle A, Sollic M, Bouchard MF, Sauvé S. Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements. *Toxins*. 2017; 9: 76.

Rúbio C, Napoleone G, Luis-González G, Gutiérrez AJ, González-Weller D, Hardisson A, et al. Metals in edible seaweed. *Chemosphere*. 2017; 173: 572–579.

Rúbio C, Dominik-Jakubiec M, Paz S, Gutiérrez AJ, González-Weller D, Hardisson A. Dietary exposure to trace elements (B, Ba, Li, Ni, Sr, and V) and toxic metals (Al, Cd, and Pb) from the consumption of commercial preparations of *Spirulina platensis*. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2020; 28: 22146–55.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 28: 289–309.

Saini MK, Vaiphei K, Sanyal SN. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycocyanin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012; 361: 217–228.

Saini MK, Sanyal SN. Piroxicam and C-phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ β -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR γ . *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014; 68: 537–50.

Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*. 2008; 60: 131–44.

Sarkar FH, Li Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13: 2950–9.

Sayadi MH, Rashki O, Shahri E. Application of modified *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* powder on the adsorption of heavy metals from aqueous solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019; 7: 103169

Scheldeman P, Baurain D, Bouhy R, Scott M, Mühling M, Whitton BA, et al. *Arthrospira (Spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*. 1999; 172: 213–22.

Schirrmeister BE, Antonelli A, Bagheri HC. The origin of multicellularity in cyanobacteria. – *BMC Evolutionary Biology*. 2011; 11:45.

Schoen RE, Mutch M, Rall C, Dry SM, Seligson D, Umar A, et al. The natural history of aberrant crypt foci. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2008; 67: 1097–102.

Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*. 2012; 23: 2479–516.

Schopf JW. The development and diversification of Precambrian life. *Origin of Life*. 1974; 5: 119–35.

Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJY, Young GP, Kuipers EJ. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*. 2015; 64:1637–49.

Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the *Wnt* pathway. *Oncogene*. 2006; 25: 7531–7.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Research*. 1999; 59: 5704–9.

Sesink AL. Red meat and colon cancer: a possible role for heme [Dissertation]. Chapter 1, General Introduction. Amstelveen: Rijksuniversiteit Groningen; 2000.

Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, et al. Long-Term Mortality after Screening for Colorectal Cancer. *The New England Journal Medicine*. 2013; 369: 1106-14.

Shih CK, Chiang W, Kuo ML. Effects of adlay on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2004; 42: 1339–47.

Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, Swalsky PA, Bakker A, Finkelstein S, et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Letters*. 1997; 115: 39–46.

Shoemaker AR, Luongo C, Moser AR, Marton LJ, Dove WF. Somatic mutational mechanisms involved in intestinal tumor formation in *Min* mice. *Cancer research*. 1997; 57: 1999–2006.

Sili C, Torzillo G, Vonshak A. Chapter 25, *Arthrospira* (Spirulina). In: Whitton BA *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. 1st Ed. Durham: Springer, 2012. p. 677-701.

Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*. 2016; 11: 967-76.

Smieszek A, Giezek E, Chrapiec M, Murat M, Mucha A, Michalak I, et al. The Influence of *Spirulina platensis* Filtrates on Caco-2 Proliferative Activity and Expression of Apoptosis-Related microRNAs and mRNA. *Marine Drugs*. 2017; 15: 65.

Sohn OS, Fiala ES, Requeijo SP, Weisburger JH, Gonzalez FJ. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Research*. 2001; 61: 8435–40.

Sohn KJ, Choi M, Song J, Chan S, Medline A, Gallinger S, et al. Msh2 deficiency enhances somatic *Apc* and *p53* mutations in *Apc*^{+/–}*Msh2*^{–/–} mice. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 217–24.

Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*. 1976; 36: 2699–702.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*. 2013; 109: 1–7.

Stitzenberger E (1852) *Spirulina* und *Arthrospira* (nov. gen.). *Hedwigia* 1:32–41

Stone JR, Marletta MA. Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chemistry & Biology*. 1998; 5: 255–61.

Stopera SA, Murphy LC, Bird RP. Evidence for a *ras* gene mutation in azoxymethane-induced colonic aberrant crypts in Sprague-Dawley rats: earliest recognizable precursor lesions of experimental colon cancer. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 2081–5.

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*. 1992; 256: 668–70.

Subhashini J, Mahipal SVK, Reddy MC, Reddy MM, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*. 2004; 68: 453–62

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209-49

Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *Journal of Toxicologic Pathology*, 2013; 26: 335–41.

Tadros MG. Characterization of *Spirulina* biomass for CELSS diet potential [Dissertation] - NASA Contractor NCC 2-501. Alabama: University of Alabama; 1993.

Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, Sugimura T, Wakabayashi K. Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. *Cancer Research*. 1997; 57: 1233–7.

Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K. Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000; 21:1319–27.

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

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S.,Mori, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 2003; 94, 965–973.

Tanaka T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International Journal of Inflammation*, 2012; 658786.

Taylor K. Reporting the implementation of the Three Rs in European primate and mouse research papers: are we making progress? *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*. 2010; 38: 495–517.

Thangam R, Suresh V, Asenath Princy W, Rajkumar M, Senthilkumar N, Gunasekaran P, et al. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food Chemistry*. 2013; 140: 262–272.

Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncology*. 2017; 3:194–201.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487:330–7.

Thorup I. Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression. *Carcinogenesis*: 1997; 18: 465–72.

Tomaselli L. Chapter 1, Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis* In: **Vonshak A.** *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis Ltd, 1997. p. 1-15.

Tomaselli L. Chapter 1, The Microalgal Cell. in: Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004; p. 3-19.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*. 1999; 96: 8681-6.

Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Research*. 2009; 29: 2727–37.

Turpin PJF. *Spirulina oscillarioide*. In: Dictionnaire des Sciences Naturelles, De Lévrault, Paris 1829; 50, p 309–10.

Turpin DH. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*. 1991; 27: 14–20.

Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1775: 283–97.

Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1807–1816.

Ürek RÖ, Tarhan L. The relationship between the antioxidant system and phycocyanin production in *Spirulina maxima* with respect to nitrate concentration. *The Turkish Journal of Botany*. 2012; 36: 369–77.

van Eykelenburg C. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1979; 45:369–90.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44–84.

Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in Colorectal Cancer- the stable evidence. *Nature Reviews - Clinical Oncology*. 2010; 7: 153–62.

Viti C, Ventura S, Lotti F, Capolino E, Tomaselli L, Giovannetti L. Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Research in Microbiology*. 1997; 148: 605–11.

Vivona AA, Shpitz B, Medline A, Bruce WR, Hay K, Ward MA, et al. K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1993; 14: 1777–81.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339: 1546–58.

Vonshak A, Richmond A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*. 1988; 15: 233–47.

Vonshak A, Guy R. Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga, *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant, Cell & Environment*. 1992; 15: 613–6.

Vonshak A, Tomaselli L. Chapter 18, *Arthrospira (Spirulina)*: systematics and ecophysiology In: Whitton BA, Potts M. The Ecology of Cyanobacteria. Dordrecht: Springer, 2000.p.505-22.

Vonshak A, Laorawat S, Bunnag B, Tanticharoen M. The effect of light availability on the photosynthetic activity and productivity of outdoor cultures of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). Journal of Applied Phycology. 2014; 26: 1309–1315.

Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. Gut. 2008; 941–50.

Ward JM, Treuting PM. Rodent intestinal epithelial carcinogenesis: pathology and preclinical models. Toxicologic Pathology. 2014; 42: 148–61.

White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. Biochemistry. 1992; 31: 6627–31.

Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020; Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acessado em 13 jul 2021.

Wilsnack RW, Wilsnack SC, Kristjanson AF, Vogeltanz-Holm ND, Gmel G. Gender and alcohol consumption: patterns from the multinational GENACIS project. Addiction. 2009; 104: 1487–1500.

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. Gastroenterology. 1997; 112: 594–642.

Wolter S, Frank N. Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine in isolated perfused rat liver. Chemico-Biological Interactions. 1982; 42: 335–44.

Wu Q, Liu L, Miron A, Klímová B, Wan D, Kuča K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. Archives of Toxicology. 2016; 90: 1817–40.

Yogianti F, Kunisada M, Nakano E, Ono R. Inhibitory effects of dietary spirulina platensis on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. Journal of Investigative Dermatology. 2014; 134: 2610–9,

Yu S, Kong AN. Targeting carcinogen metabolism by dietary cancer preventive compounds. Current Cancer Drug Targets. 2007; 7: 416–424.

Zalis ME, Blake MA, Cai W, Hahn PF, Halpern EF, Kazam IG, et al. Diagnostic accuracy of laxative-free computed tomographic colonography for detection of adenomatous polyps in asymptomatic adults: a prospective evaluation. *Annals of Internal Medicine*. 2012; 156: 692–702.

Zarrouk, C Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (*Setchell et Gardner*) Geitler. [Dissertation]. University of Paris, Paris. 1966.

Zeinalian R, Farhangi MA, Shariat A, Saghafi-Asl M. The effects of *Spirulina Platensis* on anthropometric indices, appetite, lipid profile and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in obese individuals: a randomized double blinded placebo controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17: 225.

Zelinkova Z, Wenzl T. EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2015; 32: 1914–26.

Capítulo 2- Artigo Científico

O capítulo 2, referente ao manuscrito intitulado “**Effects of dietary marine *Arthrospira (Spirulina platensis) spp. during promotion/progression stages of colon carcinogenesis in rats fed-hemin*”**”, será submetido de acordo com as diretrizes da revista *Food and Chemical Toxicology* (Fator de Impacto: 6,025; JCR 2020). Disponível em: [https://www.elsevier.com/journals/food-and-chemical-toxicology/0278-6915/guide-for-authors].

Preventive effect of *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* against hemin from red meat on colorectal rat preneoplastic & neoplastic lesions

Luis Manuel Sarmiento-Machado^{1*}; Simone Oliveira Amadeu¹; Nelci Antunes de Moura¹; Luis Fernando Barbisan¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Biosciences Institute,
São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

***luis1234msm97@gmail.com; Tel.: +55 14 998148026**

*UNESP – Biosciences Institute – Department of Structural and Functional Biology.
250, Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, St., Botucatu, São Paulo, Brazil. CEP: 18618-689

Abstract

The risk for developing colorectal cancer (CRC) has been associated with *westernized* dietary habits, including a high intake of red and processed meat. Hemin, an iron-containing porphyrin found in red meat, promotes CRC by increasing colonic cytotoxicity and regenerative epithelial proliferation. Dietary microalga *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* (SP) may counteract hemin-promoting effects given its antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, we assessed the preventive effects of dietary SP on hemin-promoting effects in a dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis rat model. Fifty-two male Sprague Dawley rats were allocated into five groups. Groups 1–3 were given DMH doses (4 x 40 mg/kg b.w.) once a week for 2 weeks. Subsequently, groups 2, 3 and 4 were fed with diets containing hemin (0.5 mmol/kg), hemin + 2% SP (20g/kg) or 2% SP for 16 weeks, respectively. Hemin promoted aberrant crypt foci (ACF) development in number and size when compared to DMH. 2% SP significantly reduced ACF number and size, compared to DMH+hemin group. Hemin upregulated *Mmp3* and *Nox1* mRNA levels in the colonic mucosa when compared to DMH group, whereas 2% SP upregulated *Xrcc6* compared to DMH+hemin group. Therefore, these findings show that dietary 2% SP reduced hemin-promoting effects by counteracting ACF development.

