



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

Sara Gomes Espírito Santo

**Papéis da conexina 43 e panexina 1 durante
o processo de carcinogênese do cólon**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo
Coorientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

**Botucatu
2023**

Sara Gomes Espírito Santo

Papéis da conexina 43 e panexina 1 durante
o processo de carcinogênese do cólon

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo
Coorientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Espírito Santo, Sara Gomes.

Papéis da conexina 43 e panexina 1 durante o processo de carcinogênese do cólon / Sara Gomes Espírito Santo. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Guilherme Ribeiro Romualdo

Coorientador: Luís Fernando Barbisan

Capes: 40105008

1. 1,2-Dimetilidrazina. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer. 3. Conexina 43. 4. Focos de Criptas Aberrantes. 5. Proteínas de membrana. 6. Carcinogênese.

Palavras-chave: 1,2-dimetilhidrazina; Câncer colorretal; Conexina 43; Foco de cripta aberrante; Panexina 1.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e a Universidade Estadual Paulista (UNESP), por todas as oportunidades, vivências engrandecedoras e suporte que possibilitaram a realização dos meus estudos. Nesse agradecimento, gostaria de contemplar todos os funcionários envolvidos de forma direta e indireta nesse trabalho, por meio das mais variadas atribuições que permitem o funcionamento adequado da universidade e que muitas vezes ocupam um lugar invisível, mesmo com tamanha importância. Gostaria de agradecer também a toda comunidade científica que busca intensamente por respostas verdadeiras, que precisa lutar pelo seu espaço e pela sua existência no Brasil, e que me permitiu ter esperança em momentos tão sombrios como na pandemia provocada pela COVID-19.

Agradeço imensamente meu orientador Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo e meu coorientador Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, que me acolheram no primeiro semestre da graduação e sempre me apoiaram, acreditaram e investiram em mim. Agradeço pela enorme bagagem de conhecimento que compartilharam comigo, pelo incentivo para arriscar e chegar em lugares que sozinha nunca imaginei, pelas celebrações das minhas vitórias e tantas outras coisas que vão muito além. Pra mim foi uma honra poder aprender com vocês e notar o meu crescimento profissional assim como o de vocês ao longo dos anos. Agradeço também a todos os meus amigos do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE), que compartilharam rotina comigo e vão ser únicos na minha história. Obrigada pelo auxílio durante os experimentos, os conselhos, risadas e todos os momentos singulares que vivemos juntos.

Agradeço com todo amor as pessoas que fazem parte da minha vida e contribuíram indiretamente com esse trabalho, como a minha mãe, Dorine, que foi minha maior estrutura durante esses anos. Minha irmã, Ane, minha maior parceria de vida e meu colo. Minha irmã, Mariana, por ser doce e alegria sempre. Meus amigos de infância, Maria Eduarda e Matheus, por oferecerem amparo aos meus desabafos e tornarem as coisas mais leves. Meu maior companheiro, Luan, por viver essa jornada ao meu lado e provocar muitos risos. Minha psicóloga, Mariana, por transformar a minha vivência e me auxiliar a encontrar o meu caminho. Sou imensamente grata a todas as pessoas quem compõem a minha rede de apoio, inclusive aquelas que já se foram, por contribuírem com o meu crescimento. Agradeço também as pessoas que chegarão até aqui por algum motivo e dedicarem parte do seu tempo para ler o meu trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 88887.600918/2021-00 & 88887.716728/2022-00), pelo financiamento desse trabalho.

Resumo

O Câncer Colorretal (CCR) é o quarto tipo de câncer mais incidente e terceiro mais letal no mundo. Sua etiologia é multifatorial, predominantemente esporádica e está associada ao estilo de vida do paciente. O início dessa doença é morfológicamente caracterizado pelo desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas: focos de criptas aberrantes (FCA), que evoluem para adenomas e posteriormente para o CCR. A Conexina 43 (Cx43) e a Panexina 1 (Panx1) são proteínas formadoras de hemicanais envolvidos em diferentes funções biológicas, além de ambas poderem atuar estimulando ou inibindo a carcinogênese, conforme o tipo e estágio do câncer. No entanto, pouco se sabe sobre a ação dessas proteínas no CCR, onde suas funções ainda devem ser compreendidas. Portanto, este trabalho avaliou o papel da Cx43 e da Panx1 sob os estágios iniciais da carcinogênese colorretal. Para tanto, fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6J heterozigotos para Cx43^{+/-}, *knockout* (KO) para Panx1^{-/-} ou *wild type*, foram submetidas a um modelo de carcinogênese colorretal quimicamente induzida por seis aplicações intraperitoneais de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg). Os animais foram eutanasiados oito horas (semana 7) ou 30 semanas (semana 37) após a última aplicação de DMH, tempo estipulado para avaliar a toxicidade colônica subaguda e o desenvolvimento de lesões (pré)neoplásicas, respectivamente. Na semana 7, a deficiência em Cx43 não promoveu alterações colônicas pelos efeitos deletérios induzidos pela DMH, enquanto que o KO para Panx1 aumentou a genotoxicidade em sangue periférico, os níveis de malondialdeído no cólon e a apoptose nas criptas colônicas. Na semana 37, os camundongos Cx43^{+/-} apresentaram um aumento na multiplicidade de FCA, mas nenhuma alteração foi observada quanto a incidência, multiplicidade, volume, proliferação, crescimento e na imunoexpressão da β -catenina em adenomas colorretais. Já os animais Panx1^{-/-} apresentaram aumento no número médio de criptas aberrantes (CA), FCA e na multiplicidade de CA/FCA. Similar aos resultados encontrados, a avaliação *in silico* de adenomas humanos não revelou correlação da expressão da Cx43 com marcadores de proliferação, apoptose e β -catenina. Os resultados indicam um papel discreto da Cx43 e um possível papel protetivo da Panx1 nos estágios iniciais da carcinogênese colorretal quimicamente induzida em camundongos.

Palavras-chave: Câncer Colorretal, Adenoma Colorretal, Foco de Cripta Aberrante, Camundongo C57BL/6J, 1,2-dimetilhidrazina, Conexina 43, Panexina 1.

Abstract

Colorectal Cancer (CRC) is the fourth most incident and third most lethal cancer type in the world. Its etiology is multifactorial, predominantly sporadic and associated with the patient's lifestyle. The onset of this disease is morphologically characterized by the emergence of pre-neoplastic lesions: aberrant crypt foci (ACF), which evolve into adenomas and later into CRC. Connexin 43 (Cx43) and Pannexin 1 (Panx1) are hemichannel-forming proteins involved different biological functions, and both may act inducing or inhibiting carcinogenesis, depending on the type and stage of cancer. However, little is known about the action of these proteins in CRC, where their functions still need to be understood. Therefore, this work evaluated the role of Cx43 and Panx1 in the early stages of colorectal carcinogenesis. For that, female C57BL/6J mouse heterozygous for Cx43^{+/-}, knockout (KO) for Panx1^{-/-} or *wild type*, were submitted to a chemically induced colorectal carcinogenesis model induced by six intraperitoneal applications of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 20 mg/kg). The animals were euthanized eight hours (week 7) or 30 weeks (week 37) after the last application of DMH, timepoints were stipulated to evaluate the subacute colonic toxicity and (pre)neoplastic lesions development, respectively. At week 7, Cx43 deficiency did not modify colonic DMH-induced deleterious effects, while Panx1 KO increased genotoxicity in peripheral blood, malondialdehyde levels in the colon, and apoptosis in colonic crypts. At week 37, Cx43^{+/-} mice had an increase in ACF multiplicity, but no alterations were observed in the incidence, multiplicity, volume, proliferation, growth, and in β -catenin immunoexpression in colorectal adenomas. The Panx1^{-/-} animals had an increase in the number aberrant crypts (AC), ACF, and AC/ACF multiplicity. Similar to the *in vivo* findings, the *in silico* evaluation of human adenomas did not revealed a correlation of Cx43 expression with proliferation markers, apoptosis and β -catenin. The results indicate a discrete role for Cx43, and a potential protective role for Panx1 in the early stages of chemically induced colorectal carcinogenesis in mice.

Keywords: Colorectal Cancer, Colorectal Adenoma, Aberrant Crypt Foci, C57BL/6J mouse, 1,2-dimethylhydrazine, Connexin 43, Pannexin 1.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Taxa de Incidência do Câncer Colorretal

Figura 2: Taxa de Mortalidade do Câncer Colorretal

Figura 3: Características Gerais da Incidência do Câncer Colorretal

Figura 4: Proporção de Casos de Câncer Colorretal e seus Fatores

Figura 5: Fatores de Risco do Câncer Colorretal

Figura 6: Fatores de Risco do Câncer Colorretal na Alimentação

Figura 7: Fatores Protetivos do Câncer Colorretal na Alimentação

Figura 8: Fatores de Proteção do Câncer Colorretal

Figura 9: Epitélio Colônico Normal e Foco de Criptas Aberrantes

Figura 10: Principais Vias Precursoras do Câncer Colorretal

Figura 11: Via Serrilhada

Figura 12: O Metabolismo do DMH

Figura 13: Comunicação Celular via Junções GAP

Figura 14: Estrutura da Conexina 43

Figura 15: Estrutura do Conexon e suas Junções GAP

Figura 16: Funções da Conexina 43 no Cólon

Figura 17: Relatos da Conexina 43 na Carcinogênese Colorretal

Figura 18: Estrutura do Panexon e da Panexina 1

Figura 19: Funções Biológicas da Panexina 1

Figura 20: Relatos da Panexina 1 no Cólon e no Câncer Colorretal

Figura 21: Mecanismo Proposto de Morte Celular Induzida por P2X4/P2X7/Panexina-1

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAS: Ácido Acetilsalicílico

AB: Ácidos Biliares

ACR: Adenoma Colorretal

ADH: Álcool Desidrogenase

ALDH: Aldeído Desidrogenase

AOM: Azoximetano

ATP: Trifosfato de Adenosina

BAÇ: Bebidas Açucaradas

CA: Cripta Aberrante

CCR: Câncer Colorretal

CI: Comunicação Intercelular

COX: Ciclooxygenase

Cx: Conexina

DM: Diabetes Mellitus

DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DMH: 1,2-dimetilhidrazina

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

EUA: Estados Unidos

FCA: Foco de Cripta Aberrante

GFFT: Glutamina-frutose-6-fosfato

IARC: International Agency for Research on Cancer

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IGF: Insulin-like Growth Factor

JGAP: Junção Comunicante/GAP

KO: Nocaute

MCI: Morte Celular Imunogênica

Panx: Panexina

RFX: Receptor Farnesóide X

SNC: Sistema Nervoso Central

TAB: Tecido Adiposo Branco

TGI: Trato Gastrointestinal

Sumário

Capítulo I – Revisão de Literatura

1. O Câncer Colorretal.....	2
1.1. Epidemiologia e Características Gerais.....	2
1.2. Fatores de Risco e Seus Mecanismos.....	5
1.3. Hábitos Alimentares.....	9
1.3.1. Alimentação Como um Fator de Risco.....	9
1.3.2. Alimentação Como um Fator Preventivo.....	11
1.4. Outros Fatores de Proteção.....	13
1.5. As Bases Morfológicas e Moleculares do Câncer Colorretal.....	15
1.6. Modelos Experimentais do Câncer Colorretal.....	20
2. Junções Comunicantes.....	23
2.1. Comunicação Celular e Junções GAP.....	23
2.2. Conexina 43.....	25
2.2.1. Estrutura das Conexinas.....	25
2.2.2. Funções da Conexina 43.....	26
2.2.3. Relatos da Conexina 43 no Cólon.....	28
2.2.4. A Conexina 43 e suas Interações com o Câncer Colorretal.....	30
2.3. Panexina 1.....	32
2.3.1. Estrutura da Panexina 1.....	32
2.3.2. Funções da Panexina 1.....	34
2.3.3. Relatos da Panexina 1 no Cólon e na Carcinogênese Colorretal.....	36
2.3.4. A Panexina 1 e sua Relação com o Câncer.....	38
3. Objetivo.....	41
4. Referências.....	42

Capítulo II – Artigos Científicos

Paper I (Full length): The Implications of Connexin 43 Deficiency During the Early Stages of Chemically Induced Deficiency Mouse Colon Carcinogenesis.....

Abstract.....	59
1. Introduction.....	59
2. Methodology.....	61
2.1. Animals.....	61
2.2. Experimental design and sampling.....	61
2.3. Genotyping.....	62
2.4. Genotoxicity assessment.....	62
2.5. ACF screening and tumor analysis.....	63
2.6. Immunohistochemistry analysis.....	63
2.7. Analysis of antioxidant enzymes.....	64
2.8. In silico analysis of human CRA samples.....	64
2.9. Statistical analysis.....	64
3. Results.....	64

3.1. Cx43 deficiency does not alter DMH effects on body weight, liver weights, or colon length at weeks 7 and 37	64
3.2. Cx43 deficiency does not alter carcinogen-induced outcomes at week 7.....	65
3.3. Cx43 deficiency slightly attenuates preneoplastic ACF burden at week 37.....	65
3.4. Cx43 deficiency does not alter colorectal adenomas burden at week 37.....	66
3.5. Cx43 mRNA is not correlated to ki-67, caspase-3, and β -catenin in human colorectal adenomas.....	67
4. Discussion.....	69
5. Conclusion.....	71
6. References.....	71
Supplementary data.....	73

Paper II (Short comm.): Panx1 Knockout Promotes Preneoplastic Aberrant Crypt Foci Development in a Chemically Induced Model of Mouse Colon Carcinogenesis..... 77

Abstract.....	78
1. Introduction.....	79
2. Methodology.....	81
2.1. Experimental Design.....	81
2.2. Comet Assay.....	82
2.3. ACF Screening.....	83
2.4. Immunohistochemistry.....	83
2.5. Biochemical Analysis.....	84
2.6. Statistical Analysis.....	84
3. Results and Discussion.....	84
3.1. General Findings.....	84
3.2. Panx1 Knockout promotes carcinogen-induced peripheral blood genotoxicity and oxidative stress in the colon at week 7.....	85
3.3. Panx1 Knockout increases preneoplastic ACF burden at week 37.....	87
4. Conclusion.....	88
5. Conflicts of interest.....	88
6. Funding.....	88
7. References.....	95

Conclusões Gerais e Perspectivas.....	100
Anexo I - Atividades acadêmicas.....	101
Anexo II - Certificado comitê de ética	102



Capítulo I – Revisão de Literatura



Capítulo I - Revisão de literatura

1. O Câncer Colorretal

1.1 Epidemiologia e Características Gerais

Mundialmente, o câncer colorretal (CCR) é o quarto tipo de câncer mais incidente, e o terceiro maior em mortalidade a cada 100.000 pessoas, para homens e mulheres. Dados indicam uma expectativa de crescimento de 66,96% no número de casos (de 1,15 milhões para 1,92 milhões de novos casos) e de 76,78% nas taxas de mortalidade deste câncer (de 577 mil para 1,02 milhões de óbitos) até 2040 (GLOBOCAN, 2020). Especificamente no Brasil, o CCR é o terceiro maior em incidência, atingindo cerca de 55 mil pessoas em 2020, e o segundo maior em mortalidade, acometendo cerca de 26 mil pessoas nesse mesmo ano (GLOBOCAN, 2020). Para cada ano do triênio de 2020 até 2022, foram relatados cerca de 20.520 casos de CCR em homens, e 20.470 casos em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 19,63 e 19,03 novos casos em 100 mil para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2019). As expectativas futuras indicam um aumento de 79,14% em novos casos até 2040 (de 30,2 mil para 54,1 mil pessoas acometidas) e de 88,89% na mortalidade (de 16,2 mil para 30,6 mil óbitos) (GLOBOCAN, 2020). Esses dados caracterizam a relevância dessa doença no âmbito global e nacional, tanto nos dias atuais quanto no futuro. Um panorama geral da incidência do CCR pode ser observado na Figura 1 e o de sua mortalidade na Figura 2.

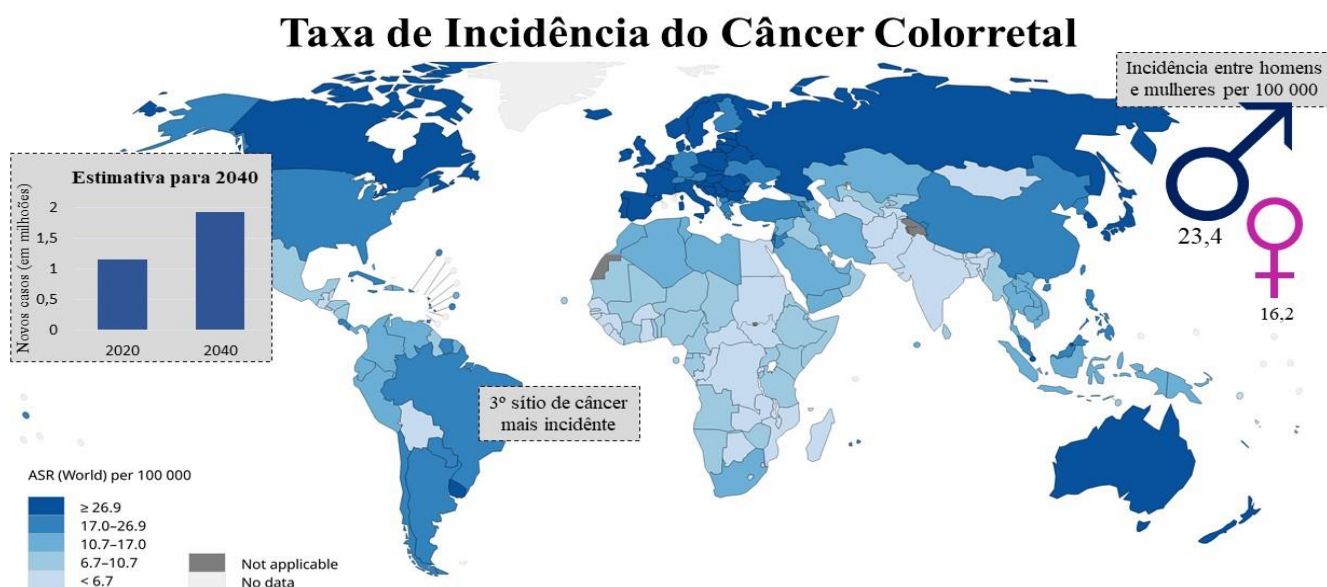


Figura 1: Taxa de Incidência do Câncer Colorretal. Valores adaptados em 100 mil pessoas, para ambos os sexos e todas as idades (2020). Adaptado de GLOBOCAN, 2020.

Devido a suas características particulares (Figura 3), sobretudo àquelas relacionadas aos fatores de risco, o CCR apresenta variações significativas quanto a sua distribuição geográfica, sendo majoritariamente mais incidente nos países desenvolvidos e é considerado um indicador do desenvolvimento socioeconômico da região, onde a incidência e a mortalidade do CCR se correlacionam de maneira positiva com o índice de desenvolvimento humano (IDH) (Brody et al., 2015; Douaiher et al., 2017; Goodarzi et al., 2020; Baidoun et al., 2020). Nos países em desenvolvimento, como no Leste Europeu, na Ásia e na América do Sul, em especial ao Brasil, China e Índia, com IDH médio, observa-se um aumento na incidência e na mortalidade dessa doença devido à sua crescente ocidentalização (Brody et al., 2015; Goodarzi et al., 2020). Enquanto que em países com alto IDH, como nos Estados Unidos (EUA), Austrália, Nova Zelândia e outros países do oeste europeu, os índices do CCR mantiveram-se estacionados, o que é justificado pelos avanços nas técnicas de diagnóstico, manejo e tratamento da doença, que controla os níveis de incidência e mortalidade nessas regiões. Ainda assim, tais ações não impedem sua manifestação nestes países (Thanikachalam et al., 2019; Goodarzi et al., 2020).

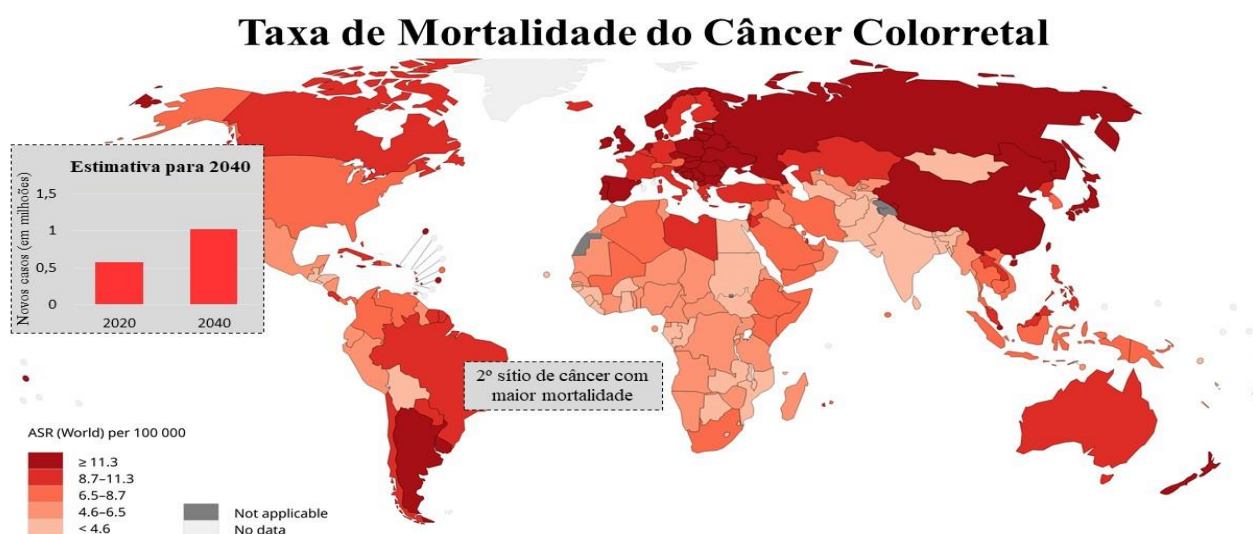


Figura 2: Taxa de Mortalidade do Câncer Colorretal. Valores adaptados em 100 mil pessoas, para ambos os sexos e todas as idades (2020). Adaptado de GLOBOCAN, 2020.

A incidência do CCR pode variar de acordo com determinados fatores, sendo maior na população acima dos 65 anos de idade, uma tendência que permanece sendo observada nas Américas e nas regiões mais desenvolvidas, enquanto que nas regiões menos desenvolvidas a incidência é maior na população com menos do que 65 anos de idade (Douaiher et al., 2017). Nos EUA, a incidência do CCR reduziu de 60,5 para 46,6 em 100 mil pessoas, do ano de 1976 para 2005, com uma queda contínua de 3% ao ano entre 2003 e 2012 (Cheng et al., 2011; Siegel

et al., 2018). Isso se dá pelas melhorias no diagnóstico, na intervenção antecipada e nas melhores práticas de tratamento e manejo, disponíveis na atualidade (Thanikachalam et al., 2019; Goodarzi et al., 2020). Entretanto, apesar da incidência geral ter reduzido, o número de pessoas acometidas com idade inferior a 50 anos tem aumentado tendencialmente nas últimas décadas (Baidoun et al., 2020; Siegel et al., 2020). Efeito que é justificado pelas mudanças observadas entre as novas gerações, com padrões dietéticos inéditos, acompanhado pela elevada incidência da obesidade e um estilo de vida característico ocidental (Goodarzi et al., 2020). Além disso, o público mais jovem enfrenta um aumento na exposição aos fatores de risco, como o álcool, fumo, falta de atividade física e dieta rica em carne vermelha (Baidoun et al., 2021).