Key Words: 1,2-Dimethylhydrazine, Sprague-Dawley Rats, Aberrant Crypt Foci, Hemin, promotion/progression, *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.*

Highlights:

- 2% **SP** may counteract **hemin** promoting effects at impairing ACF development on rat colon carcinogenesis.
- 2% **SP** does not interfere on colon adenomas/adenocarcinomas progression.
- 2% **SP** upregulates *Xrcc6* mRNA levels, related to DNA double-strand break repair.

Abbreviations

4-Hydroxynenal (4-HNE)	Generally Recognized as Safe (GRAS)
Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS)	Malondialdehyde (MDA)
Aberrant Crypt (AC)	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)
Aberrant Crypt Foci (ACF)	Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA)
Azoxymethane (AOM)	Sprague-Dawley rats (SD)
C-Phycocyanin (C-PC)	<i>Arthrospira (Spirulina platensis) spp.</i> (SP)
1,2- dimethylhydrazine (DMH)	Taqman Low-Density Array (TLDA)

1. Introduction

Colorectal Cancer (CRC) is the third most incident neoplasia and the second-leading cause of death worldwide (Sung *et al.*, 2020). According to the World Health Organization (WHO) GLOBOCAN estimates for 2020, 1.9 million new cases and 935.000 deaths by CCR for both sexes and all ages (Sung *et al.*, 2020). CRC is highly incident in high-HDI countries, whereas the mortality proportion is higher in low-income countries (Arnold *et al.*, 2017; Sung *et al.*, 2020). Environmental risk factors are the most prevalent factors of sporadic CRC, which comprises 55-70 % of CRC total cases (Keum & Giovannucci, 2019; Siegel *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2020). These environmental factors refer to a western lifestyle, including poor dietary habits characterized by high intake of ultra-processed food, refined starches, saturated fats, and red and processed meat, all linked to the risk of developing CRC (Johnson *et al.*, 2013; Keum & Giovannucci, 2019; Sung *et al.*, 2020).

Red meat contains high-value proteins and micronutrients such as B vitamins, iron (both free iron and heme iron), and zinc (IARC, 2015). Red meat refers to unprocessed mammalian muscle meat while processed meat refers to meat transformed through processes to enhance flavor or improve its preservation (IARC, 2015). Several prospective studies have shown an association between CRC risk and high consumption of red meat, especially processed meat (Norat *et al.*, 2005; Bernstein *et al.*, 2015; Carr *et al.*, 2017). Norat *et al.* (2005) concluded that red meat intake is positively but not significantly related to CRC risk, whereas processed meat consumption is significantly related. Likewise, consumption of 100 g/day of red meat and 50g/day of processed meat was associated with, respectively, a risk of 27% and 29% of colorectal adenomas (Aune *et al.*, 2013). Conclusively, there is sufficient evidence for the potential carcinogenicity of processed meat intake in humans, while there is limited evidence for the carcinogenicity of moderate consumption of red meat (IARC, 2015).

Several factors could explain the positive association between risk of CRC and red and processed meat consumption, including: heterocyclic aromatic amines (HAA) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), formed during curing and heating process in meat cooking; high content of saturated fat; N-nitroso-compounds (NOC), as additives in processed meat for preservation and flavor; and heme iron (Santarelli *et al.*, 2008; Cross *et al.*, 2010; Alaejos & Afonso, 2011; IARC, 2015).

Heme iron, a ferric form of heme, is associated with red and processed meat intake and the risk of CRC (Cross *et al.*, 2003; Balder *et al.*, 2006; Bastide *et al.*, 2011). It consists of

an iron atom present at the center of a heterocyclic ring called porphyrin (Ponka, 1999; Ryter & Tyrell, 2000; Correia, Sinclair & De Matteis, 2011). Heme content do not differ between red and processed meat, although the latter contains a nitrosylated form of heme, whether this results in a more potent carcinogenic effect of processed meat than red meat remains to be elucidated (Santarelli *et al.*, 2008; Bastide *et al.*, 2011). Several studies have shown that unbound heme is a potential carcinogen due to its genotoxic and cytotoxic effects on colonic mucosa, thus being an inducer or a promoting agent of carcinogenesis in the large intestine (Sesink *et al.*, 1999; Santarelli *et al.*, 2008). In rodent assay, dietary heme iron promoted the development of mucin-depleted foci (MDF) and increased lipid peroxidation in the colonic mucosa in an azoxymethane (AOM)-induced model in male Fisher 344 rats. In addition, dietary heme iron caused genotoxicity and cytotoxicity on colonic mucosa, as well as augmented tumor burden in male C57BL/6J Apc^{Min} mice (Bastide *et al.*, 2015).

Several dietary compounds are potential preventive agents of carcinogenesis, either by blocking initiation or suppressing promotion stages (Stewart & Brown., 2013; Landis-Piwowar & Iyer, 2014; Koh, Ho & Pan, 2020). Functional foods or their specific compounds possess antioxidant and anti-inflammatory traits, which results in reduced clonal expansion of initiated cells, scavenging of pro-oxidative metabolites, alleviation of a pro-inflammatory cellular environment, among others (De Flora & Ferguson, 2005; Stewart & Brown., 2013; Landis-Piwowar & Iyer, 2014).

Arthrospira (Spirulina platensis) spp. (SP) are cyanobacteria from alkaline lakes that are capable of enduring unfavorable conditions for most aquatic organisms, such as higher levels of alkalinity (pH > 10), salinity, and UV irradiation (Dhiab *et al.*, 2007; Ismaiel *et al.*, 2016). The commercial relevance of SP is mainly due to its nutritional content. SP extract products contain approximately 64-74% protein, 9-14% lipid, and 12-20% carbohydrate, all of which are dependent on extraction and cultivation methods (Ciferri, 1983; Rosa *et al.*, 2015; Grosshagauer, Kraemer & Somoza, 2020). Moreover, “Spirulina” based products have been certified as Generally Recognized as Safe (GRAS-GRN 127-FDA, 2003), indicating that SP extract may be safely used for food consumption.

SP is regarded as a potential anti-carcinogenic resource given its blocking and suppressing properties, as shown by several *in vitro* (Smieszek *et al.*, 2017; Marková *et al.*, 2020) and *in vivo* approaches (Yogianti *et al.*, 2014; Ouhtit *et al.*, 2014; Álvarez-González *et al.*, 2015). Furthermore, SP contains C-phycocyanin (C-PC), a blue pigmented water-soluble

photosynthetic protein, that acts as a COX-2 suppressor in colon carcinogenesis *in vivo*, and apoptotic inducer in rat colonic enterocytes by activation of *calpain-9* and *Ppar γ* , indicating that C-PC could suppress colon carcinogenesis on *in vivo* model (Saini *et al.*, 2012; Saini & Sanyal, 2014).

Thus, we assessed the effects of dietary 2% SP on hemin-promoting effect in DMH-induced colon carcinogenesis rat model and colon neoplasm development.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and SP

1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH PubChem CID: 1322) and hemin (PubChem CID: 455658) were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, USA). DMH was dissolved in 1 mM EDTA immediately before use. SP powder was kindly gifted (Fazenda Tamanduá- Paraíba, Brazil) with the following characteristics per gram: proteins (66.7%), total carbohydrates (20.0%), total lipids (9.33%), and fiber (6.0%) expressed on the dry weight. SP powder was incorporated into a cereal-based commercial diet (Nuvilab-CR1, Nuvital - Brazil), reaching the final concentration of 2% (20 g of SP powder/kg chow).

2.2 Animal housing and study design

Six-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) at the State University of Campinas (UNICAMP, Campinas, SP, Brazil). Animals were maintained under standard housing conditions of room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($55 \pm 10\%$), and 12h light/12h dark cycle. After 2-weeks acclimation period, fifty-two animals were allocated into five groups (Figure 1). At weeks 1-2, groups 1-3 (n =14 each) received four subcutaneous injections (s.c.) of DMH, twice a week ($4 \times 40\text{mg/kg}$ body weight), whereas groups 4 and 5 (n = 5 each) received EDTA solution (DMH vehicle, $37 \text{ mg}/1000 \text{ ml}$, $4 \times 5\text{ml/kg}$ body weight, s.c., twice a week) (Caetano *et al.*, 2020). After DMH/vehicle administrations, G1 and G5 groups received balanced diet; G2, G3, and G4 received a balanced diet containing either hemin (0.5mmol/kg chow), hemin + 2% SP, or 2% SP for 16 weeks, respectively. At the end of week 16th, all animals were euthanized under xylazine and ketamine anesthesia (10 mg/kg and 80 mg/kg body weight, respectively), and their colons were collected. Body weight and food consumption were recorded twice a week

throughout the experimental period. Animals received a balanced diet and drinking water *ad libitum* throughout the experiment.

Dietary hemin concentration (w/w) was selected based on our previous studies (de Moura *et al.*, 2018, 2019). 2% SP concentration (w/w) was based on human consumption of food containing SP (Batista *et al.*, 2017; Fradinho *et al.*, 2020), in order to avoid nutritional imbalance or metabolic disturbance, considering a 5% limit on dietary compositions (EFSA, 2011).

2.3 Ethical Statement

The animals used in this study were handled according to the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010). The animal study was approved by the Botucatu Institute of Biosciences's Ethics Review Board (CEUA - Protocol n° 1128).

2.4 Colon processing and histopathological analysis: ACF and colon tumors

Colon specimens were removed, opened longitudinally, pinned flat, and washed with 0.9% NaCl. Macroscopic lesions were registered. Each colon was fixed in 10% phosphate-buffered formalin for 24h and kept in ethanol 70% until further analysis.

Colon samples were divided into sides (proximal, middle, and distal) and then stained with 0.2% methylene blue dissolved in phosphate-buffered salt solution (PBS) for aberrant crypt foci (ACF) and aberrant crypts (AC) analysis (Rodrigues *et al.*, 2002; Caetano *et al.*, 2020). Total number ACF, AC, ACF multiplicity (AC/ACF), and ACF size (≤ 4 AC or ≥ 4 AC) were determined under light microscopy at 40x magnification and were divided into 2 categories: 2–4 crypts/focus and ≥ 4 crypts/focus (Corpet & Taché, 2002; Caetano *et al.*, 2018). ACF were counted on middle and distal colons since ACF are mostly located in these sides (Rodrigues *et al.*, 2002; Femia *et al.*, 2005). The ACF were identified topographically according to Bird's morphological criteria: increased size, thickened epithelial cell lining, increased pericryptal space, and irregular lumens (Bird, 1987; Bird & Good, 2000). Each colon sample was examined by two observers in a double-blind manner. After ACF analysis, colon samples were Swiss-rolled and embedded in paraffin for histological evaluation carried out on hematoxylin-eosin (H&E)-stained.

Samples of macroscopic colon tumors were processed for histological analysis and classified into adenomas or adenocarcinomas after H&E staining, according to Nolte et al. (2016) (Figure 2). Incidence, number and multiplicity of colon neoplasms were calculated.

2.5 Alcian Blue/Periodic Acid-Schiff (AB-PAS pH 0.5)

For mucins secretion pattern, colon sections were submitted to the AB-PAS staining (Sakata & Engelhart., 1981; Barcelo *et al.*, 2000). Twenty crypts per slide were analyzed, and a total of 700-800 goblet cells were counted per colon sample (Barcelo *et al.*, 2000). Goblet cells were counted on both upper and lower halves of colonic crypts. Goblet cells' staining is pH-dependent: acidic cells are stained in blue, neutral cells in pink/magenta, and mixed cells in purple (Spicer *et al.*, 1960; Barcelo *et al.*, 2000; Ijssenagger *et al.*, 2012b). Distal colon sections were examined since its distribution predominates of acidic cells, similarly as in humans (Filipe, 1975; Sakata & Engelhart, 1981). Acidic goblet cells index (LI%) was scored by the number of blue-stained cells/number of goblet cells per half crypt ratio. Quantitative analysis of goblet cells and crypt height measurement (μm) were performed using ImageJ software (NIH, USA).