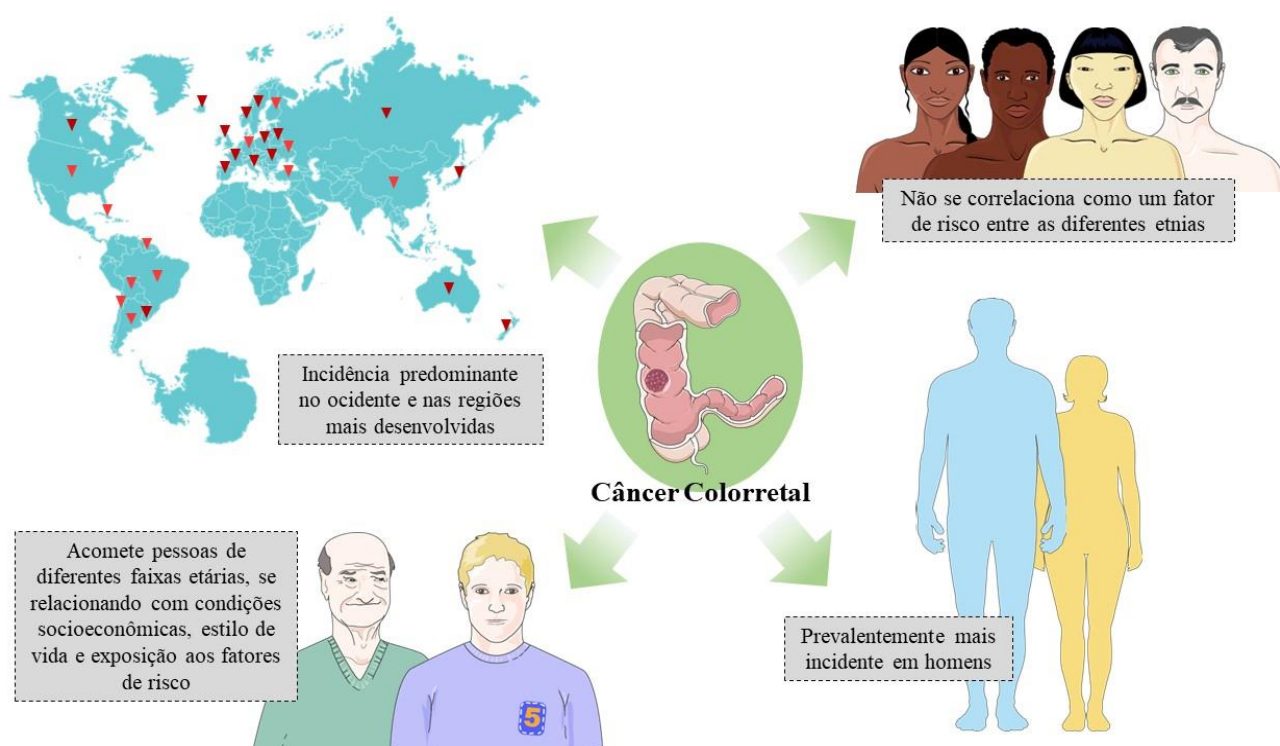


Figura 3: Características Gerais da Incidência do Câncer Colorretal. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

A nível global, o CCR é mais incidente em homens do que em mulheres (Douaiher et al., 2017; Safiri et al., 2019; Zhang et al., 2019; GLOBOCAN, 2020), condição associada com a maior exposição aos fatores de risco, como o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas, evidentemente mais elevado entre os homens (Singer et al., 2011; Amitay et al., 2020). Além disso, o CCR também se relaciona com o peso corpóreo, tal que altos índices de leptina foram associados com o risco dobrado de desenvolvimento do CCR em homens quando comparado com as mulheres (Xu et al., 2011; Bardou et al., 2013). A obesidade é um importante fator de risco para o CCR e será apresentada no tópico 1.2.

Ademais, estudos epidemiológicos relatam que a incidência do CCR é maior na população afro-americana quando comparada com outros grupos raciais dentro dos Estados Unidos (Siegel et al., 2017, 2020). No entanto, os estudos que focaram na diferença étnica para a suscetibilidade genética de desenvolvimento do CCR, em sua grande maioria, não encontraram disparidade étnica (Ashktorab et al., 2016; Wang et al., 2017; Augustus & Ellis, 2018; Keum & Giovannucci, 2019), o que sugere a existência de outras causas para a incidência elevada da doença nessa população, como a falta de acesso a cuidados de saúde e a exposição aos fatores de risco, condições atribuídas ao baixo nível socioeconômico e educacional (Doubeni et al., 2012; Ashktorab et al., 2016; Siegel et al., 2020; Baidoun et al., 2021).

1.2 Fatores de Risco e Seus Mecanismos

Considerada uma doença multifatorial, destaca-se que cerca de 60-65% dos casos de CCR evoluem de forma esporádica, o que aponta a grande importância dos fatores de risco, ambientais moduláveis, para além da predisposição genética. Cerca de 25% dos casos possuem histórico familiar sem algum tipo de síndrome de câncer genética conhecida, e apenas 5% são causados por síndromes de câncer hereditário, como a síndrome de Lynch (Keum & Giovannucci, 2019), conforme ilustrado na Figura 4. A maior incidência do CCR em países com alto IDH é explicada pela prevalência dos fatores de risco modificáveis, considerados como parte do estilo de vida ocidental. Em concordância, os países em desenvolvimento que apresentam níveis crescentes dessa malignidade estão cada vez mais se adaptando à tal estilo de vida (Arnold et al., 2017; Araghi et al., 2019; Baidoun et al., 2020). Exemplos de fatores de risco, seus mecanismos de ação e como eles se relacionam estão ilustrados na Figura 5.

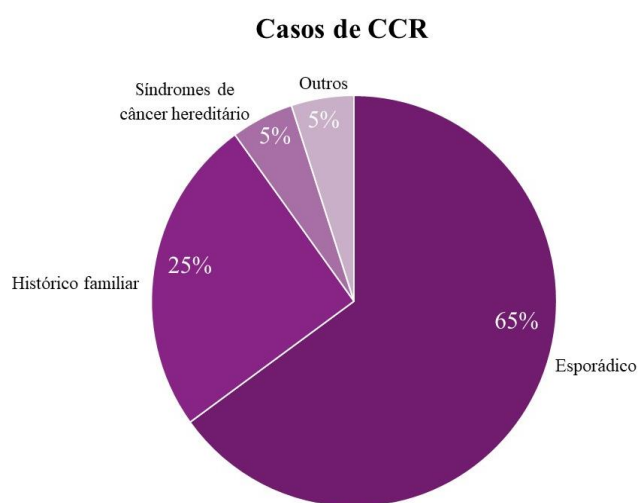


Figura 4: Proporção de Casos de Câncer Colorretal e seus Fatores. Imagem baseada em Keum & Giovannucci, 2019.

A obesidade, doença complexa e multifatorial, teve sua prevalência global triplicada desde 1975 e continua crescendo de forma exponencial entre todas as pessoas do mundo (WHO, 2021; Lin & Li, 2021). Diferentes estudos relacionaram a obesidade com o elevado risco para o CCR (Kolb et al., 2016; Soltani et al., 2019), apresentando a inflamação do tecido adiposo branco

(TAB) como efetuada de um papel fundamental na carcinogênese de colón. Dentre os mecanismos envolvidos, destacam-se a ativação de vias de sinalização metabólica, aumento do estresse oxidativo e do retículo endoplasmático, elevando a liberação de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a hiperplasia e hipertrofia do TAB resulta em mudanças na produção de adipocinas, ocasionando em uma resposta inflamatória de baixo grau e promovendo a formação de um microambiente favorável ao desenvolvimento do CCR (Xu et al., 2011; Seo et al., 2015; Kolb et al., 2016; Keum & Giovannucci, 2019).

Assim como a obesidade, o fumo e o consumo de bebidas alcoólicas também promovem a inflamação crônica (Iyengar et al., 2016). Diversos estudos demonstram a correlação positiva de ambos com o risco de desenvolver o CCR (Amitay et al., 2020; Chen et al., 2021; Akter et al., 2021; Wang et al., 2021). No Japão, essa correlação foi observada entre homens fumantes constantes, atuais e ex-fumantes, com uma relação dose-resposta quanto a intensidade, duração e maços de cigarros cumulativos. Para mulheres, o consumo de pelo menos 40 maços por ano ou 20 cigarros por dia, está associado com um aumento de 60% e 37%, respectivamente, no risco do CCR (Akter et al., 2021). Para fumantes passivos, apesar da dificuldade em determinar uma dose de exposição, existe um risco aumentado em 14% para desenvolver essa neoplasia, efeito observado principalmente no reto, onde o aumento é de 33% (Yang et al., 2016).

A fumaça do cigarro atinge a mucosa colorretal pelo sistema circulatório ou ingestão direta, induzindo alterações genéticas e epigenéticas (Esakky & Moley, 2016; Gunes et al., 2018; Hattori et al., 2020; Seiler et al., 2020; Langdon et al., 2021). O fumo se relaciona mais com pólipos serrilhados, geneticamente caracterizados por mutações em BRAF ou KRAS e por alterações no fenótipo epigenético de metilação de ilhas CpG (do inglês, CIMP), contribuindo para iniciação e transformação de um pólipo normal para o CCR (Figueiredo et al., 2015; De Palma et al., 2019). Apesar disso, o cessar do tabagismo leva a resultados positivos, de tal forma que o risco para o CCR reduz na medida em que os anos de interrupção aumentam, onde os níveis de metilação entre ex-fumantes e pessoas que nunca fumaram são similares (Akter et al., 2021; Keum & Giovannucci, 2019). No entanto, apesar do prognóstico positivo na cessação do fumo, o tabagismo promove a formação de adutos de DNA, um evento precoce do câncer, que se dá pela ligação de substâncias químicas ao DNA e não pode ser revertido (Jin et al., 2017; Tang & Zhang, 2020; Kang & Valerio, 2020; Li & Hecht, 2022).

O consumo do cigarro é comumente associado com a ingestão de bebidas alcoólicas, mas a junção desses dois componentes não potencializa o risco de desenvolver o CCR (Lee et al., 2019; Amitay et al., 2020; Motschman & Tiffany, 2021). No entanto, o consumo médio diário

de 24,6 g de álcool foi associado com um aumento em cerca de 30% do risco para o CCR, característico por mutações em MSS, BRAF, KRAS e CIMP baixo/negativo, similar as alterações ocasionadas pelo tabaco (Amitay et al., 2020). A meta-análise de 14 estudos realizados na Europa, América do Norte e Ásia, demonstrou que até mesmo o consumo de apenas um drinque por dia, foi associado com um leve, porém estatisticamente significativo, risco de 4% para o desenvolvimento da neoplasia (Choi et al., 2018).

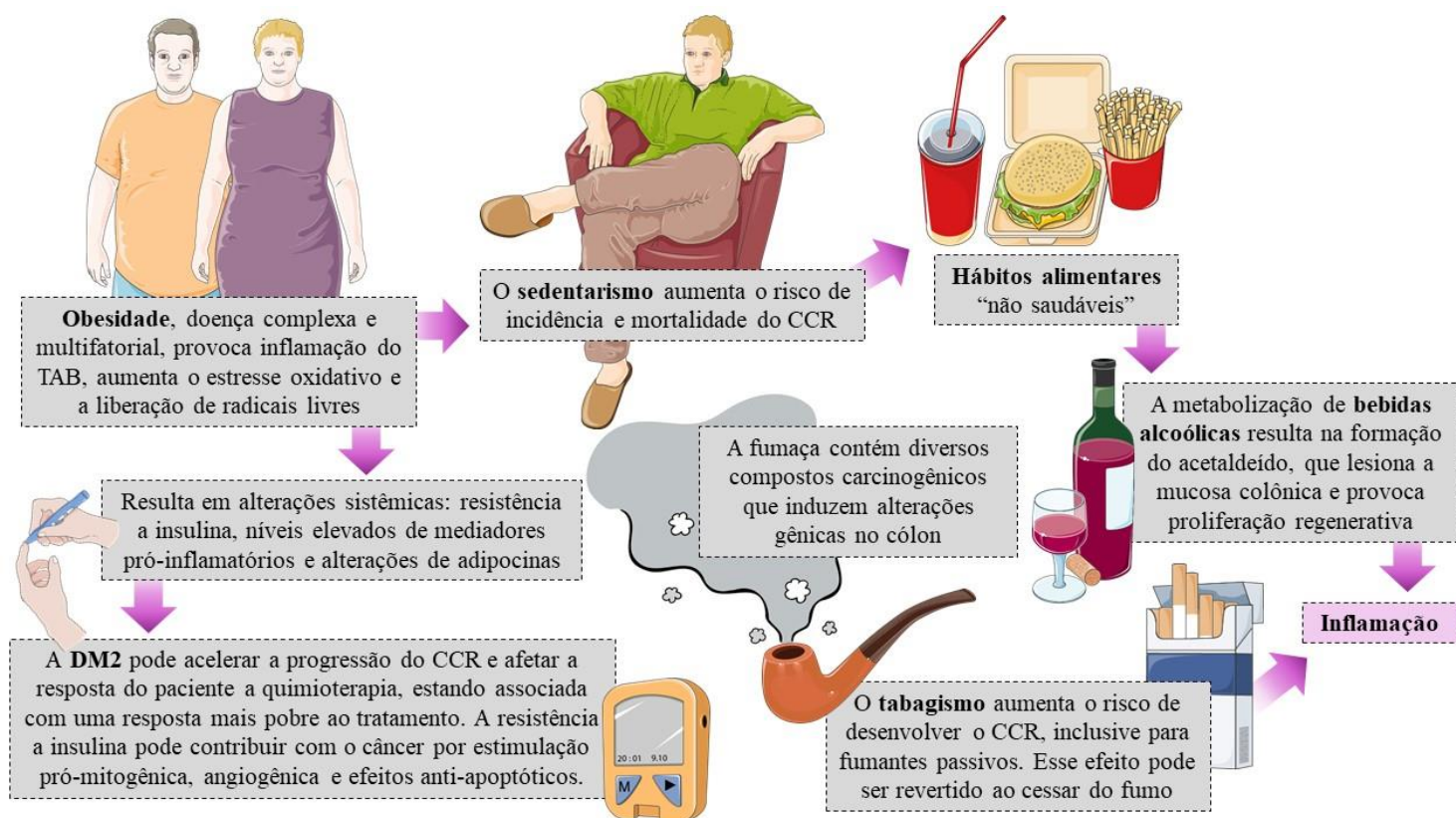


Figura 5: Fatores de Risco do Câncer Colorretal. Tecido adiposo branco (TAB), Câncer Colorretal (CCR), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

O álcool é metabolizado em acetaldeído, classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como possivelmente carcinogênico para os humanos, pertencendo ao grupo 2B. O acetaldeído é metabolizado por enzimas, álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Conhecido por induzir dano ao DNA no trato digestivo, o acetaldeído atinge os colonócitos pelo sistema circulatório, onde pode ocorrer o seu acúmulo intracelular devido à baixa atividade da ALDH, causando lesões na mucosa e provocando a proliferação celular regenerativa, eventos que podem promover a carcinogênese (IARC, 1999; Na & Lee, 2017; Keum & Choi, 2021). Ademais, os produtos da peroxidação lipídica formados durante o metabolismo do álcool também podem causar dano ao DNA e contribuir para a instabilidade

genômica, um *hallmark* do câncer. Existem outros mecanismos pelos quais o consumo do etanol promove a carcinogênese, como o estresse oxidativo propriamente dito e a sua relação com a inflamação, estimulando a proliferação de células iniciadas devido a ativação da sinalização inflamatória, ou afetando o metabolismo do carbono (Na & Lee, 2017).

Entre as especificidades do CCR, esse é um dos poucos tipos de câncer que estão relacionados com a ausência de atividade física, tal que 2 horas assistindo televisão por dia foi associado com um aumento em até 7% no risco (Ma et al., 2017). Foi demonstrado que pessoas sedentárias exibiam um risco 28% maior de desenvolver o CCR, quando comparadas com pessoas ativas. O estudo categorizou os níveis de sedentarismo como tempo sentado total (>9 horas vs. <3 horas), tempo assistindo televisão (>9 horas vs. <2 horas ou 0) e tempo sentado ocupacional (>6 horas vs. <2 horas), sendo que altos níveis dos mesmos resultaram em um aumento de 24%, 54% e 24%, respectivamente, no risco do CCR (Schmid & Leitzmann, 2014; Kerr et al., 2017). Além de estar associado com um aumento do risco a mortalidade em todos os tipos de câncer, mas principalmente para o CCR, o sedentarismo resulta em maior risco de desenvolver adenomas avançados e da recorrência do câncer em homens, sugerindo sua contribuição com a oncogênese (Kerr et al., 2017). Vale ressaltar que o sedentarismo se relaciona com outros fatores de risco para essa doença, podendo agir de forma associada com a obesidade e má alimentação (Eyl et al., 2018).

Frequentemente associada com a obesidade, a diabetes também pode contribuir com o CCR, visto que estudos epidemiológicos mostraram maior prevalência do CCR entre pessoas com diabetes quando comparado com pessoas saudáveis (Peeters et al., 2015; Restifo et al., 2018; Soltani et al., 2019; Ling et al., 2020). A *diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica muito prevalente, caracterizada pela hiperglicemia crônica e pode ser ocasionada por uma disfunção pancreática na produção de insulina ou resistência à insulina (Petersmann et al., 2019; Kim & Scherer, 2021). A DM tipo 2 (DM2) é a forma mais comum dessa doença (90% dos casos), associada com um maior risco de incidência do CCR além de poder acelerar a progressão e aumentar a mortalidade em diversos tipos de câncer (Soltani et al., 2019; Suh & Kim, 2019; Kim & Scherer, 2021; Vekic et al., 2021).

Pacientes com CCR e DM2 possuem a sobrevida reduzida em 5 anos, quando comparados com pacientes sem DM2, e maior risco de recorrência do câncer (Zhu et al., 2017; Vekic et al., 2021). Além disso, a DM2 pré-existente, pode afetar a resposta do paciente à quimioterapia, ocasionando em uma resposta mais pobre ao tratamento do CCR (Vigneri et al., 2015). Curiosamente, existe um risco aumentado entre os sobreviventes do CCR de desenvolver

diabetes em até 5 anos do diagnóstico inicial, sugerindo uma relação de duas vias entre essas doenças (Singh et al., 2016; Jo et al., 2020; Vekic et al., 2021). Assim como na obesidade, a resistência à insulina e desarranjos metabólicos específicos podem exercer um papel de ativação na progressão do CCR por diversas vias de sinalização, como a via do *Insulin-like Growth Factor* (IGF) (Vekic et al., 2021; Soltani et al., 2019). A insulina pode contribuir com o câncer por estimulação pro-mitogênica, angiogênica e por efeitos anti-apoptóticos, promovendo a proliferação celular sustentada, um outro importante *hallmark* do câncer (Vekic et al., 2021).

1.3 Hábitos alimentares

1.3.1 Alimentação como um fator de risco

Além dos fatores de risco já descritos, a dieta está intimamente associada com o CCR, podendo influenciar na progressão e no desenvolvimento da doença, e agir como fator predisponente ou preventivo, ilustrado na Figura 6 e 7 (Bradbury et al., 2020). Ao avaliar os hábitos alimentares em diferentes populações pelo mundo, foi encontrado que o padrão dietético “saudável” é caracterizado pelo consumo de frutas, vegetais, grãos integrais, nozes, legumes, peixes ou outros frutos do mar e baixo consumo de leite ou laticínios. Contraposto a essa dieta, o padrão “não saudável” consiste no alto consumo de carnes vermelhas ou processadas, bebidas açucaradas (BAÇ), grãos refinados, sobremesas e batatas. Também conhecida por um padrão ocidentalizado (ou *fast food*) de alimentação, essa dieta foi associada com o desenvolvimento do CCR (Garcia-Larsen et al., 2018; Keum & Giovannucci, 2019).

O consumo de carne vermelha foi classificado como provável cancerígeno para os humanos (Grupo 2A) pela IARC, associado principalmente com o CCR, mas também com o câncer de pâncreas e próstata. Já as carnes processadas, são classificadas como cancerígenas para os humanos (Grupo 1). O risco de câncer pelo consumo dessas carnes ainda é pequeno, mas aumenta gradualmente conforme seu consumo, sendo que a ingestão de até 100 gramas por dia foi associada com um aumento de 12% e 18% no risco ao CCR para carne vermelha e carne processada, respectivamente (IARC, 2018; Vieira et al., 2017). O mecanismo de promoção se dá pelo ferro heme, rico na carne vermelha, que quando em pequenas quantidades contribui com o funcionamento fisiológico da célula, mas em grandes quantidades pode se tornar um potente carcinógeno, efeito provocado pela sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, o ferro heme pode modular a função das células imunes, reduzir o potencial supressor tumoral do gene TP53 e promover a inflamação e a disbiose intestinal (Kim S. et al., 2019; Gamage et al., 2021). Quando cozida em alta temperatura, a carne libera

aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que são metabolizadas por enzimas do citocromo P450, formando metabólitos N-hidroxilados genotóxicos. Os compostos N-nitrosos, quando elevados no trato gastrointestinal (TGI) após o consumo de carne vermelha ou processada, induzem mutações gênicas que contribuem com o processo de carcinogênese. Em carnes processadas, além dos efeitos do cozimento, o próprio método de processamento e armazenamento da carne pode contribuir com o aumento do risco ao câncer (Turesky, 2018; Keum & Giovannucci, 2019; Kim S. et al., 2019). A carne vermelha também pode ser rica em gordura, componente amplamente associado com a carcinogênese.

Uma dieta rica em gordura pode promover a progressão tumoral, independente da obesidade, por meio de interações entre a microbiota intestinal e o metabolismo dos ácidos biliares (AB) (O’Keefe, 2015; Vernia et al., 2021). O consumo dessa dieta estimula a síntese de AB pelo fígado, que quando em grandes quantidades, ultrapassam a reabsorção ileal e atingem o cólon, onde são biotransformados pelas bactérias intestinais, resultando também na presença de níveis elevados de AB nas fezes, sendo mais prevalente no CCR. Dessa forma, os níveis plasmáticos elevados de AB (primários e secundários) estão positivamente correlacionados com o risco de desenvolver o CCR (Ou et al., 2013; O’keefe et al., 2015; Ocivirk & O’Keefe, 2021; Vernia et al., 2021). Os AB também atuam como moléculas de sinalização e interagem com o Receptor Farnesóide X (RFX), envolvido na comunicação entre intestino e fígado, efetuando um papel central no controle da proliferação celular epitelial no intestino. A atividade normal do RFX garante um bom efluxo e controle da reabsorção dos AB pelos enterócitos, no entanto, a deficiência desses promove a proliferação celular colônica, evidente em lesões pré-neoplásicas e no CCR (Stanimirov et al., 2015; Fu et al., 2019; Vernia et al., 2021; Rezen et al., 2022). Apesar das evidências, os mecanismos moleculares envolvidos na correlação entre AB e o CCR ainda precisam ser melhores investigados.

O alto teor de açúcar na alimentação também é classificado como um fator risco ao CCR (Baidoun et al., 2020), sendo importante destacar que os hábitos alimentares conversam entre si, tal que o elevado consumo de BAÇ está comumente relacionado com o alto consumo de carnes vermelhas e baixa ingestão de frutas e vegetais (Joh et al., 2022). O elevado consumo de frutose e BAÇ durante a adolescência levou a um aumento de 17% no risco de adenomas totais e de 30% para adenomas de alto risco a cada adição de 5% de calorias de frutose total, acompanhado de um aumento em 11% para adenomas totais e 34% para adenomas de alto risco, para cada porção diária de BAÇ, principalmente nos adenomas retais (Joh et al., 2022). As BAÇ foram associadas com um aumento significativo na incidência e mortalidade do câncer de cólon

proximal, onde a frutose total (25 gramas por dia) foi novamente associada com um aumento de 18% na incidência e 42% na mortalidade do câncer de cólon proximal (Yuan et al., 2022). Sabe-se que alterações na expressão da Glutamina-Frutose-6-fosfato transaminase (GFFT), enzima importante no metabolismo da glicose e na glicosilação, pode resultar na hiperinsulinemia, obesidade e resistência à insulina. Ao investigar o gene que codifica a GFFT, foi encontrado que o mesmo pode atuar como um oncogene promovendo a proliferação e o desenvolvimento de metástase no CCR, mediante ao *feedback* positivo entre o NF- κ B, demonstrado nas linhagens de células SW480 e SW620 (Liu et al., 2020; Oliveira et al., 2020). O CCR é uma doença multifatorial, onde os hábitos alimentares se relacionam entre si e com os demais fatores de risco, entrelaçando os mecanismos de ação envolvidos na promoção e desenvolvimento dessa neoplasia maligna.

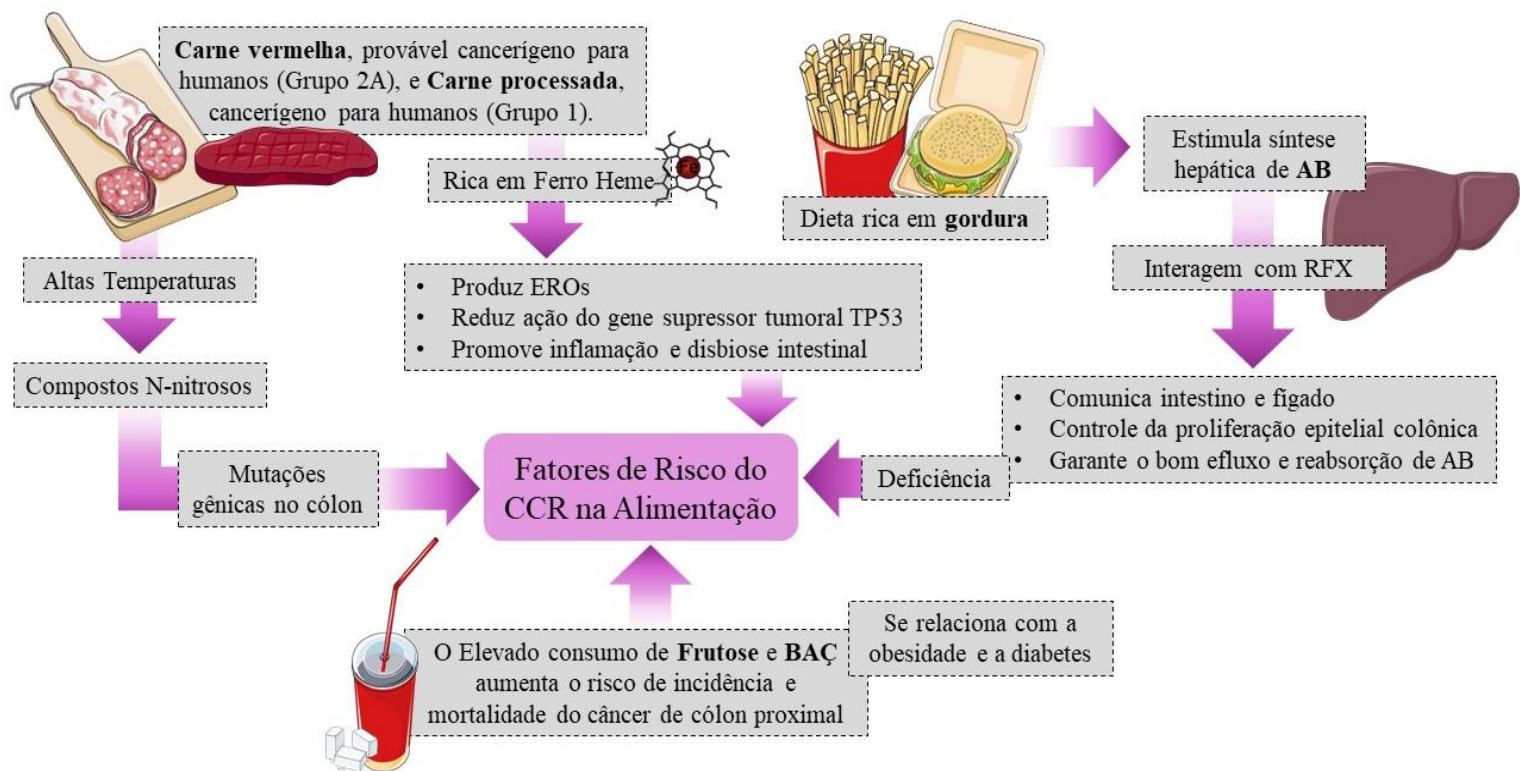


Figura 6: Fatores de Risco do Câncer Colorretal na Alimentação. Câncer Colorretal (CCR), Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Ácidos Biliares (AB), Receptor Farnesóide X (RFX), Bebidas Açucaradas (BAÇ). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