2.6 PCNA immunohistochemistry in colon tumors

Colonic tumor sections on silane-covered microscope slides (4- μm) were deparaffinized and rehydrated in a graded xylene-alcohol series. Subsequently, the slides were subjected to antigen retrieval in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0, 120 °C) in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation, Denmark). After endogenous peroxidase blockade with 10% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) (10 min), the slides were immersed in low-fat milk 1% in PBS (60 min) and thereafter incubated with mouse anti-PCNA (1:100, M0879, Dako Cytomation, Denmark) primary antibody in a humidified chamber (overnight, 4 °C). Then, slides were incubated with one-step horseradish peroxidase (HRP)-polymer (Dako Cytomation, Denmark) (30 min). Staining was performed using 3°3-diaminobenzidine (DAB) chromogen (5 min) (Sigma-Aldrich, USA) and counterstaining in Harris' hematoxylin (1 min).

For Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunostaining counting, 40x magnification was established to count 500 cells per tumor and calculated an index of labeled nuclei per total of nuclei counted (%).

2.7 RNA extraction, quantitative and qualitative analysis and qRT-PCR

Distal colon samples were collected and stored at -80°C for gene analysis. Total RNA was isolated from these samples (n=5 per group) using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden,

Germany). The quantity (Optic Density – OD, Abs_{260/280}) and quality (RNA integrity number – RIN) of RNA were evaluated using NanoVue Plus (GE HealthCare, Little Chalfont, UK) and Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), respectively. cDNA was synthesized using SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Scientific, USA). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) in microfluidic TaqMan LowDensity Array cards: (TLDA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was performed. The custom cards consisted of 95 target genes and four reference genes involved in DNA repair, pro-and antioxidant activity, cell proliferation, and pro-and anti-apoptosis regulators. Briefly, a total of 200 µl reaction mixture with 100 µl of cDNA template (422 ng mRNA) was added to 100 µL of TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, USA) and was dispensed into loading wells on TLDA card. The cycling protocol included heat activation (50 °C, 1 min), and denaturation (95 °C, 10 min), followed by 40 cycles (95 °C, 15s, and 60 °C, 1 min). Fluorescence detection was executed on a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Relative quantification of mRNA expression was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method and *Actb*, *Gapdh*, *Gusb*, and *Hprt1* were used for sample normalization.

2.8 Statistical Analysis

Data were presented as mean $\pm$ SD or median in quartiles. Differences among groups were evaluated by One-Way Analysis of Variance (ANOVA) for parametric data or Kruskal-Wallis for nonparametric data, followed by *post hoc* Tukey's and Dunn's tests, respectively. Adenoma/Adenocarcinoma incidence (%) was calculated using Fisher Exact's test. Gene expression was analyzed by Student's *t*-test, using the Expression Suite Software v1.0.3 (Life Technologies, USA). Statistical significance was established as $P < 0.05$ p. GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, USA) was used for data analysis.

3. Results

3.1 General findings

The body weights of animals in the different groups increased gradually during the SP feeding. After 16 weeks of dietary intervention, no significant difference in final body weight, body weight gain, and liver absolute and relative weights were observed among groups (Table 1). However, food consumption was significantly lower ($p = 0.008$) in DMH+hemin+2% SP group (G3, 1.9 g or 7.6%) in comparison to DMH+hemin fed group (G2). One rat from the

DMH+hemin+2%SP group (G3) was found dead before the necropsy procedure, and was not considered for data analysis given advanced postmortem changes.

3.2 Dietary hemin and 2% SP effects on ACF development

Table 2 summarizes the values of the total number of ACF per rat/group, the total number (AC and ACF), AC/ACF ratio, and the number ACF containing 2-4 or $4 \geq$ AC. Compared with the DMH-initiated control group (G1), dietary hemin group (G2) increased in 25% and 22% the total number of AC ($p = 0.019$) and ACF ($p = 0.044$), respectively. In addition, a significant increase in the mean number of ACF with $4 \geq$ AC ($p = 0.029$) was observed on the DMH/hemin-treated group (G2) when compared to DMH-treated animals (G1). In contrast, hemin+2% SP intervention (G3) diminished the mean total number of ACF by 43% and ACF multiplicity ($p = < 0.001$) in comparison to the dietary hemin group (G2).

3.3 Dietary hemin and 2% SP effects on colon neoplasms development

After 16 weeks of dietary intervention, no differences were observed in all categories among groups (Table 3). Neither DMH+hemin (G2) nor DMH+hemin+2%SP (G3) seemed to not interfere on Adenoma/Adenocarcinoma ratio (%). Although hemin+2% SP intervention (G3) showed a decreased trend in tumor incidence compared to hemin diet (G2), 23% vs 64% respectively, no statistical significance was observed ($p = 0.054$). In addition, cell proliferation PCNA index in tumor samples was not significantly different among groups (Figure 3).

3.4 Dietary hemin and 2% SP effects on qRT-PCR gene analysis

Gene pairwise comparison on distal colonic mucosa revealed that dietary hemin (G2) upregulated two genes, *Mmp3* (FC 5.7) and *Nox 1* (FC 2.4), involved in extracellular matrix degradation and ROS generation, respectively, in comparison to DMH-treated animals (G1). On the other hand, DMH/Hemin+2%SP (G3) upregulated one gene, *Xrcc6* (FC 1.5), related to DNA double-strand break repair (DSB) when compared to DMH+hemin-treated group (G2) (Table 4).

3.5 Dietary hemin and 2% SP effects on AB-PAS sulphomucin expression and colon crypt height

AB-PAS mucin staining in distal colon goblet cells revealed no clear differences in the presence and distribution of sulfated-acidic mucins in normal-appearing apical and basal crypts

portions among groups (Figures 4, 5 & 6). Also, no differences in normal colon crypt height were observed among groups (Figure 7).

4. Discussion

In the present study, we investigated potential preventive effects of 2% SP during carcinogenesis in a 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon rat model promoted by dietary hemin. To our knowledge, this is the first study to assess SP effects on promotion/progression stages of colon carcinogenesis through histopathological and molecular approaches. Neither dietary hemin nor 2% SP or both affected body weight and liver weight (absolute and relative) parameters as observed by others (Pierre *et al.*, 2008; Ismail *et al.*, 2009; Bigagli *et al.*, 2017; Khafaga *et al.*, 2018; De Moura *et al.*, 2019). On the other hand, SD rats fed hemin+2% SP (G3) consumed proportionally less supplementary diet than the hemin fed group (G2). This physiological response could be due to a higher caloric content of both hemin and 2% SP diet (G3), leading to a sensation of fullness that reduces further eating behavior. Whether this indicates any anti-carcinogenic effect remains to be elucidated.

We assessed ACF as a biomarker tool for colon carcinogenesis prevention. ACF are regarded as putative preneoplastic lesions in rodent colon carcinogenesis assays used for different preventive approaches (Li *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Kobaek-Larsen *et al.*, 2019). Nevertheless, ACF progression into colon adenomas conception has been under scrutiny for decades. For instance, a lack of correlation was observed between ACF development and colon tumor outcome in some chemically-induced rat and mice models (Ghirardi *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2004). Conversely, ACF development is dynamic and may differ in growth and number at different time points (Magnuson, Barr & Bird, 1993; Baijal, Fitzpatrick & Bird, 1998). According to Baijal, Fitzpatrick & Bird (1998), although no correlations were observed between ACF and adenomas or adenocarcinomas in male SD rats, some ACF could progress toward malignancy. Despite hyperplastic ACF rarely evolve into adenomas, these lesions may evolve into dysplastic ACF through a transition phase in humans, as observed by Otori *et al.* (1995). Dysplastic ACF are considered precursors of adenomatous lesions and β -catenin cytoplasm-nucleus accumulations are observed similarly as in colon adenomas and adenocarcinomas in rats (Takahashi *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2008) and humans (Hardy *et al.*, 2002; Mi *et al.*, 2009). Still, ACF progression towards adenomas is yet to be fully understood.

Dietary hemin promoted ACF development in DMH-initiated animals, in line with previous studies (Pierre *et al.*, 2008; Santarelli *et al.*, 2010; de Moura *et al.*, 2019). Hemin is included in so-called hemoproteins, involved in oxygen supply (hemoprotein, myoglobin) and electron transfer reactions (cytochromes) (Ryter & Tyrell, 2000; Correia, Sinclair & De Matteis, 2011). However, excessive amounts of non-degraded hemin are carcinogenic for colon enterocytes. Hemin induces hyperproliferative response of colonic epithelial cells through downregulation of feedback inhibitors of proliferation: *Wif1*, *Ihh*, *IL-15*; and increased signalization of injured surface cells on colon mice: *c-fos*, *Nemo*, *Tis7* (Ijssenagger *et al.*, 2012a). Moreover, cytotoxicity of colon crypt cells and simultaneous compensatory hyperproliferation results from an acute oxidative-stress response induced by hemin (Ijssenagger *et al.*, 2013). These effects are linked to the hemin catalytic effect on lipid peroxidation byproducts: malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE). Both aldehydes are proposed to be cytotoxic and genotoxic (Bastide *et al.*, 2011; Bastide *et al.*, 2015). MDA cytotoxicity on cell lines was not observed, although its genotoxicity was discreet. Instead, 4-HNE was cytotoxic in *Apc^{+/+}* and *Apc^{+/-}* *in vitro* cells, increased proapoptotic caspase 3/7 activity, and elevated DNA double-strand breaks (positive- γ H2AX cells). Noteworthy, hemin diet increased mucin-depleted foci (MDF) preneoplastic lesions when compared to HCA and ATNC compounds in Fisher 344 rats (Bastide *et al.*, 2015). Thus, these effects result in a hemin-promoting effect on ACF development.

Dietary 2% SP reduced the number and multiplicity of ACF, and thus affecting the early changes in colon carcinogenesis. SP has shown antioxidant and anti-inflammatory properties, as investigated in various *in vitro* and *in vivo* assays (Yogianti *et al.*, 2014; Smieszek *et al.*, 2017; Khafaga *et al.*, 2018; Marková *et al.*, 2020). This antioxidant activity relates to its chlorophyll and C-PC content, both of which are free radicals scavengers (De Vogel *et al.*, 2005; Papalia, Sidari & Panuccio, 2019). Furthermore, SP exerted a suppressive effect on ROS production caused by UVB in the skin 8-oxoG adduct formation in *Ogg1* KO mice (Yogianti *et al.*, 2014). C-PC in SP impairs colonic COX-2 activity and subsequent PGE₂ production in male SD rats (Saini & Sanyal., *et al.*, 2012). Therefore, these findings could explain SP preventive effects on colon pre-neoplastic lesions, as observed on *Arthrospira (Spirulina) maxima* suppressive effect on ACF development in male SW mice at 200, 400, and 800 mg/kg doses in an AOM-protocol study (Álvarez-González *et al.*, 2015).

Dietary hemin and 2% SP did not interfere in colon neoplastic development in a 16-week DMH-induced protocol study given a low number of colon-induced adenomas and

adenocarcinomas. Although there is a trend in a reduction for tumor development by dietary 2% SP (G3) compared to the hemin group (G2), no statistical significance was observed. In a previous study, 23 weeks of dietary hemin also did not affect the number and volume of colon tumors in male Wistar rats (De Moura *et al.*, 2019). Long-term studies (30 weeks or more) are needed to verify whether SP or hemin-fed animals modulate colon neoplastic lesions in DMH –initiated rodents (Baijal, Fitzpatrick & Bird, 1998; Hu *et al.*, 2013).