1.3.2 Alimentação como um fator preventivo

Diversos estudos relatam uma correlação negativa entre o consumo de fibras e o CCR, propondo que as fibras aumentam a massa fecal, a motilidade intestinal e a fermentação bacteriana de ácidos graxos de cadeia curta, contribuindo para a saúde intestinal (Capuano, 2017; Holscher, 2017; Yang & Yu, 2018). A microbiota intestinal promove a fermentação de

fibras solúveis não digeridas em ácidos graxos de cadeia curta, destacando o butirato, que apesar de promover o crescimento do epitélio colônico, apresenta um efeito inibitório no CCR. Demonstrado em células intestinais humanas, o butirato é capaz de promover a sobrevivência dos colonócitos normais e a apoptose daqueles neoplásicos, além de reduzir vias pró inflamatórias (McNabney & Henagan, 2017; Zeng et al., 2017; Keum & Giovannucci, 2019). Em adicional, uma dieta rica em fibras e grãos integrais promove a redução da *Fusobacterium Nucleatum*, que é capaz de promover o CCR ao contribuir com um microambiente tumoral imunossuprimido, presente maiores quantidades no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal adjacente (Mehta et al., 2017; Goradel et al., 2019).

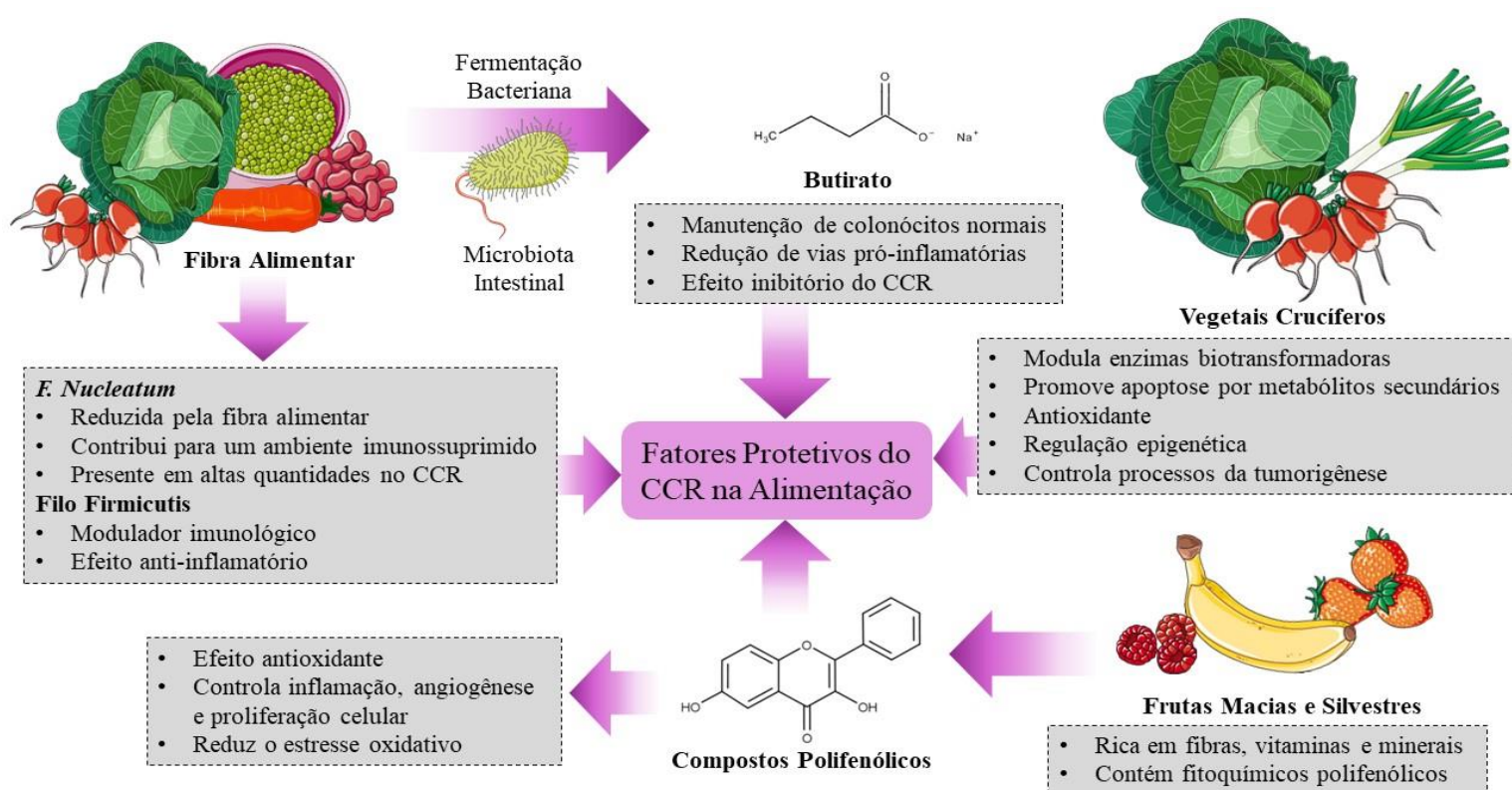


Figura 7: Fatores Protetivos do Câncer Colorretal na Alimentação. Câncer Colorretal (CCR). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

A alimentação saudável também é composta pelo consumo de frutas e vegetais, que desempenham efeito protetivo quanto ao desenvolvimento de adenomas e do CCR. Um estudo em humanos demonstrou que o consumo de frutas vermelhas foi capaz de prevenir o CCR, efeito observado principalmente em pacientes de alto risco, com doenças inflamatórias intestinais ou focos de criptas aberrantes (FCA) (Afrin et al., 2016). As frutas macias e as vermelhas devem ser destacadas devido as suas propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas e pela riqueza de minerais, vitaminas, fibras e fitoquímicos polifenólicos, que por sua vez possuem efeitos antioxidantes, onde suprimem a inflamação, o estresse

oxidativo, a angiogênese e a proliferação celular, por meio da modulação de diversas vias de sinalização (Hautsalo et al., 2016; Baby et al., 2018; Waluga et al., 2018; Singh et al., 2020). Já o consumo de vegetais crucíferos está associado com uma redução de aproximadamente 18% no risco do CCR, especialmente o repolho e o brócolis, com redução de 24% e 18%, respectivamente (Wu et al., 2013; Tse & Eslick, 2014). Os efeitos protetores desses vegetais se dão por múltiplos mecanismos moleculares, como modulação das enzimas de biotransformação e indução de apoptose por metabólitos secundários, por exemplo, além de atuar diretamente no processo da tumorigênese ao controlar o crescimento, migração, invasão e metástases das células cancerosas, podendo inibir também a angiogênese (Pan et al., 2018). Quando ajustado a prática de exercícios, o baixo consumo de frutas foi consistentemente associado com o alto risco para o desenvolvimento de pólipos adenomatosos, assim como o histórico de fumo acompanhado do baixo consumo de vegetais foi associado com um alto risco para o surgimento de adenomas (Supachai et al., 2020).

1.4 Outros fatores de proteção

Além de uma alimentação saudável, existem outras formas de prevenir o CCR, como exercitar-se regularmente, que foi associado com uma redução de aproximadamente 8% no risco. O exercício físico promove a motilidade intestinal e tem efeito benéfico ao sistema imunológico, na inflamação e nos hormônios metabólicos. Dessa forma, está associado com uma redução no risco da mortalidade e melhora na qualidade de vida e bem-estar emocional dos pacientes acometidos pelo CCR (Ruiz-Casado et al., 2017; Kim J. et al., 2019; Qiu et al., 2020). O exercício físico antagoniza os efeitos maléficos consequenciais do sedentarismo.

A vitamina D, importante micronutriente para o organismo, também é categorizada como protetiva para o CCR. Poucos alimentos possuem a vitamina D, dos quais podemos citar peixes oleosos, gemas de ovos, cogumelos shiitake, fígado ou vísceras, coeso a isso, sua síntese é feita principalmente pela pele (cerca de 90%) a partir do 7-desidrocolesterol presente na epiderme, ao ser convertido pela radiação UVB solar. Os receptores de vitamina D são expressos universalmente em células nucleadas e seu principal papel biológico é promover a diferenciação dos enterócitos e a absorção intestinal de cálcio (Antonucci et al., 2018; Chang & Lee, 2019). Devido a suas interações, os efeitos benéficos do cálcio dietético e da vitamina D foram demonstrados em conjunto (Zhang et al., 2021; Lopez-Caleya et al., 2022). O mecanismo protetivo da vitamina D se dá pela redução do risco de incidência dos precursores da doença e do seu início precoce, além de bloquear mecanismos mitogênicos ligados a tumorigênese

(Haidari et al., 2019; Guo et al., 2022). Logo, a exposição adequada a luz solar ou a suplementação oral de vitamina D, que faz parte de um estilo de vida saudável, são capazes de prevenir o CCR (Kechichian & Ezzedine, 2018).

Outra forma de prevenção do CCR é o uso do ácido acetilsalicílico (AAS), por exemplo, que atua como inibidor da ciclooxigenase (COX) 1 e 2. Quando aplicada em pacientes com CCR hereditário (síndrome de Lynch), o uso do AAS resultou na incidência do câncer em apenas 9% dos participantes, enquanto no grupo controle a incidência foi de 13% (Burn et al., 2020). Os efeitos protetores do AAS são apoiados em diversos estudos, com resultados positivos em todo o TGI e indicações de que sua ação acontece nos estágios iniciais da carcinogênese (Dekker et al., 2019; Bosetti et al., 2020; Guo et al., 2021). Foi postulado que seu mecanismo de ação no CCR possivelmente se dá pela inibição da enzima COX1, consequentemente impedindo a liberação de prostanoídes, e COX2, que por sua vez atua na produção de citocinas, na liberação de fatores angiogênicos e no controle da apoptose e migração celular. Em adicional, o AAS também é conhecido por inibir a ativação de plaquetas, a sinalização Wnt/ β -catenina e a inflamação (Drew, 2016; Waluga et al., 2018; Katona & Weiss, 2020). Demonstrado recentemente, o uso desse medicamento também foi associado com uma redução quantitativa da *F. Nucleatum*, apresentando um efeito antibiótico, que também pode contribuir na prevenção do CCR (Brennan et al., 2021).

Para complementar, a realização de exames como a sigmoidoscopia, foi capaz de reduzir em 24% a incidência e 26% a mortalidade do CCR, visto que a identificação nos seus estágios iniciais é de extrema importância pois permite um tratamento mais adequado e eficiente (Jodal et al., 2019). Por isso, a realização de exame diagnóstico (colonoscopia, sangue oculto nas fezes e outros) é classificado como uma forma de prevenção secundária. Os efeitos benéficos dos exames diagnósticos de rotina também foram demonstrados por outros trabalhos, onde a colonoscopia ou a sigmoidoscopia reduziram em aproximadamente 30% a incidência do CCR, assim como o teste imunoquímico fecal anual ou bienal, que reduziu em 10% e 5%, respectivamente. (Chiu et al., 2015; Buskermolen et al., 2019; Dekker et al., 2019). Após diagnóstico, a sobrevida dos pacientes é altamente relacionada com o estágio da doença, variando entre mais de 90% para CCR localizado e menos de 15% para estágio 4, caracterizado pela presença de metástases (Gupta, 2022). Nesse momento, a prevenção terciária é muito similar com a prevenção primária, onde um estilo de vida saudável é a peça fundamental, implicando em maiores chances de sobreviver ao CCR em estágio avançado. Pacientes que decidiram mudar seu estilo de vida tiveram uma redução na mortalidade em 33% durante o

acompanhamento, quando comparado com aqueles que não fizeram essa adaptação (Van Blarigan et al., 2018; Dekker et al., 2019). Os exemplos de fatores de proteção do CCR citados estão sintetizados na Figura 8.