Gene analysis in normal-appearing colon revealed that dietary hemin (G2) upregulated two genes, *Mmp3* and *Nox 1*. MMP-3, also known as stromelysin 1, is a member of a family of zinc-dependent endoproteases referred to as metalloproteinases (MMPs), which are involved in extracellular matrix (ECM) degradation and are related to tumor progression and invasiveness (Moss, Jensen-Taubman & Stetler-Stevenson, 2012; Cui, Hu & Khalil, 2017). *Mmp3* expression may be involved in the progression towards malignancy. *Nox 1* elevated mRNA levels resonates with ROS-mediated cytotoxic effects in colon enterocytes. NOX1, mostly expressed in colon tissue, is included in a group of transfer electron and therefore ROS generator enzymes: the NADPH oxidases (Bedard & Krause, 2007). Gene and proteic levels of NOX1 are overexpressed on colon tumors from PhIP induced F44 rats and CRC patients. NOX1 silencing increased the percentage of apoptotic Caco2 cells and elevated proapoptotic proteins cleaved caspase-3 and PARP (Wang *et al.*, 2010).

On the other hand, dietary 2% SP increased *Xrcc6* levels when compared to hemin- fed group (G2), which encodes Ku70 protein. Ku70 alongside Ku80 forms a heterodimer that binds to DSBs in a no-specific manner and serves as a main component to the non-homologous-end-joining repair process (NHEJ) (Lieber, 2010; Dimberg *et al.*, 2016; Kragelund *et al.*, 2016). *Xrcc6* gene polymorphisms C/C and C/G + G/G were associated with stage II and III CRC Swedish patients (Dimberg *et al.*, 2016). On *in vivo* model, Ku70 (-/-) mice conferred an increased proliferative activity on liver tumors, since cyclin D1 and PCNA protein levels are elevated at 9th month of DEN-induced *time point*, and 80% of mice harbored neoplastic lesions at 6th month in comparison +/+ and +/- genotypes, both of which no tumors were found (Teoh *et al.*, 2008). Hence, dietary 2% SP effects could determine a long-term response against hemin genotoxic effects at a molecular level.

5. Conclusion

In summary, dietary 2% SP may counteract hemin-promoting effects at impairing ACF development on rat colon carcinogenesis. 2% SP effects on colon neoplasms are still elusive.

Funding

Luis Manuel Sarmiento-Machado was a recipient of the fellowship from the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* state funding program (CAPES process number nº 88887.481942/2020-00).

CRediT authorship contribution statement

Luis Manuel Sarmiento-Machado: Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Investigation. **Simone Oliveira Amadeu:** Methodology, Formal analysis. **Nelci Antunes de Moura:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Supervision. **Luis Fernando Barbisan:** Conceptualization, Writing – review & editing, resources & funding acquisition, Supervision.

Acknowledgments

The authors would like to thank Isamery Machado, Wismar Sarmiento, Alanis Sarmiento, Guilherme Ribeiro Romualdo, Gabriel Bacil Prata, Sara Gomes Espirito Santo, and Leandro Alves for their support and counseling during the course of this study.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

6. References

- Alaejos, M.S., Afonso, A.M., 2011.** Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 10, 52-108. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00141.x>.
- Álvarez-González, I., Islas-Islas, V., Chamorro-Cevallos, G., Barrios, J. P., Paniagua, N., Vásquez-Garzón, V. R., Villa-Treviño, S., Osiris-Madrigal-Santillán, Morales-González, J. A., Madrigal-Bujaidar, E. 2015.** Inhibitory Effect of *Spirulina maxima* on the Azoxymethane-

induced Aberrant Colon Crypts and Oxidative Damage in Mice. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 4), S619–S624. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.172973>.

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66, 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.

Aune, D., Chan, D. S., Vieira, A. R., Navarro Rosenblatt, D. A., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., Norat, T., 2013. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control*. 24, 611–627. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0139-z>.

Baijal, P. K., Fitzpatrick, D. W., Bird, R. P., 1998. Comparative effects of secondary bile acids, deoxycholic and lithocholic acids, on aberrant crypt foci growth in the postinitiation phases of colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 31, 81–89. <https://doi.org/10.1080/01635589809514685>.

Balder, H. F., Vogel, J., Jansen, M. C., Weijenberg, M. P., van den Brandt, P. A., Westenbrink, S., van der Meer, R., Goldbohm, R. A., 2006. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15, 717–725. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0772>.

Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J. A., Cuber, J. C., Plaisancié, P., 2000. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*. 46, 218–224. <https://doi.org/10.1136/gut.46.2.218>.

Bastide, N. M., Pierre, F. H., Corpet, D. E., 2011. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)*. 4, 177–184. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>.

Bastide, N. M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R. L., Taché, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D. A., Kuhnle, G. G., Raymond-Letron, I., Gueraud, F., Corpet, D. E., Pierre, F. H., 2015. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res*. 75, 870–879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2554>.

Batista, A.P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, MR., Sousa, I., Raymundo, A., 2017. Microalgae biomass as an alternative ingredient

in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity, and in vitro digestibility. *Algal Res.* 26, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>.

Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245-313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.

Bernstein, A.M., Song, M., Zhang, X., Pan, A., Wang, M., Fuchs, C.S., Le, N., Chan, A.T., Willett, W.C., Ogino, S., Giovannucci, E.L., Wu, K., 2015. Processed and Unprocessed Red Meat and Risk of Colorectal Cancer: Analysis by Tumor Location and Modification by Time. *PLoS One.*;10:e0135959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135959>.

Bigagli, E., Cinci, L., Niccolai, A., Tredici, M. R., Biondi, N., Rodolfi, L., Lodovici, M., D'Ambrosio, M., Mori, G., Luceri, C., 2017. Safety evaluations and lipid-lowering activity of an *Arthrospira platensis* enriched diet: A 1-month study in rats. *Food Res Int.* 102, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.011>.

Bird, R.P., 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147-151. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1).

Bird, R.P., Good, C. K., 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* 112-113,395–402. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00261-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00261-1).

Carr, P.R., Jansen, L., Bienert, S., Roth, W., Herpel, E., Kloor, M., Bläker, H., Chang-Claude, J., Brenner, H., Hoffmeister, M., 2017. Associations of red and processed meat intake with major molecular pathological features of colorectal cancer. *Eur J Epidemiol.* 32, 409-418. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0275-6>.

Caetano, B.F.R., Tablas, M.B., Pereira, N.E.F., de Moura, N.A., Carvalho, R.F., Rodrigues, M.A.M., Barbisan, L.F., 2018. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 338, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.008>.

Caetano, B.F.R., Tablas, M.B., Romualdo, G.R., Rodrigues, M.A.M., Barbisan, L.F., 2020. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute responses to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. *Toxicol Lett.* 329, 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.009>.

Chan, D. S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., Norat, T., 2011. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS one*, 6, e20456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456>.

Chen, H.P., Pan, M.H., Chou, Y.Y., Sung, C., Lee, K.H., Leung, C.M., Hsu, P.C., 2017. Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor promotion in rats. *Food Chem Toxicol.* 103, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.014>.

Clapper, M.L., Chang, W.L., Cooper, H.S., 2020. Dysplastic Aberrant Crypt Foci: Biomarkers of Early Colorectal Neoplasia and Response to Preventive Intervention. *Cancer Prev Res.* 13, 229–240. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0316>.

Corpet, D.E., Taché, S., 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr. Cancer.* 43, 1–21. https://doi.org/10.1207/S15327914NC431_1

Correia, M.A., Sinclair, P.R., De Matteis, F., 2011. Cytochrome P450 regulation: the interplay between its heme and apoprotein moieties in synthesis, assembly, repair, and disposal. *Drug Met Rev.* 43, 1–26. <https://doi.org/10.3109/03602532.2010.515222>

Cross, A.J., Pollock, J.R., Bingham, S.A., 2003. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* 63, 2358–2360.

Cross, A. J., Ferrucci, L. M., Risch, A., Graubard, B. I., Ward, M. H., Park, Y., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., Sinha, R., 2010. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res.* 70, 2406–2414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3929>.

Cui, N., Hu, M., Khalil, R.A., 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 147, 1-73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.

De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 591, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.029>

De Moura, N.A., Caetano, B.F.R., de Moraes, L.N., Carvalho, R.F., Rodrigues, M.A.M., Barbisan, L.F., 2018. Enhancement of colon carcinogenesis by the combination of

indole-3 carbinol and synbiotics in hemin-fed rats. Food Chem Toxicol. 112,11-18. [https:// doi: 10.1016/j.fct.2017.12.029](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.029).

De Moura, N.A., Caetano, B.F.R., Bidinotto. L.T., Rodrigues, M.A.M., Barbisan, L.F., 2019. Dietary hemin promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats. Mutat Res. 846, 403076. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.006>.

De Vogel, J., Jonker-Termont, D.S.M.L., van Lieshout, E.M.M., Katan M.B., van der Meer, R., 2004. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haemin rat colon. Carcinogenesis. 26, 387–393. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh331>.

Dimberg, J., Skarstedt, M., Slind Olsen, R., Andersson, R.E., Matussek, A., 2016. Gene polymorphism in DNA repair genes XRCC1 and XRCC6 and association with colorectal cancer in Swedish patients. APMIS. 124, 736-740. <https://doi.org/10.1111/apm.12563>.

European Food Safety Authority., 2011. Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study I rodents on whole food/feed. EFSA Journal, 9, 2438. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2438>

Food and Drug Administration., 2003. Letter from L. Tarantino, Office of Food Additive Safety, CFSAN, FDA to J. Dore, Cyanotech Corporation, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127, October 6, <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153944.htm> (accessed 12 February 2021).

Femia, A.P., Bendinelli, B., Giannini, A., Salvadori, M., Pinzani, P., Dolara, P., Caderni G., 2005. Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. Int J Cancer, 116: 9-15. <https://doi.org/10.1002/ijc.20981>.

Filipe, M.I., 1975. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. Br J Cancer. 32, 60-77. <https://doi.org/10.1038/bjc.1975.134>.

Fradinho P, Niccolai A, Soares R, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR, et al . Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. Algal Res. 2020; 45: 101743.

Ghirardi, M., Nascimbeni, R., Villanacci, V., Fontana, M.G, Di Betta, E., Salerni, B., 1999. Azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal tumors in F344 rats: sequential analysis of growth. *Eur Surg Res.* 31, 272-80. <https://doi.org/10.1159/000008703>.

Grosshagauer, S., Kraemer, K., Somoza, V., 2020. The True Value of Spirulina. *J Agric Food Chem.*; 68, 4109-4115. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08251>.

Hardy, R.G., Tselepis, C., Hoyland, J., Wallis, Y., Pretlow, T.P., Talbot, I., Sanders, D.S, Matthews, G., Morton, D., Jankowski, J.A., 2002. Aberrant P-cadherin expression is an early event in hyperplastic and dysplastic transformation in the colon. *Gut.* 50, 13-19. <https://doi.org/10.1136/gut.50.4.513>.

Hata, K., Yamada, Y., Kuno, T., Hirose, Y., Hara, A., Qiang, S.H., Mori, H., 2004. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.* 95, 316-320. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03209.x>.

Hu, Y., McIntosh, G.H., Le Leu, R.K., Nyskohus, L.S., Woodman, R.J., Young, G.P., 2013. Combination of selenium and green tea improves the efficacy of chemoprevention in a rat colorectal cancer model by modulating genetic and epigenetic biomarkers. *PLoS One.* 23;8 :e64362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064362>.

Ijssennagger, N., Rijniere, A., de Wit, N., Jonker-Termont, D., Dekker, J., Müller, M., van der Meer, R., 2012. Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in the murine colon. *Gut.* 61, 1041-1049. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300239>.

Ijssennagger, N., Derrien, M., van Doorn, G. M., Rijniere, A., van den Bogert, B., Müller, M., Dekker, J., Kleerebezem, M., van der Meer, R., 2012. Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. *PloS one.* 7, e49868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049868>.

Ijssennagger, N., Rijniere, A., de Wit, N.J., Boekschoten, M.V., Dekker, J., Schonewille A, Müller, M., van der Meer, R., 2013. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis.* 34, 1628-1635. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt084>.

International Agency for Research on Cancer., 2015. Consumption of red meat and processed meat. IARC Working Group, Lyon. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 114, 6–13

Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., Berry, D. A., 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 24, 1207–1222. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0201-5>.

Karin, M., 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 441, 431–6. <https://doi.org/10.1038/nature04870>.

Keum, N., Giovannucci, E., 2019. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 16, 713-732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>.

Khafaga, A.F., El-Sayed, Y.S., 2018. Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. *Life Sci*. 196, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.010>.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8, e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.

Kim, H.S., Kacew, S., Lee, B.M., 2016. Genetic and epigenetic cancer chemoprevention on molecular targets during multistage carcinogenesis. *Arch Toxicol*, 2016; 90: 2389–404. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1813-9>.

Kobaek-Larsen, M., Baatrup, G., KhataeiNotabi, M., El-Houri, R. B., Pipó-Ollé, E., Christensen Arnspang, E., Christensen, L. P., 2019. Dietary Polyacetylenic Oxylipins Falcarinol and Falcarindiol Prevent Inflammation and Colorectal Neoplastic Transformation: A Mechanistic and Dose-Response Study in A Rat Model. *Nutrients*. 11, 2223. <https://doi.org/10.3390/nu11092223>.

Koh, Y.C., Ho, C.T., Pan, M.H., 2020. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *J Food Drug Anal*. 28, 14-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.11.001>.

Komárek, J., Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. – In: Büdel B, Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. Süßwasserflora von Mitteleuropa (19/2), Heidelberg: Elsevier/Spektrum; p.759

Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J., Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia*. 86, 295–335.

Kragelund, B.B., Weterings, E., Hartmann-Petersen, R., Keijzers, G., 2016. The Ku70/80 ring in Non-Homologous End-Joining: easy to slip on, hard to remove. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 21, 514-527. <https://doi.org/10.2741/4406>.

Landis-Piowar, K.R., Iyer, N.R., 2014. Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer Growth Metastasis*. 10, 19-25. <https://doi.org/10.4137/CGM.S11288>.

Lee, C.W., Chen, H.J., Xie, G.R., Shih, C.K., 2019. Djulis (*Chenopodium Formosanum*) Prevents Colon Carcinogenesis via Regulating Antioxidative and Apoptotic Pathways in Rats. *Nutrients*. 10, 2168. <https://doi.org/10.3390/nu11092168>.

Li, S.C., Lin, H.P., Chang, J.S., Shih, C.K., 2019. *Lactobacillus acidophilus*-Fermented Germinated Brown Rice Suppresses Preneoplastic Lesions of the Colon in Rats. *Nutrients*. 11:2718. <https://doi.org/10.3390/nu11112718>.

Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 79, 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.

Magnuson, B.A., Carr, I., Bird, R.P., 1993. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res*. 53, 4499–4504.

Marková, I., Koníčková, R., Vaňková, K., Leníček, M., Kolář, M., Strnad, H., Hradilová, M., Šáchová, J., Rasl, J., Klímová, Z., Vomastek, T., Němečková, I., Nachtigal, P., Vítek, L., 2020. Anti-angiogenic effects of the blue-green alga *Arthrospira platensis* on pancreatic cancer. *J Cellular Mol Med*. 24, 2402–2415. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14922>.

Matsushita, Y., Yamamoto, N., Shirahama, H., Tanaka, S., Yonezawa, S., Yamori, T., Irimura, T., Sato, E., 1995. Expression of sulfomucins in normal mucosae, colorectal adenocarcinomas, and metastases. *Jpn J Cancer Res*. 86, 1060–1067. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1995.tb03021.x>

Mehta, R. S., Song, M., Nishihara, R., Drew, D. A., Wu, K., Qian, Z. R., Fung, T. T., Hamada, T., Masugi, Y., da Silva, A., Shi, Y., Li, W., Gu, M., Willett, W. C., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Ogino, S., Chan, A. T., 2017. Dietary Patterns and Risk of Colorectal

Cancer: Analysis by Tumor Location and Molecular Subtypes. *Gastroenterology*. 152, 1944–1953.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.015>.

Mi, B., Wang, X., Bai, Y., Gong, W., Wang, X., Geng, Y., Wang, J., Zhang, H., Jiang, B., 2009. Beta-catenin expression is altered in dysplastic and nondysplastic aberrant crypt foci of human colon. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 17, 294–300. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318194525c>.

Nolte, T., Brander-Weber, P., Dangler, C., Deschl, U., Elwell, M. R., Greaves, P., Hailey, R., Leach, M. W., Pandiri, A. R., Rogers, A., Shackelford, C. C., Spencer, A., Tanaka, T., Ward, J. M., 2016. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J Toxicol Pathol*. 29(1 Suppl), 1S–125S. <https://doi.org/10.1293/tox.29.1S>

Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., Boutron-Ruault, M. C., Kesse, E., Boeing, H., Bergmann, M. M., Nieters, A., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tountas, Y., Berrino, F., ... Riboli, E., 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 97, 906–916. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji164>.

Otori, K., Sugiyama, K., Hasebe, T., Fukushima, S., Esumi, H., 1995. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res*. 55, 4743–4746.

Ouhtit, A., Ismail, M. F., Othman, A., Fernando, A., Abdraboh, M. E., El-Kott, A. F., Azab, Y. A., Abdeen, S. H., Gaur, R. L., Gupta, I., Shanmuganathan, S., Al-Farsi, Y. M., Al-Riyami, H., Raj, M. H., 2014. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by spirulina. *Am J Pathol*. 184, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.025>.

Papalia, T., Sidari, R., Panuccio, M.R., 2019. Impact of Different Storage Methods on Bioactive Compounds in *Arthrospira platensis* Biomass. *Molecules*. 24, 2810. <https://doi.org/10.3390/molecules24152810>.

Paz, S., Rubio, C., Frías, I., Gutiérrez, Á. J., González-Weller, D., Martín, V., Revert, C., Hardisson, A., 2019. Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere*, 218,879–884. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.165>.

Perše, M., Cera, A., 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol.* 473964. <https://doi.org/10.1155/2011/473964>.

Pierre, F., Santarelli, R., Taché, S., Guéraud, F., Corpet, D. E., 2008. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr.* 99, 1000–1006. <https://doi.org/10.1017/S0007114507843558>.

Ponka, P., 1999. Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 318, 241–256. <https://doi.org/10.1097/00000441-199910000-00004>.

Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.F., De Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R., 2002. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* 35, 351–355. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002000300010>.

Roy-Lachapelle, A., Sollicec, M., Bouchard, M.F., Sauvé, S., 2017. Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements. *Toxins.* 9: 76. <https://doi.org/10.3390/toxins9030076>.

Rúbio, C., Dominik-Jakubiec, M., Paz, S., Gutiérrez, A.J., González-Weller, D., Hardisson, A., 2020. Dietary exposure to trace elements (B, Ba, Li, Ni, Sr, and V) and toxic metals (Al, Cd, and Pb) from the consumption of commercial preparations of *Spirulina platensis*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 28, 22146–22155. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12260-3>.

Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 28, 289–309. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00223-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00223-3).

Sakata, T., von Engelhardt W., 1981. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. *Cell Tissue Res.* 219, 629-635. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00223-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00223-3).

Saini, M.K., Vaiphei, K., Sanyal, S.N., 2012. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycocyanin. *Mol Cell Biochem.* 361, 217–228. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1106-9>.

Saini, M.K., Sanyal, S.N., 2014. Piroxicam and C-phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ β -catenin signaling while

up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR γ . *Biomed Pharmacother*, 68, 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.03.007>.

Santarelli, R.L., Pierre, F., Corpet, D.E., 2008. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 60, 131–144. <https://doi.org/10.1080/01635580701684872>.

Santarelli, R. L., Vendeuvre, J. L., Naud, N., Taché, S., Guéraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D. E., & Pierre, F. H., 2010. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)*.;3, 852-864. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0160>.

Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B. A., Belay, A., Wilmotte, A., 1999. *Arthrospira (Spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol Lett*. 172, 213–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13471.x>.

Shuman Moss, L.A., Jensen-Taubman, S., Stetler-Stevenson, W.G., 2012. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J Pathol*.;181, 1895-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.044>.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., Jemal, A., 2020. Colorectal cancer statistics,. *CA Cancer J Clin*. 70, 145-164. <https://doi.org/10.3322/caac.21601>.

Sili, C., Torzillo, G., Vonshak, A., 2012. Chapter 25, *Arthrospira (Spirulina)*. In: Whitton BA *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. 1st Ed. Durham: Springer,. p. 677-701.

Śmieszek, A., Giezek, E., Chrapiec, M., Murat, M., Mucha, A., Michalak, I., & Marycz, K., 2017. The Influence of *Spirulina platensis* Filtrates on Caco-2 Proliferative Activity and Expression of Apoptosis-Related microRNAs and mRNA. *Mar Drugs*. 15, 65. <https://doi.org/10.3390/md15030065>.

Smith, B., Butler, M., 1974. The autonomic control of colonic mucin secretion in the mouse. *Br J Exp Pathol*. 55, 615-621.

Spicer, S.S., 1960. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J Histochem Cytochem*. 8, 18-35. <https://doi.org/10.1177/8.1.18>.

Steward, W.P., Brown, K., 2013. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer*. 109, 1–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.280>.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 2000. Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 21,1319–1327. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.5.319>.

Teoh, N. C., Dan, Y. Y., Swisshelm, K., Lehman, S., Wright, J. H., Haque, J., Gu, Y., Fausto, N., 2008. Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology*. 47, 2078–2088. <https://doi.org/10.1002/hep.22194>.

Wang, R., Dashwood, W. M., Nian, H., Löhr, C. V., Fischer, K. A., Tsuchiya, N., Nakagama, H., Ashktorab, H., Dashwood, R. H., 2011. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Int J Cancer*. 128, 2581-2590. <https://doi.org/10.1002/ijc.25610>.

Wargovich, M. J., Jimenez, A., McKee, K., Steele, V. E., Velasco, M., Woods, J., Price, R., Gray, K., & Kelloff, G. J. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis*, 2000. 21 1149–55.

Wong, S. H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Xiao, X., Kwong, T., Tsoi, H., Wu, W., Zeng, B., Chan, F., Sung, J., Wei, H., Yu, J. Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology*, 2017.153, 1621–1633.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.022>.

Wong, S. H., Yu, J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 2019. 16, 690–704. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>.

Xiao, H., Hao, X., Simi, B., Ju, J., Jiang, H., Reddy, B. S., Yang, C. S., 2008. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic

changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis*. 29, 113–119. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm204>.

Yogianti, F., Kunisada, M., Nakano, E., Ono, R., Sakumi, K., Oka, S., Nakabeppu, Y., Nishigori, C., 2014. Inhibitory effects of dietary spirulina platensis on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 134, 2610–2619.