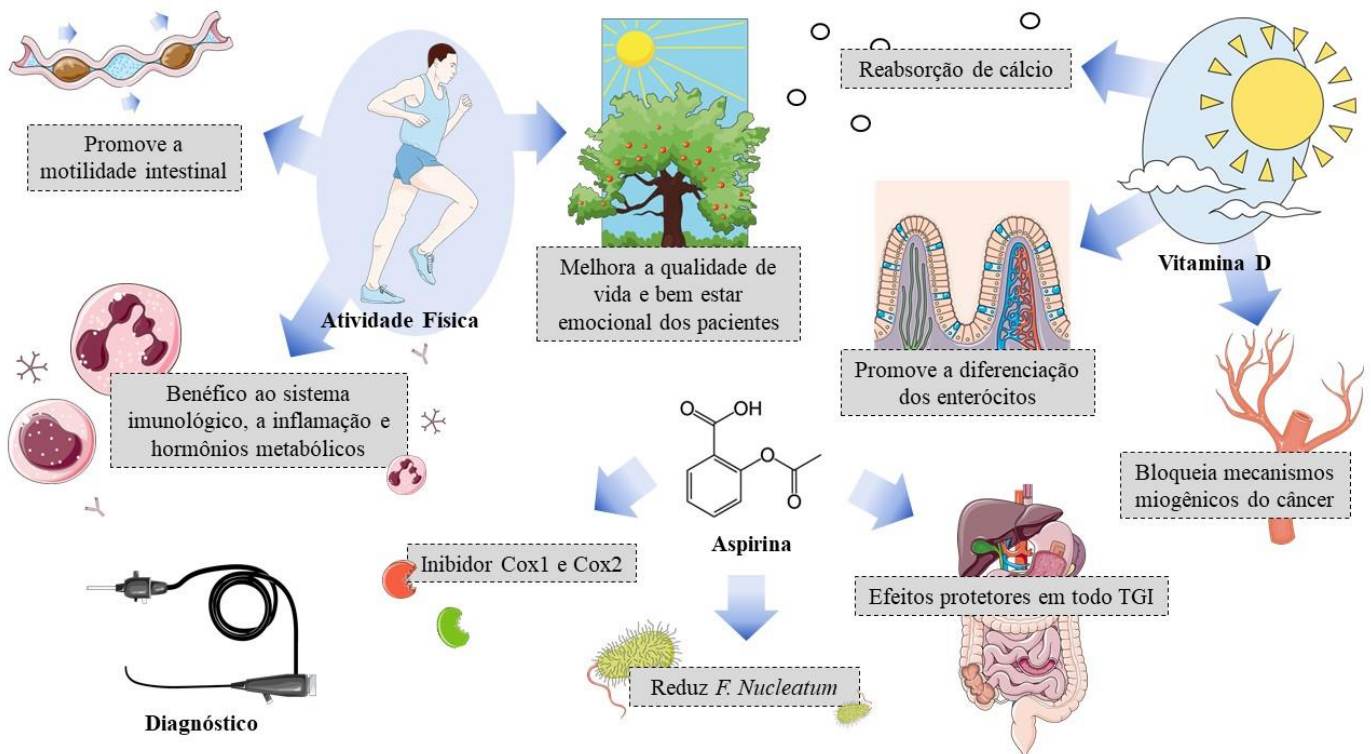


Figura 8: Fatores de Proteção do Câncer Colorretal. Ciclooxygenase (COX); Trato Gastrointestinal (TGI). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

1.5 As Bases Morfológicas e Moleculares do Câncer Colorretal

A carcinogênese colorretal é um processo longo, que ocorre através de diversas etapas resultantes do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas, ocasionando a inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes. O processo todo pode ser dividido em três estágios principais: iniciação, promoção e progressão, com eventos a nível molecular e morfológico. Devido à importância global do CCR, conhecer os mecanismos biológicos que promovem a iniciação tumoral se tornou um grande objetivo, a fim de desenvolver técnicas terapêuticas mais eficientes. Dessa forma, o modelo estocástico e modelo hierárquico se tornaram bem estabelecidos na literatura (Bird, 1995; Vaiopoulos et al., 2012; Song et al., 2017; Dekker et al., 2019;). Ambos os modelos elucidam o potencial heterogêneo das células tumorais e também das metástases. No modelo estocástico, qualquer célula pode iniciar e promover o câncer, acumulando as mutações somáticas necessárias para se desenvolver e ter capacidade metastática. Já no modelo hierárquico, os tumores primários e as metástases são iniciados exclusivamente por células tronco tumorais, organizadas de forma

hierárquica na promoção do seu potencial cancerígeno (Odoux et al., 2008; Vlashi & Pajonk, 2015; Vaiopoulos et al., 2022).

A mucosa do cólon normal é composta por uma camada única de células colunares cobrindo a superfície luminal e revestindo as criptas em conjunto com a lâmina própria e uma fina camada muscular. Ao observar a superfície desse órgão, é notável as aberturas de suas numerosas criptas, que quando cortadas perpendicularmente, apresentam aparência similar a uma “fileira de tubos de ensaio”, com sua arquitetura preservada ao longo do cólon (Figura 9A e 9C). A zona proliferativa fica na base da cripta, onde estão localizadas as células tronco responsáveis por promoverem a renovação do epitélio colônico, através da divisão celular na base e sua diferenciação ao longo da migração para o topo da cripta, se tornando uma célula madura ao alcançar a superfície (Levine & Haggitt, 1989; Sellers & Morton, 2014). Ao chegar no final de sua vida útil, o enterócito sofre apoptose, garantindo a homeostase do epitélio intestinal através do equilíbrio entre proliferação e apoptose. Quando acontece um desbalanço entre esses dois eventos, o epitélio normal sofre modificações e forma lesões denominadas de criptas aberrantes (CA), quando esse fenômeno se repete pelas criptas circundantes ou através da fissão das CA, gera um FCA (Figura 9B e 9D). Durante o processo da carcinogênese, essas lesões evoluem para a formação de uma lesão polipoide, categorizada como precursor neoplásico, que ao longo dos anos progride para a formação de um CCR invasivo (Lopez-Ceron & Pellise, 2012; Nassar & Blanpain, 2016).

Os FCA podem ser classificados como hiperplásicos (histologicamente ampliado e alongado) ou displásicos, de natureza neoplásica iguais aqueles observados em adenomas tubulares e vilosos, com hipercelularidade e núcleos aumentados hipercromáticos, variados graus de estratificação nuclear, perda da polaridade celular, elevada relação núcleo/citoplasma, aglomeração nuclear e aumento do índice mitótico. Em adicional, FCA displásicos possuem marcação positiva para proliferação celular na superfície epitelial, ao contrário dos hiperplásicos e da mucosa normal (Clapper et al., 2020). Ambos os FCA possuem, de alguma forma, um potencial maligno. Aqueles que são hiperplásicos possuem alterações genômicas comuns da neoplasia serrilhada, enquanto que os displásicos podem ser encontrados em grandes quantidades antes do estabelecimento do câncer e carregam alterações genômicas que também estão presentes nos estágios iniciais da carcinogênese colorretal. Devido as similaridades em alterações genéticas e epigenéticas que essas lesões são consideradas como pré-neoplásicas e marcadores para o CCR, tal que as alterações genômicas em FCA podem ser agrupadas de acordo com as vias da carcinogênese colorretal (Lopez-Ceron & Pellise, 2012; Kowalczyk et

al., 2020). Dados indicam que com determinada morfologia, cinética celular e características genéticas, os FCA podem ser lesões precursoras do CCR tanto em roedores tratados com carcinógenos quanto em humanos. Essas estruturas possibilitam a investigação dos estágios iniciais do CCR, além de serem únicas em possibilitar uma abordagem quantitativa na avaliação dos processos dessa neoplasia e dos eventos celulares e moleculares afetados por agentes preventivos ou promotores do câncer. O sistema de FCA é amplamente utilizado para identificar moduladores da carcinogênese colorretal e pode ser utilizado para avaliar efeitos quimiopreventivos em humanos. O estudo dessas lesões promove um melhor entendimento da patogênese do CCR (Roncucci et al., 1991; Bird & Good, 2000).

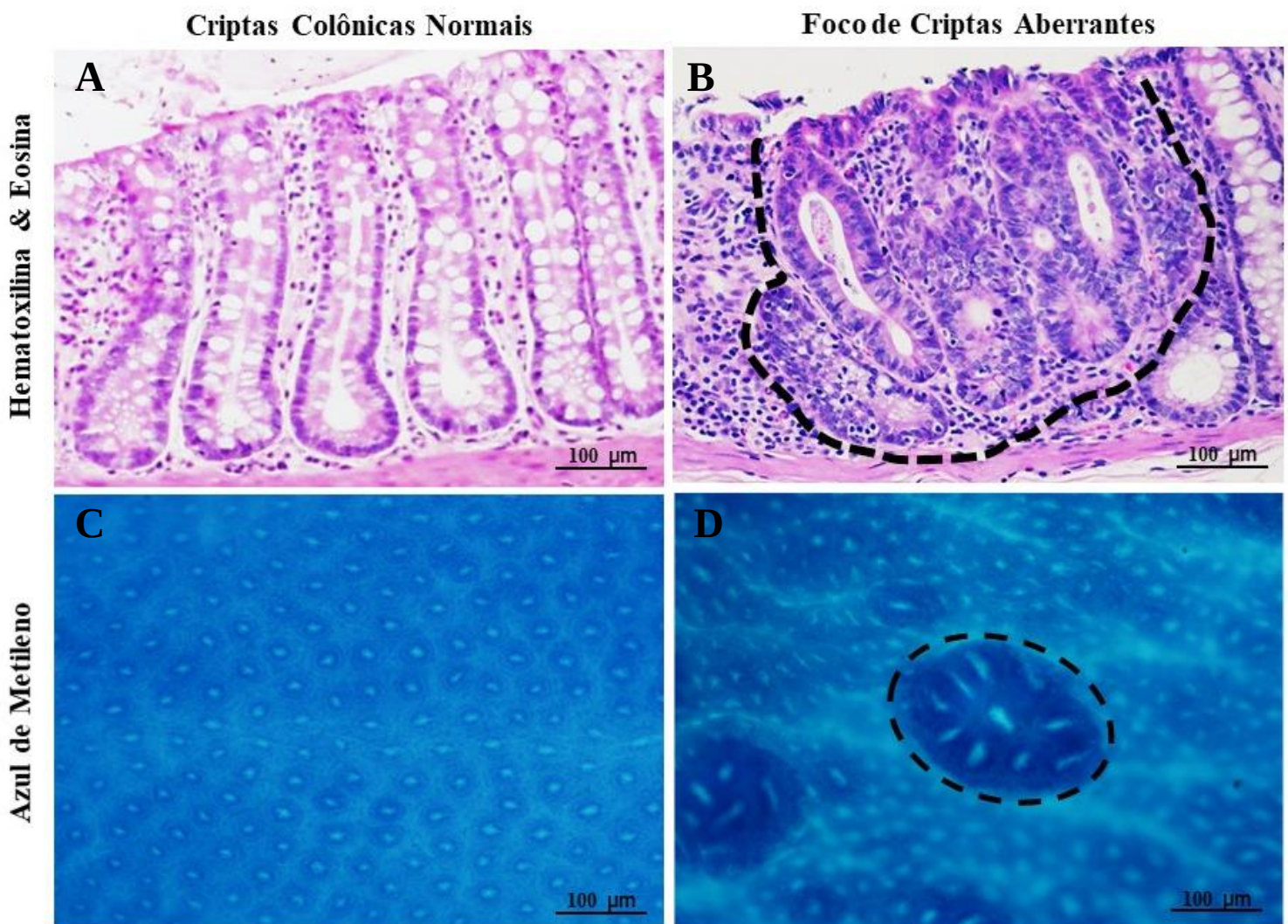


Figura 9: Epitélio Colônico Normal e Foco de Criptas Aberrantes. Visão perpendicular de (A) Criptas colônicas normais e (B) Foco de criptas aberrantes, corados com Hematoxilina & Eosina. Visão luminal de (C) Criptas colônicas normais e (D) Foco de criptas aberrantes, corados com azul de metileno. Fotomicrografias do arquivo do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE).