Figures & Tables

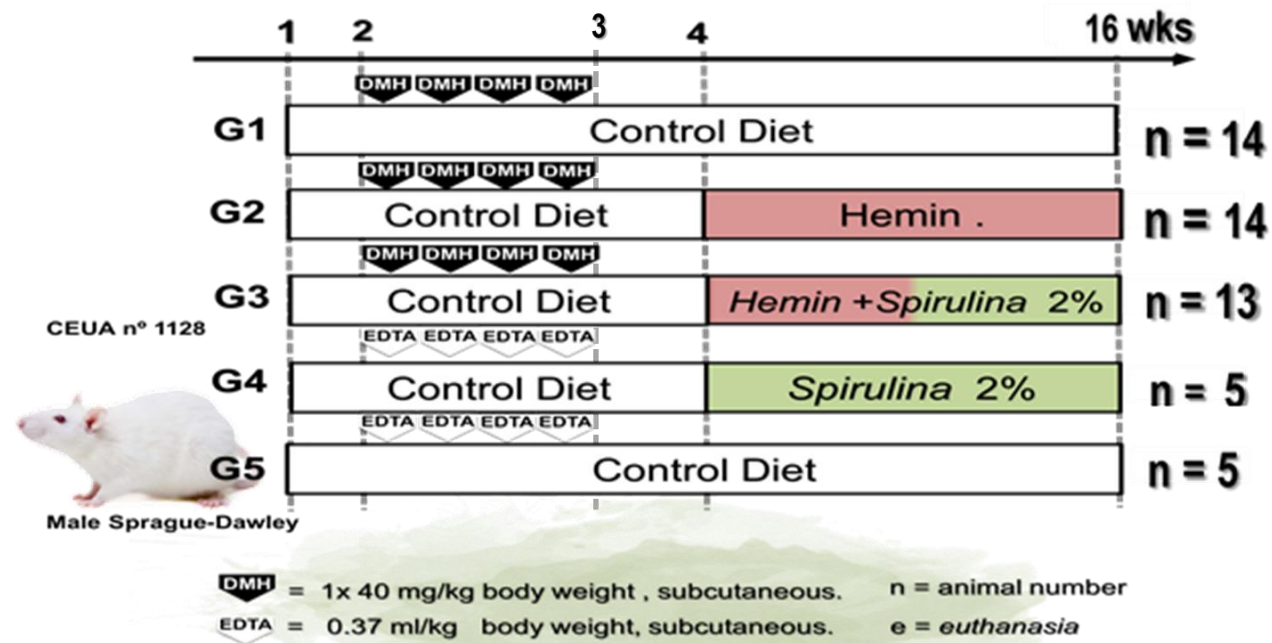


Figure 1 – Experimental design (for details see Materials and Methods section).

Table 1 - Data from general parameters evaluated in the different groups during the animal experiment.¹

Parameters	Groups/Treatment ²				
	DMH (G1, n=14)	DMH+hemin (G2, n=14)	DMH+hemin+2%SP (G3, n=13)	2%SP (G4, n=5)	EDTA (G5, n=5)
Final body weight (g)	442.6 ± 36.9	453.9 ± 26.2	441.6 ± 24.2	444.8±40.3	430.6±14.1
Body weight gain (g)	236.7 ± 27.3	247.4 ± 21.8	226.4 ± 19.3	245.2 ± 30.3	230.21 ± 17.4
Food consumption (g/rat/day)	24.5 ± 1.9	25.0 ± 2.7	23.1 ± 2.0*	23.9 ± 2.0	23.8 ± 2.4
Absolute liver weight (g)	13.9 ± 1.6	14.5 ± 1.2	14.4 ± 0.8	14.1 ± 2.2	13.9 ± 1.3
Relative liver weight (%)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2

¹ Data are mean ± S.D. n = number of animals; ² DMH = 1,2 dimethylhydrazine (4 x 40mg/kg,s.c., twice a week); 2%SP= *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* powder incorporated into chow diet (20g/kg, w/w), hemin: 0.32 g/kg incorporated into chow (0.5mmol/kg) b.w., for 16 weeks * Different from G2 group, p < 0.05. (ANOVA followed by post hoc Turkey's test)

Table 2. Effects of 2% SP feeding on the preneoplastic aberrant crypt foci development during promotion of colon carcinogenesis

Groups/Treatments ¹	Total number ²		ACF multiplicity (AC/ACF) ³	ACF classes ⁴	
	AC	ACF		2-4 AC	≥ 4 AC
DMH (G1)	625.57±182.99	113.14±26.87	5.47±0.51	55.00 [48.00-63.00]	172.71±45.54
DMH+hemin (G2)	838.64±249.94*	144.14±42.21*	5.85±0.40	66.00 [46.00-84.00]	225.07±65.08*
DMH+hemin+2% SP (G3)	420.31±140.10***	83.39±26.54**	5.03±0.57**	46.00 [31.00-55.25]**	123.85±40.73***
p-value⁵	< 0.001	< 0.001	< 0.001	= 0.025	< 0,001

¹Values are shown as mean ± standard deviation or median and 25% and 75% quartile. n = 13-14 rats/group. ²DMH = 1,2 dimethylhydrazine (4 x 40mg/kg,s.c., twice a week); 2%SP= Arthrospira (Spirulina platensis) spp. powder incorporated into chow (20g/kg, w/w), hemin: 0.32 g/kg incorporated into chow (0.5mmol/kg) b.w., for 16 weeks; ³ACF= aberrant crypt foci; AC= aberrant crypt. ²Mean number of AC or ACF per rat; ³Mean number of AC per ACF; ⁴Mean or median number of each ACF class per rat. Data was analyzed using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis followed by Tukey's or Dunn's test for parametrical or non-parametrical data. respectively (p<0.05).

* Different from G1 group, ** Different from G2, *** Different from G1 & G2; p < 0.05. (ANOVA followed by post hoc Turkey's test).

Table 3. Effects of 2% SP feeding on neoplastic lesions during the promotion/progression stages of colon carcinogenesis.

Group/Treatments ¹	Tumor incidence ²	Number of tumors (Multiplicity) ³	% Tumor histological types ⁴	
			Adenomas	Adenocarcinomas
DMH (G1)	4/14 (29%)	5 (0 [0-1])	4/5 (80%)	1/5 (20%)
DMH+hemin (G2)	9/14 (64%)	14 (1 [0-1])	7/14 (50%)	7/14 (50%)
DMH+hemin+2% SP (G3)	3/13 (23%)	3 [0-0.25])	1/3 (33%)	2/3 (67%)

¹DMH: 4 × 40 mg/kg b.w.; 2% SP: 20 g/kg chow for 16 weeks, hemin: 0.32 g/kg chow (0.5 mmol/kg) b.w., for 16 weeks, n =13-14 rats/group. ²Percentage of tumor-bearing rats, considering benign or malignant tumors. ³Multiplicity of tumors was analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's (p<0.05). ⁴Percentage of each tumor type (benign and malignant) based on the total number of tumors observed in each group. Incidence data were analyzed by Fisher's exact test (p<0.05).

Table 4. qRT-PCR analysis in colon samples

Comparison	Gene	Cellular Process	Fold Change
DMH+hemin (G2) vs DMH (G1)	Matrix metalloproteinase 3 (<i>Mmp3</i>)	Endopeptidase that degrades extracellular matrix proteins	5.7
	NADPH oxidase 1 (<i>Nox 1</i>)	Involved in ROS generation such as superoxide or hydrogen peroxide	2.4
DMH+hemin+2%SP (G3) vs DMH+hemin (G2)	X-ray repair cross-complementing 6 (<i>Xrcc6</i>)	DNA targeting component of the DNA-dependent protein kinase complex. Plays a role in DNA double-strand break repair.	1.5

n=5 rats/group. Relative expression was determined by normalization with Beta-Actin (*Actb*), Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*Gapdh*), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt1*), and Glucuronidase beta (*Gusb*) genes. Data were analyzed by Student's t-test. P-value of the comparisons are listed as follow: (G2) DMH+hemin vs (G1) DMH: *Mmp3* - p = 0.008; *Nox 1* - p = 0.013. (G3) DMH+hemin+2%SP vs (G2) DMH+hemin: *Xrcc6* – p = 0.04

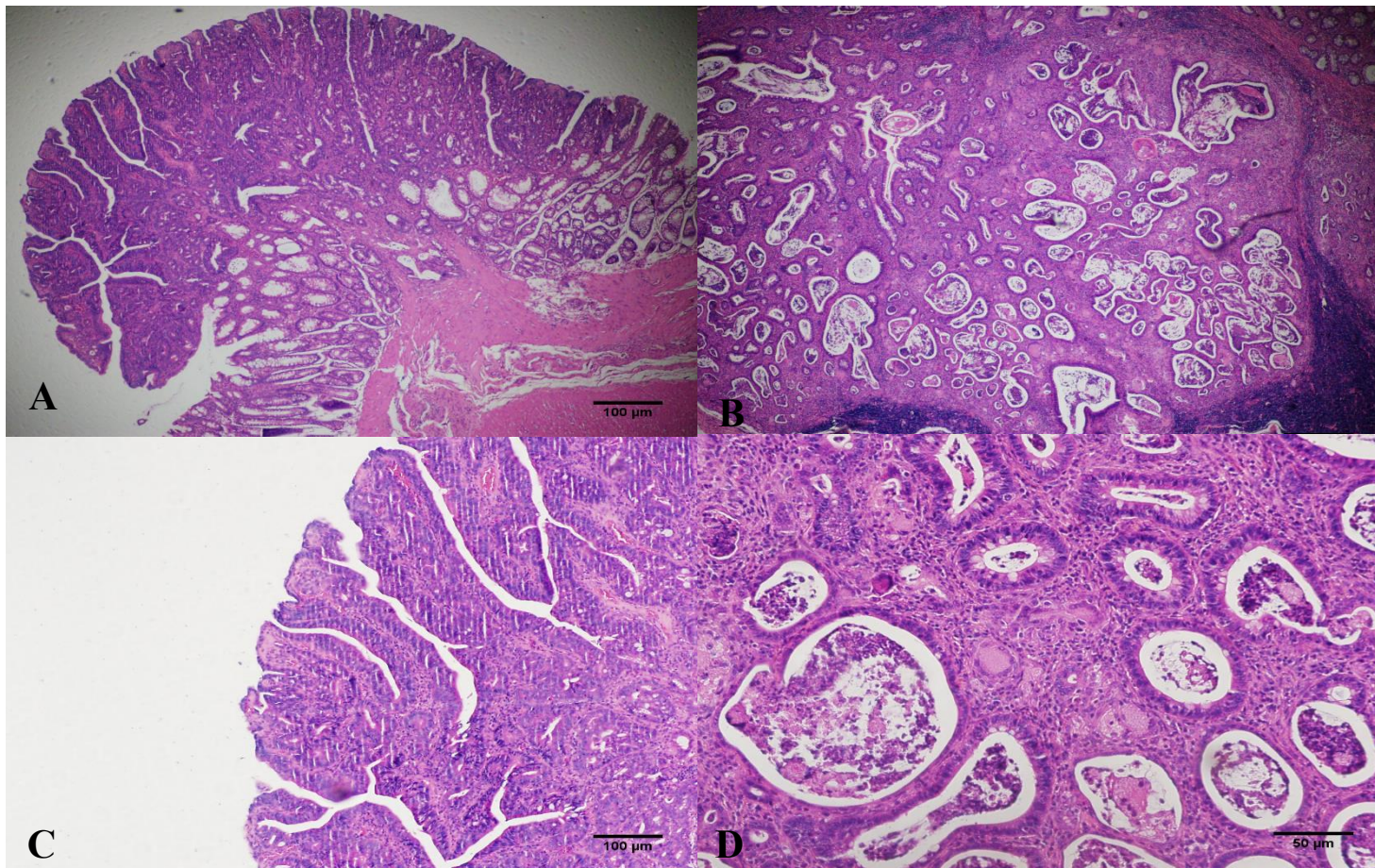


Figure 2 –Rat colon adenomas (A,C) and adenocarcinomas (B,D) in H&E section detected in 1,2 dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis model. a- serrated adenoma at 40x magnification light microscope. b – adenocarcinoma at 40x magnification. c –magnification of serrated adenoma (a) at 100x. d –magnification of necrotic debris surrounded by stromal tissue in adenocarcinoma at 20x.

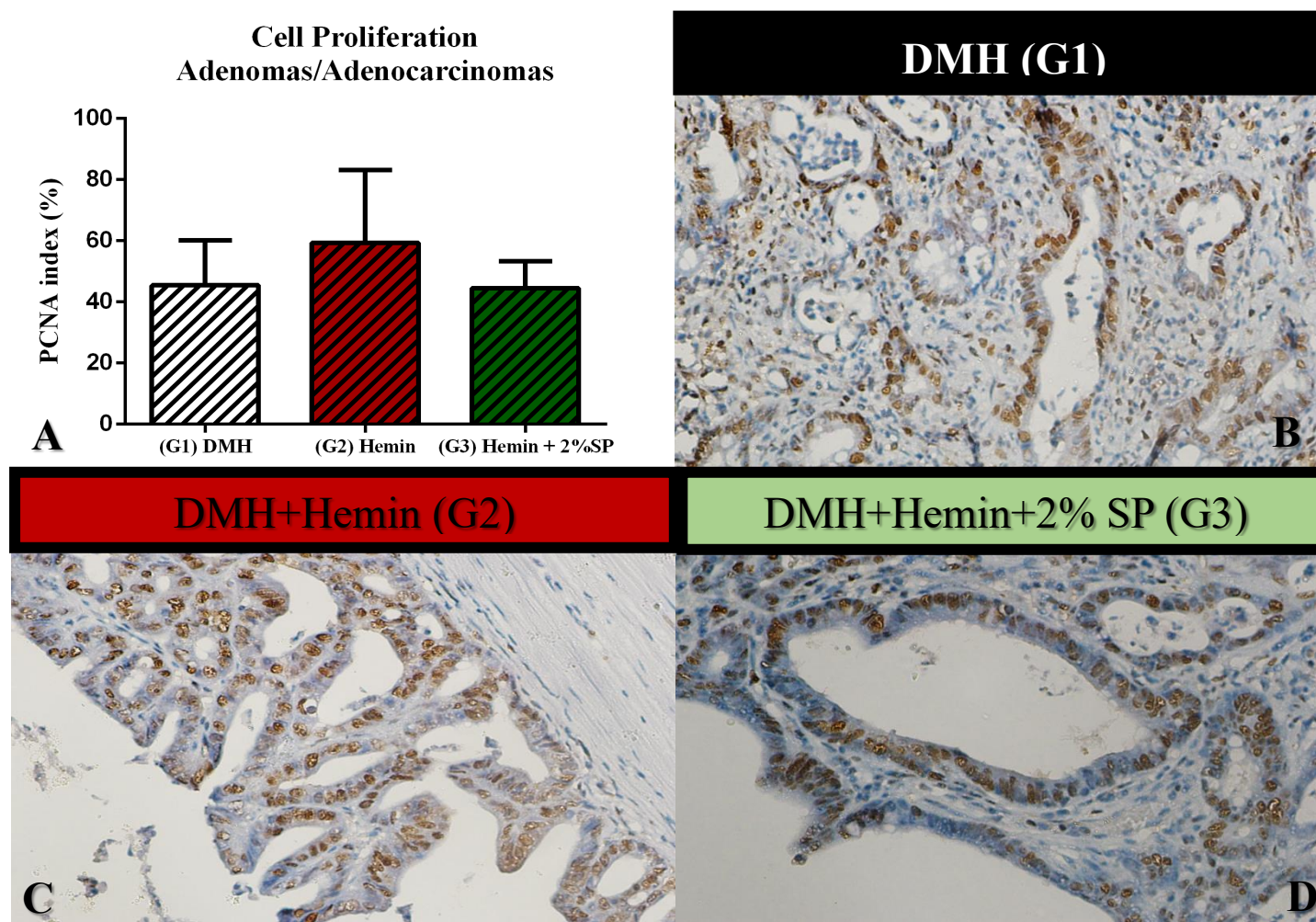


Figure 3 – **A** Cell proliferation labeling index in tumor sections for PCNA immunohistochemistry. (IHC). **N° of tumors:** G1 = 5; G2 = 10; G3 = 3. **B,C & D.** IHC representation of colonic tumor sections for PCNA (40x objective). DMH = 1,2 dimethylhydrazine (4 x 40mg/kg,s.c., twice a week) SP2% = *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) spp. powder incorporated into chow (20g/kg, w/w), hemin: 0.32 g/kg incorporated into chow (0.5mmol/kg) b.w., for 16 weeks. Data are presented as mean + SD (p < 0.05).

DMH (G1)

DMH+Hemin (G2)

DMH+Hemin+SP2 (G3)

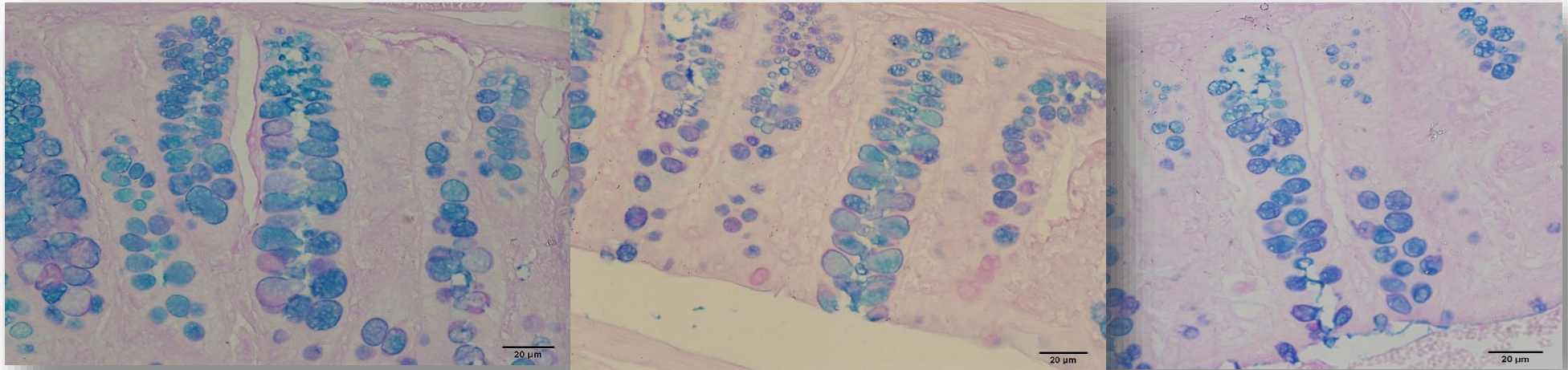


Figure 4. Effects of hemin and 2% SP on sulphated-acidic mucins (blue) on Alcian-Blue/Periodic Acid Schiff (AB/PAS) in DMH-induced colon carcinogenesis at week 16. DMH = 1,2 dimethylhydrazine (4 x 40mg/kg,s.c., twice a week) SP2% = *Arthrospira (Spirulina platensis) spp.* powder incorporated into chow (20g/kg, w/w), hemin: 0.32 g/kg incorporated into chow (0.5mmol/kg) b.w., for 16 weeks; n = 10 rats/group.

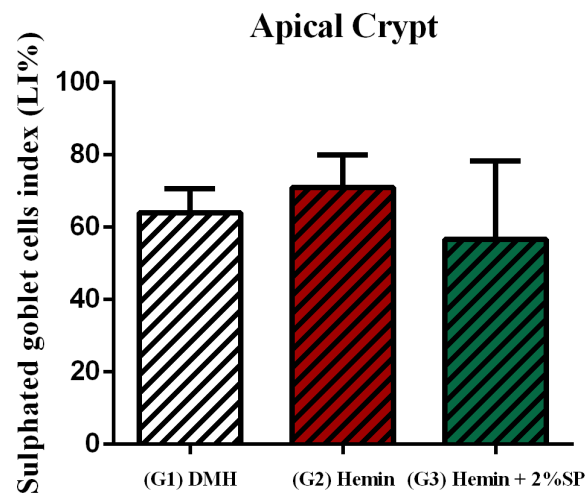


Figure 5 - Effects of hemin and 2% SP on sulphomucin expression in apical crypt goblet cells. DMH-treated groups (diagonal lines). Data are presented as mean+SD ($p < 0.05$).

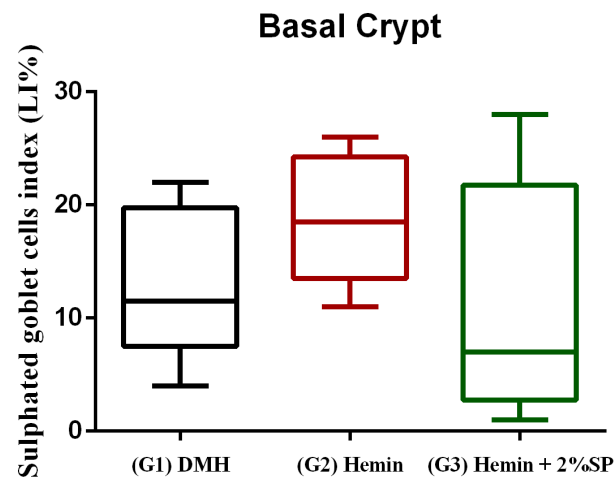


Figure 6 - Effects of hemin and 2% SP on sulphomucin expression in basal crypt goblet cells. DMH-treated groups (diagonal lines). Data are presented as median (25% and 75% quartiles) ($p < 0.05$).

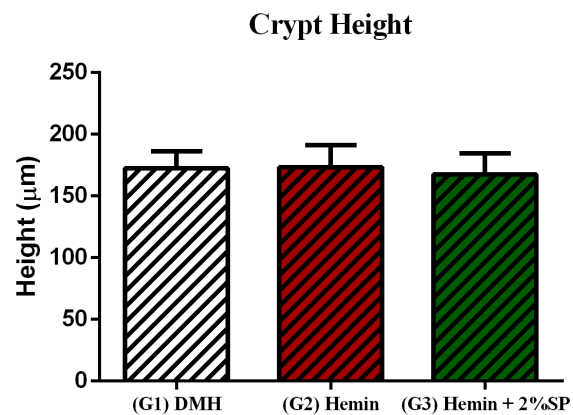


Figure 7 - Effects of hemin and 2% SP on sulphomucin expression in basal crypt goblet cells. DMH-treated groups (diagonal lines). Data are presented as mean+SD ($p < 0.05$).

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos da ingestão de *Spirulina platensis* na carcinogênese de cólon: modulação de lesões pré e neoplásicas e do perfil de expressão gênica", Protocolo nº 1128-CEUA, sob a responsabilidade de **Luis Fernando Barbisan**, 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) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	☐ Ensino	☒ Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 04/2/2019	Término: 04/2/2020
Espécie/linhagem:	Rato Sprague-Dawley	
Nº de animais:	125	
Peso:	150-170g	Idade: 45 a 60 dias
Sexo:	Macho	
Origem	CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP – Campinas/SP - CNPJ: 46.068.425/0001-33	

Botucatu, 23 de novembro de 2018.


Prof. Assoc. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da CEUA



Supplementary Table 1 – List of 95 genes analyzed on qRT-PCR assay.