Os FCA são influenciados em número pela idade, padrões dietéticos e demais fatores de

risco, como o fumo e índice de massa corporal. A identificação desses em humanos permanece como um desafio, devido ao tamanho pequeno e a necessidade de técnicas corantes, comumente realizado pela cromoendoscopia de ampliação ou de alta resolução, onde é considerado o número de CA, o tamanho do FCA e a sua morfologia. (Alrawi et al., 2006; Lopez-Ceron & Pellise, 2012; Kowalczyk et al., 2018, 2021). Sua incidência pode ocorrer durante a vida toda, aumentando significativamente após os 50 anos de idade, e sua prevalência pode variar entre 15% e 77% em pessoas saudáveis e entre 80% e 100% em pacientes com neoplasias colorretais. Devido as controvérsias do papel do FCA na carcinogênese colorretal, a sua capacidade de regressão espontânea ao longo do tempo e que a maioria dessas lesões não evoluem para a formação de adenomas colorretais, fica claro que sua presença é de significância clínica e não deve ser muito destacada. Dessa forma, os FCA permanecem como potenciais biomarcadores do câncer, mas de maneira similar aos demais biomarcadores em desenvolvimento, demandando mais estudos para garantir sua aplicação clínica de forma confiável (Schoen et al., 2008; Gupta & Schoen, 2009; Choi et al., 2015; Kowalczyk et al., 2018; Clapper et al., 2020).

Em FCA hiperplásicos, são encontradas mutações no gene homólogo do oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten (KRAS) em sua grande maioria (de 67% a 100%) enquanto que mutações no gene polipose adenomatosa familiar (APC) são raras no caso do CCR hereditário ou esporádico (de 0 a 11%). Outras mutações em drivers também já foram descritas nesse contexto, como para os oncogenes BRAF, KRAS, NRAS e ERBB2 (8,3%, 16,7%, 8,3% e 4,2%, respectivamente). Em FCA displásicos, as mutações em KRAS aparecem com menor frequência no CCR hereditário do que no esporádico (de 0 a 13% e 40 a 67%, respectivamente) e as mutações em APC ocorrem em todos os CCR hereditários, ausente no esporádico. Mutações em BRAF não são comuns em FCA independentemente do tipo e do público avaliado (de 0 a 12,5%). Em adultos saudáveis, são encontradas mutações em APC, BRAF e KRAS (75%, 12,5% e 12,5%, respectivamente) nos FCA displásicos. De modo geral, as mutações em APC e KRAS podem ser consideradas os principais fatores genéticos na formação de FCA, eventos moleculares significativos para o CCR (Nucci et al., 1997; Otori et al., 1998; Takayama et al., 2001; Chan et al., 2002; Beach et al., 2005; Rosenberg et al., 2007; Clapper et al., 2020).

No CCR, existem duas principais vias precursoras, a via tradicional adenoma-carcinoma, também conhecida como sequência de instabilidade cromossômica, onde o adenoma serve como precursor para o câncer, correspondendo a cerca de 70% a 90% dos casos, e a via de Instabilidade de Microssatélites, responsável por cerca de 10% a 20% dos CCR. Ambas as vias são formadas por diversos eventos genéticos e epigenéticos distintos que serão melhores

descritos a seguir (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Dekker et al., 2019; Keum & Giovannucci, 2019). A via de instabilidade cromossômica (Figura 10) é a alteração mais comum no CCR esporádico, caracterizada por diversas modificações no número e na estrutura dos cromossomos (deleções, inserções e perda da heterozigossidade), o que pode acarretar na inativação de genes supressores tumorais (como APC e proteína tumoral p53 (TP53)), resultando na superativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina, que promove a proliferação celular desregulada e a evolução de adenomas. As mutações em APC são comuns em pacientes com polipose adenomatosa familiar, apresentando alta incidência de FCA displásicos, lesão relacionada com esse gene. Em adicional, a expressão de β -catenina citoplasmática e nuclear também está presente nos FCA displásicos (Lopez-Ceron & Pellise, 2012; Dow et al., 2015; Dekker et al., 2019; Keum & Giovannucci, 2019).

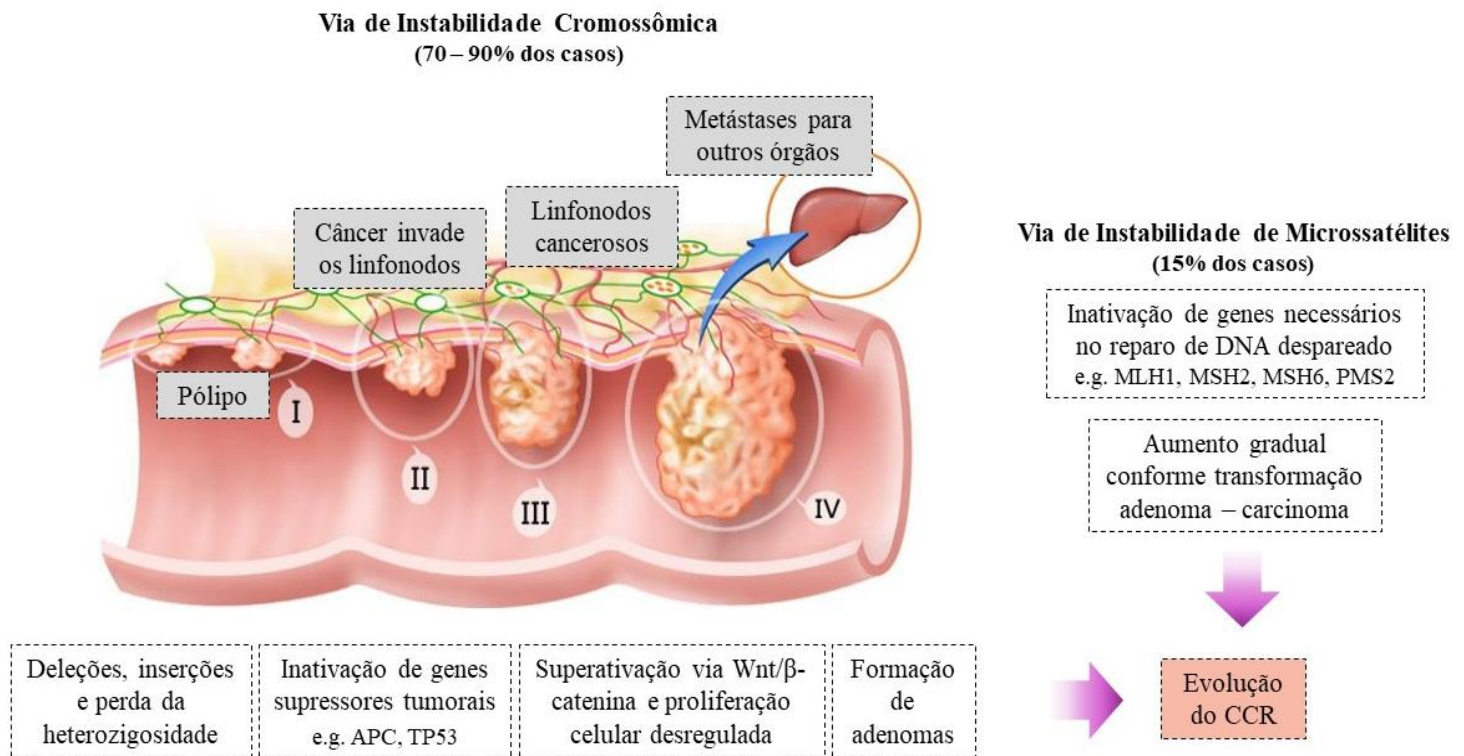


Figura 10: Principais Vias Precursoras do Câncer Colorretal. Câncer Colorretal (CCR). Imagem adaptada de National Institute of Cancer, disponível em: (<https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research>).

A via de instabilidade de microsatélites (Figura 10) acontece em cerca de 15% dos CCR esporádicos, ausente no tecido normal, e pode ser observada em aumento gradual conforme a transformação de adenoma para carcinoma. Essa via é baseada na inativação de genes necessários no reparo de DNA despareado (como MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2), que pode acontecer de maneira herdada (síndrome de Lynch), ou adquirida com a metilação do promotor

MLH1 (Lopez-Ceron & Pellise, 2012). A via serrilhada, sugerida como uma possível alternativa (Figura 11), sugere que o CCR evolui a partir da lesão serrilhada, onde a progressão acontece da célula normal para pólipos hiperplásicos ao adenoma serrilhado sésil e finalmente ao câncer invasivo. Essa lesão é caracterizada por mutações nos oncogenes KRAS e BRAF de forma mutuamente exclusiva, induzindo a proliferação celular descontrolada através da ativação constitutiva da via MAPK, gerando pólipos hiperplásicos. A instabilidade epigenética, como a metilação, é mais um evento molecular observado nessa via, e pode modificar a expressão de genes sem alterar sua estrutura básica, inativando genes como MGMT e MLH1. O fenótipo metilador de ilhas CpG diz respeito ao excesso de metilação dos nucleotídeos citosina-guanina ligados por um fosfodiéster, denominados de ilha CpG. Essas zonas são encontradas em grandes quantidades nas lesões serrilhadas, e podem promover a progressão para o adenoma e posteriormente o CCR (Lopez-Ceron & Pellise, 2012; Dekker et al., 2019; Keum & Giovannucci, 2019). Compreender os mecanismos pelo qual o CCR se desenvolve em humanos e os tipos de lesões induzidas por cada um desses, possibilita a investigação mais adequada desse câncer em modelos experimentais.

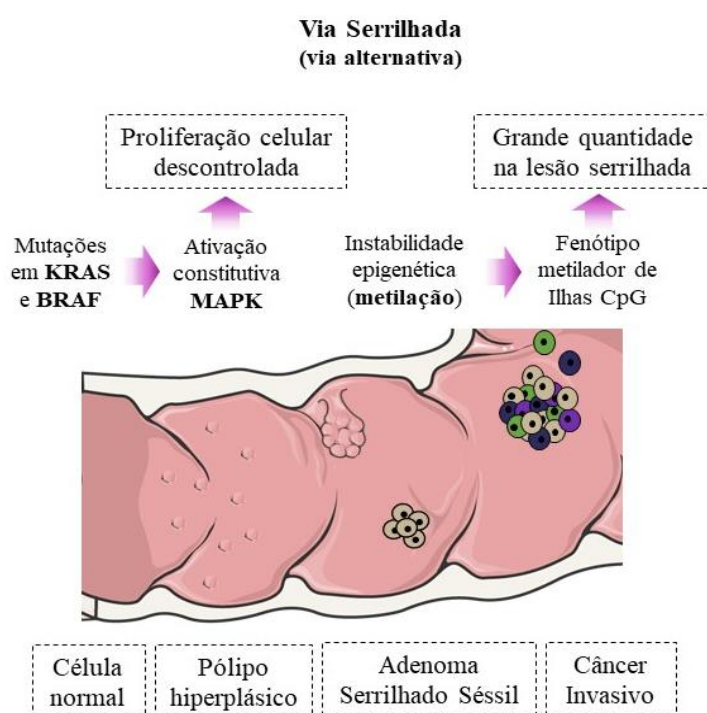


Figura 11: Via Serrilhada. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

1.6 Modelos experimentais do Câncer Colorretal

Os modelos experimentais de CCR permitem a reprodução da doença correspondente em seres humanos para uma investigação mais aprofundada de suas características específicas, além de serem indispensáveis para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Há décadas o CCR é investigado através de modelos de roedores quimicamente induzidos, o tornando bem estabelecido nesse contexto. Além disso, outros modelos de estudos foram desenvolvidos ao longo do tempo, dos quais podemos citar a cultura celular 2D e 3D, os animais geneticamente modificados e os de transplantes singênicos ou xenoenxertos (Rosenberg et al.,

2009; De-Souza & Costa-Casagrande, 2018; Burtin et al., 2020).

O estudo *in vitro* do CCR exerce um papel importante na elucidação de vias de sinalização do câncer e de alvos terapêuticos. Esse modelo conta com linhagens celulares de humanos (HT-29, HCT116, SW480, CaCo-2) ou roedores (MC38, CT26), sendo relativamente fáceis de usar, de baixo custo e garantem resultados experimentais em um curto período de tempo (Shoemaker, 2006; Golovko et al., 2015; Madunić et al., 2021). Além disso, as linhagens mais utilizadas são geneticamente bem caracterizadas, representando as alterações observadas no CCR humano. Apesar das vantagens, as linhagens celulares não contemplam a heterogeneidade genética e funcional existente em tumores humanos (MacLeod et al., 1999; Gerlinger et al., 2012). A grande novidade no estudo *in vitro* do CCR são os sistemas de cultura tridimensionais “organoides”, que vem tomando o lugar dos modelos tradicionais de culturas *monolayer* (ou 2D). Esses organoides podem ser formados por linhagens clássicas ou diretamente do tecido tumoral do paciente (“*patient-derived*”), podendo ser formado por diferentes partes do tumor, a fim de mimetizar sua heterogeneidade ou a diferença entre sítios primários e metastáticos, ou pela manipulação genética das células normais do intestino (Drost et al., 2015; Golovko et al., 2015; Matano et al., 2015).