	Unigene	GeneBank	Symbol	Gene Function	Process*
01	Rn.220465	NM_053683.1	Nox1	involved in superoxide generation and serum-stimulated growth	1
02	Rn.14744	NM_053524.1	Nox4	enzyme involved in the production of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells	1
03	Rn.214048	NM_001106821.1	Atm	serine/threonine protein kinase; critical regulator of the cellular DNA damage response	1,2
04	Rn.33267	NM_080400.1	Chek1	protein kinase that can bind to single-stranded DNA; function in DNA replication and repair	2,3
05	Rn.163213	NM_053677.1	Chek2	kinase involved in ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway	2,3
06	Rn.11763	NM_031683.1	Smc1a	structural maintenance of chromosomes (SMC) protein	2
07	Rn.11327	NM_013063.2	Parp1	plays a role in DNA repair and genome stability	2
08	Rn.161996	NM_139080.2	Xrcc6	DNA targeting component which plays a role in DNA double strand break repair	2
09	Rn.10250	NM_024127.2	Gadd45a	may mediate a delay in G2 to M cell cycle progression; may induce DNA repair	2
10	Rn.208255	NM_001012742.1	Wee1	G2 checkpoint kinase	2,4
11	Rn.22279	NM_171992.4	Ccnd1	regulatory subunit of CDK4 or CDK6; regulation of the G1/S transition of the cell cycle	2,4
12	Rn.3174	NM_031058.1	Msh2	mismatch repair protein	2
13	Rn.91239	NM_022231.2	Xiap	involved in directly inhibiting key apoptotic proteases, caspase 3 and 7	3
14	Rn.54443	NM_030989.3	Tp53	regulates cell cycle arrest, apoptosis, senescence and DNA repair	2,3,4

15	Rn.9996	NM_016993.1	Bcl2	an anti-apoptotic protein; involved in inhibiting cell death in many different cell types	3,4
16	Rn.10668	NM_017059.2	Bax	Bcl2-related gene; involved in the regulation of apoptotic cell death	3
17	Rn.31142	NM_022684.1	Bid	involved in inducing Bax oligomerization in isolated mitochondrial outer membranes	3
18	Rn.10426	NM_032080.1	Gsk3b	mediates Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex regulation; may induce apoptosis	3
19	Rn.162521	NM_139194.2	Fas	Tnfsf6/Fasl receptor – cleaved caspase pathway	3
20	Rn.10562	NM_012922.2	Casp3	apoptotic protease that may play a role in cell death regulation and other apoptotic processes	3
21	Rn.54474	NM_022277.1	Casp8	mediates the final stage of apoptosis involved in apoptosis induced by Fas and other stimuli	3
22	Rn.67077	NM_053362.1	Dffb	endonuclease; mediates caspase-3-dependent internucleosomal DNA degradation	3
23	Rn.11183	NM_001109986.1	Ddit3	plays a role in the ER stress response	3
24	Rn.34914	NM_053842.1	Mapk1	kinase involved in intracellular signaling; component of Mapk signaling pathway	4
25	Rn.2592	NM_017347.2	Mapk3	kinase involved in intracellular signalling; component of Mapk signalling pathway	3,4
26	Rn.88085	NM_031020.2	Mapk14	involved in intracellular signalling, inhibition of apoptosis and gene activation	2,3
27	Rn.203165	NM_031356.1	Aifm1	mitochondrion-associated; may facilitate chromatin condensation and DNA degradation	2,3
28	Rn.24554	NM_031515.3	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily	4
29	Rn.10089	NM_080782.3	Cdkn1a	a Cdk inhibitor; involved in negative regulation of the cell cycle	4
30	Rn.29897	NM_031762.3	Cdkn1b	inhibits the activity of cyclin-CDK complexes and plays a role in cell cycle control	4
31	Rn.112601	NM_053357.2	Ctnbb1	involved in mediating the interaction between cadherins and the actin cytoskeleton	4,6
32	Rn.1303	NM_031334.1	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation	4

33	Rn.40136	NM_021578.2	Tgfb1	binds the TGFbeta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation	4
34	Rn.44228	NM_019216.2	Gdf15	member of the TGF-beta superfamily of growth factors	4
35	Rn.13094	NM_053702.3	Ccna1	human homolog plays a role in regulation of DNA synthesis and of mitosis	4
36	Rn.233802	NM_001271366.1	Mki67	Marker of cell proliferation Ki-67	4
37	Rn.9485	NM_001004206.1	Pa2g4	may be involved in coordinating ribosome biosynthesis and cell proliferation	4
38	Rn.37227	NM_031507.1	Egfr	promotes cell proliferation and differentiation; mediates GPCR induction of protein synthesis	4
39	Rn.33262	NM_012639.2	Raf1	acts as a mitogenic protein kinase; mutant forms may play a role in transformation	4
40	Rn.3360	NM_030846.	Grb2	acts as a link between tyrosine kinase receptors and Ras signaling	4
41	Rn.11422	NM_033230.2	Akt1	inhibits JUN kinase activation and mediates inhibition of apoptosis	3,4
42	Rn.87066	NM_017093.1	Akt2	may be involved in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) mediated signaling	3,4
43	Rn.88057	NM_012499.1	Apc	binds microtubules; may play a role in the regulation of cell polarity	7
44	Rn.10666	NM_012841.1	Dcc	Deleted in colorectal cancer; play dual roles as receptor e other signaling pathways	4,7
45	Rn.2755	NM_001277450.1	Smad2	transcriptional mediator for both activin and TGF-beta	4
46	Rn.9774	NM_019275.2	Smad4	transduces signal from TGF-beta; deletion of is associated with pancreatic carcinomas	4
47	Rn.29980	NM_030858.1	Smad7	negative regulator of TGF-beta and activin	4
48	Rn.223092	XM_001059030.4	Wnt2	play a role in regulation of cell growth, differentiation, and tumorigenesis	4
49	Rn.23354	NM_053369.1	Tcf4	transcription factor that acts as an enhancer of the rat tyrosine hydroxylase gene	4
50	Rn.228611	NM_130429.1	Lef1	Enhancer binding factor has 98% amino acid homology with mouse Lef-1	4

51	Rn.10247	NM_012747.2	Stat3	plays a role in induction of gene expression during acute phase response	4
52	Rn.10957	NM_052807.2	Igf1r	receptor for Igf-1; involved in induction of cell cycle progression and survival in many cell types	4
53	Rn.10617	NM_031517.2	Met	hepatocyte growth factor receptor; functions as a heterodimeric tyrosine kinase	4
54	Rn.10468	NM_017017.2	Hgf	plays a role in positive regulation of cell proliferation; may promote the cell cycle	4
55	Rn.2411	NM_001276711.1	Nfkb	protein-specific transcription inhibitor and binding subunit of NFKB complex	6
56	Rn.214715	NM_199103.1	Ikbkg	regulatory subunit of the I kappa B kinase complex, which phosphorylates and activates	6
57	Rn.1109	NM_022507.1	Prkcz	key process in tumor invasion, through NFKB	6,4
58	Rn.10019	NM_016996.1	Casr	involved in regulating the secretion of parathyroid hormone, bile and intestinal fluid	4
59	Rn.6975	NM_013154.2	Cebpd	transcriptional activator and may be involved in glucose-mediated regulation of iNOS	1
60	Rn.44462	NM_017095.1	Cebpe	transcriptional activator; may mediate cytokine gene expression in mature cells	1
61	Rn.10332	NM_012831.1	Cebpg	binds to the promoter and enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene; regulate transcription	4
62	Rn.93714	NM_021835.3	Jun	transcription factor; acts as a protooncogene	4
63	Rn.90997	NM_013165.2	Cckbr	stimulating phosphatidylinositol turnover and intracellular calcium mobilization.	4
64	Rn.25046	NM_001105721.1	Notch1	involved in cell-cell interactions important for development and pattern formation	4
65	Rn.65930	NM_024358.1	Notch2	transmembrane protein that may be involved in cellular interactions that specify cell fate	4
66	Rn.88804	NM_019147.1	Jag1	ligand responsible for activating Notch1	4
67	Rn.1923	NM_001110333.2	Vgfa	Induces angiogenesis, vasculogenesis, endothelial cell growth, promotes cell migration	5
68	Rn.10852	NM_024359.1	Hif1a	regulates transcription in response to low oxygen; may play a role in vascular biology	5

69	Rn.6422	NM_031054.2	Mmp2	plays important roles in angiogenesis, platelet aggregation, and tumor metastasis	5,6
70	Rn.32086	NM_133523.2	Mmp3	endopeptidase that degrades extracellular matrix proteins	6
71	Rn.10282	NM_012864.2	Mmp7	enzyme that cleaves the alpha 2(I) chain of rat gelatin	6
72	Rn.10209	NM_031055.1	Mmp9	metalloproteinase involved in extracellular matrix remodeling	6
73	Rn.10371	NM_031056.1	Mmp14	enzyme which is an activator of progelatinase A	6
74	Rn.1699	NM_019153.3	Fbln5	vascular growth and maturation during development and in lesions of injured vessels	5,6
75	Rn.88869	NM_013062.1	Kdr	receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF)	5,6
76	Rn.9159	NM_001105737.1	Tek	mediates development of embryonic vasculature; plays a role in tumors wounds	5,6
77	Rn.5840	NM_022588.1	Mta1	high expression of this protein correlates with the metastatic potential of cells	6
78	Rn.38434	NM_021759.1	Lypd3	GPI anchored protein; has a role in metastasis formation and matrix remodeling	6
79	Rn.1604	NM_019143.2	Fn1	extracellular matrix component; may play a role in fibrosis and tumor metastasis	6
80	Rn.62616	NM_001191609.1	Lama5	an extracellular matrix glycoprotein involved in cell migration and differentiation	6
81	Rn.106481	NM_138541.1	Epcam	involved in metastasis formation and tumor progression	4,6
82	Rn.1120	NM_012924.2	Cd44	adhesion molecule involved in migration that also plays a role in cellular metastasis	6
83	Rn.81938	NM_001191775.1	Macc1	metastasis-associated in colon cancer, key regulator of the HGF/MET pathway	6
84	Rn.9868	NM_012854.2	IL10	factor involved in the inhibition of cytokine synthesis	7
85	Rn.11118	NM_019165.1	IL18	a pro-inflammatory cytokine; acts as a modulator of immune functions	7
86	Rn.10795	NM_138880.2	Ifng	an immune molecule produced by T lymphocytes in response to mitogens	7

87	Rn.3160	NM_012580.2	Hmox1	catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin	7
88	Rn.11423	NM_001278475.1	Ptger1	binds prostaglandin E2; plays a role in G-protein receptor signaling and Ca ²⁺ mobilization	7
89	Rn.10264	NM_031088.1	Ptger2	binds prostaglandin E2 and induces increased cAMP	7
90	Rn.1923	NM_001110333.2	Vgfa	Induces angiogenesis, vasculogenesis, endothelial cell growth, promotes cell migration	4,5,6
91	Rn.90085	NM_001033955.1	Calca	an inhibitor of lactotroph function and a potent vasodilator	8
92	Rn.22168	NM_001277055.1	Ngfb	Nerve growth factor	4,8
93	Rn.44609	NM_012655.2	Sp1	transcription factor; plays a role in transcriptional regulation of many genes	8
94	Rn.9989	NM_012761.1	Sp4	C2H2 zinc finger protein that binds the AT-rich HF-1b/MEF-2 site; transcriptional activator	8
95	Rn.3073	NM_031982.1	Trpv1	ion channel that demonstrates heat-evoked membrane currents	8