O estudo *in vivo* conta com uma grande variedade de modelos e formas de indução do câncer, além de possibilitar uma visão mais abrangente dos processos da carcinogênese. Os modelos de animais geneticamente modificados variam de acordo com as vias moleculares alteradas, e pode se assemelhar com o câncer esporádico ou hereditário, em virtude da inativação de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes específicos (Burtin et al., 2020). Assim como em humanos, mutações no gene *Apc* podem levar a formação de adenomas intestinais em camundongos. Esse processo se inicia com um alelo mutante denominado de *multiple intestinal neoplasia* (MIN), que codifica uma mutação *nonsense* no códon 850, modelo conhecido de CCR. Posteriormente o modelo recebeu mutações alternativas, que dependendo do tipo e da modalidade, podem levar a adenomas ou adenocarcinomas invasivos (Moser et al., 1995; Robanus-Maandag et al., 2010). Além do *Apc*, outros genes podem ser modificados a fim de promover a carcinogênese, como *Trp53*, *Kras*, *Pik3ca*, *Fbxw7*, *Smad4*, *Tcf7l2* (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Os animais geneticamente modificados são muito utilizados em estudos de quimioprevenção, contribuindo, desta maneira, com a modulação das etapas iniciais da carcinogênese. Já os modelos de transplante, que utilizam de tecido tumoral ou células cancerosas, podem ser distinguidos entre singênico (que ocorre dentro da mesma linhagem de animais), xenográfico (entre diferentes espécies), heterotópicos ou ortotópicos (Burtin et al.,

2020). Esse modelo tem como vantagens a simplicidade de aplicação da técnica, o valor de custo acessível e a latência tumoral de apenas algumas semanas. No entanto, sua desvantagem se dá pelo uso necessário de animais imunossuprimidos e falta da heterogeneidade celular (Talmadge et al., 2007; Golovko et al., 2015).

Outra forma de induzir a carcinogênese colorretal em roedores, se dá pelo uso de agentes exógenos, como compostos químicos ou pela reprodução dos fatores de risco (Newmark et al., 2009; Burtin et al., 2020). O método mais utilizado para indução do CCR esporádico é a administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, PubChem ID 1322) ou de seu metabólito, azoximetano (AOM, PubChem ID 33184) (representado na Figura 12), ambos capazes de induzir lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, utilizados principalmente para avaliar compostos ambientais e dietéticos no contexto da carcinogênese colorretal (Rosenberg et al., 2009; Perse & Cerar, 2011; De-Souza & Costa-Casagrande, 2018; Caetano et al., 2020). Após aplicação, o DMH é ativado e metabolizado pelo fígado através do sistema de monooxigenases P450, onde é convertido em AOM, acetato de metilazoximetanol e íons metildiazônicos. Esses, podem atingir o cólon de forma direta, biotransformando os colonócitos e a microbiota intestinal, ou de forma indireta através da bile e do sangue, onde pode alquilar as bases de DNA guanina e timina, dando início ao processo de carcinogênese (Glauert & Bennink, 1983; Rosenberg et al., 2009; Perse & Cerar, 2011; Burtin et al., 2020; Caetano et al., 2020).

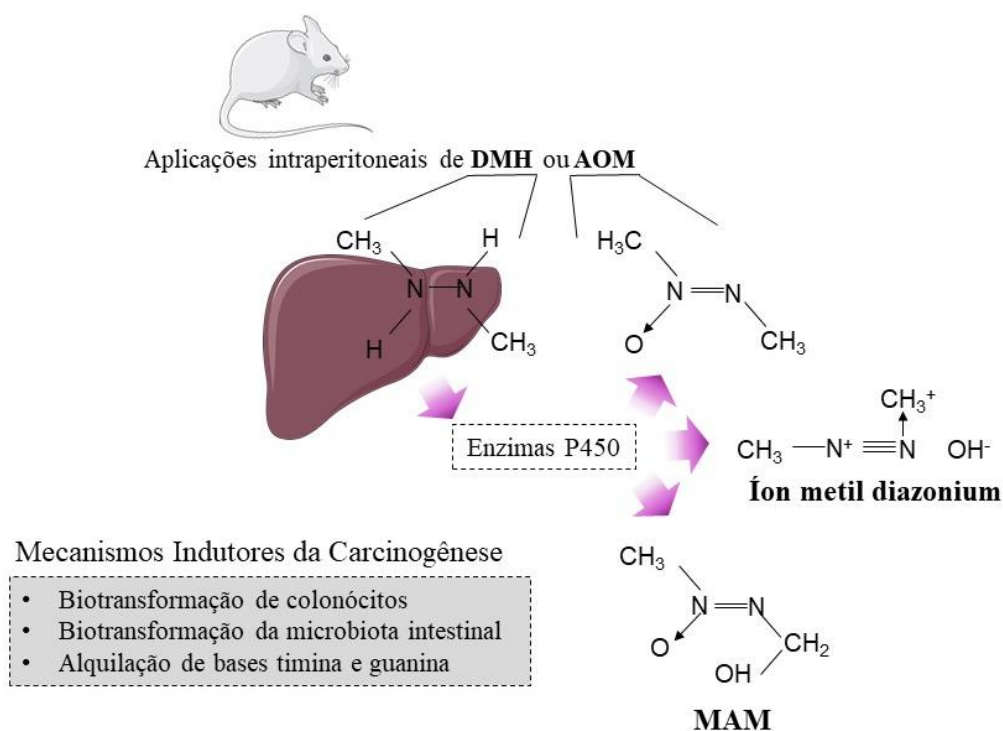


Figura 12: O metabolismo do DMH. 1,2-dimetilhidrazina (DMH), azoximetano (AOM), metilazoximetanol (MAM). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

A administração desses compostos induz lesões similares aquelas observadas em humanos, incluindo FCA, adenomas e adenocarcinomas. Em ratos, duas doses semanais de DMH (40 mg/kg de peso corpóreo) durante duas semanas, provocou inflamação difusa nas áreas vasculares do fígado e do cólon, somado com a distorção das criptas colônicas, perda e desintegração das células caliciformes, logo após 24 horas da última administração do carcinógeno. Além disso, a aplicação do DMH aumentou os níveis de proliferação celular e apoptose nas criptas intestinais, acompanhado de aumento do dano ao DNA em amostras de sangue periférico. Ao nível molecular, o tratamento agudo com DMH aumentou o estresse oxidativo e reduziu a resposta antioxidante tanto no cólon quanto no fígado, além de aumentar os genes relacionados com apoptose no fígado e os genes relacionados com a diferenciação celular em ambos os órgãos. A longo prazo, foram encontrados FCA pré-neoplásicos no cólon de todos os animais que receberam DMH, dos quais apresentaram características histológicas hiperplásicas e displasia em diversos graus de intensidade. Nesse modelo, a incidência tumoral foi elevada, em sua grande maioria como adenocarcinomas tubulares invasivos, demonstrando que o DMH atua como um carcinogênico completo para o cólon (Caetano et al., 2020). A formação dessas lesões são proporcionais ao tempo de exposição, dose e frequência de aplicação dos carcinógenos, sendo o AOM um indutor principalmente de FCA e da inflamação quando associado ao dextran sulfato de sódio a curto/médio prazo, enquanto o DMH promove tumores colorretais em estágios mais avançados, a depender do protocolo adotado (Lahouar et al., 2014; De-Souza & Costa-Casagrande, 2018).

2. Junções Comunicantes

2.1 Comunicação Celular e Junções GAP

A comunicação intercelular (CI) é de extrema importância em todos os sistemas orgânicos multicelulares, tendo como objetivo manter a homeostase tecidual (Barbe et al., 2006). Por meio da CI ocorre a coordenação das funções celulares de um tecido e a resposta síncrona de grupos celulares aos estímulos externos, mesmo que apenas algumas dessas células sejam capazes de detectar esse estímulo (Beyer & Berthoud, 2018). Existem duas formas de CI, sendo essas a humoral, que ocorre através de fatores de crescimento ou hormônios, e pela comunicação direta, que acontece entre as células justapostas através das junções comunicantes, ou junções GAP (JGAP), ilustrada na Figura 13 (Yamasaki et al., 1995).

As JGAP atuam no controle da passagem de íons, microRNAs e moléculas pequenas (com menos de 1 kDa), sem exposição ao ambiente extracelular. Além disso, as JGAP são os únicos

canais que mediam a troca citoplasmática direta, relacionando o meio intracelular com o extracelular, ação importante para a sinalização autócrina e parácrina (Sáez et al., 2003; Gong et al., 2022). Dessa forma, as junções comunicantes exercem o seu papel dentro da fisiologia normal dos tecidos, com grande importância na sobrevivência celular, proliferação e também apoptose. No entanto alterações em sua estrutura, função ou quantidade, podem comprometer sua atividade e levar a consequências patológicas, como o câncer (Yamasaki et al., 1995; Sáez et al., 2003). Diversos estudos relacionam a expressão aberrante de JGAP ou de suas proteínas com uma ampla gama de doenças, demonstrando a grande importância dessas estruturas e de seus componentes tanto no aspecto fisiológico quanto patológico (Kelly et al., 2015; Beyer & Berthoud, 2018).

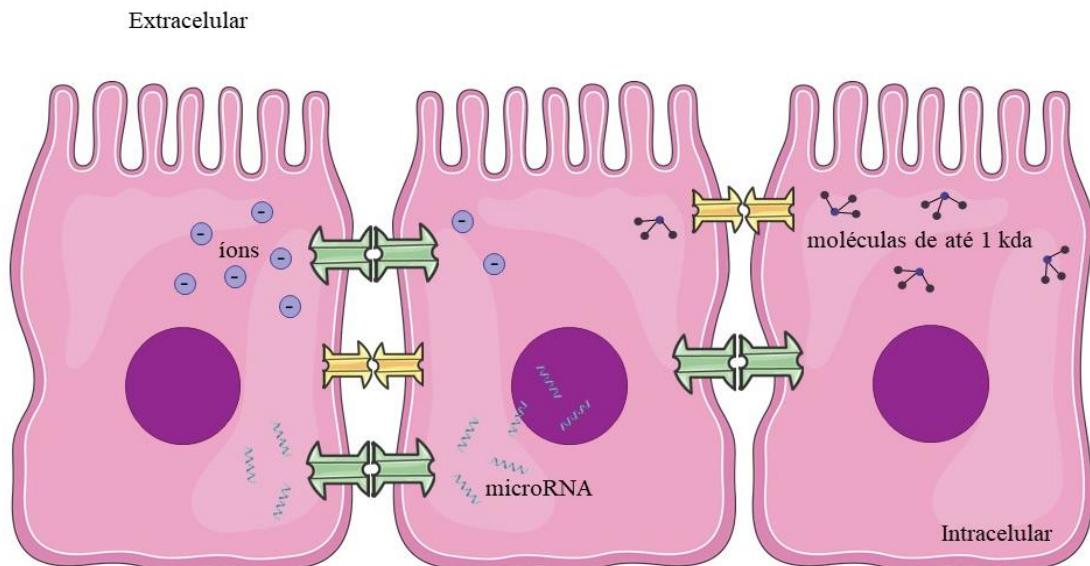


Figura 13: Comunicação Celular Via Junções GAP. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

As JGAP são formadas por canais transmembranares que resultam em poros condutores entre as células, sendo necessário o emparelhamento e acoplação de dois hemicanais entre células adjacentes para realizar a CI. A JGAP pode ser formada por duas placas conectivas iguais, classificada como homomérica, ou placas diferentes, sendo heteromérica. Cada hemicanal é gerado pela oligomerização de proteínas (conexinas (Cx), inexas ou panexas (Panx)), que podem atuar de forma independente da JGAP, envolvidos na sinalização parácrina e possibilitando uma via de liberação extracelular de elementos como trifosfato de adenosina (ATP), glutamato e prostaglandinas. As funções dos hemicanais compostos por Cx e Panx ainda estão sendo investigadas (Danesh-Meyer & Green, 2008; Goodenough & Paul, 2009; Beyer & Berthoud, 2018; Epifantseva & Shaw, 2018; Campenhout et al., 2020).

2.2 Conexina 43

2.2.1 Estrutura das Conexinas

As Cx pertencem a uma família multigênica de proteínas formadoras de JGAP, divididas em subfamílias (GJA, GJB, GJC, GJD e GJE) de acordo com suas características (Kumar & Gilula, 1992; Beyer & Berthoud, 2018). Todas as Cx humanas possuem uma forma de organização parecida, composta por quatro regiões hidrofóbicas de aminoácidos, denominadas de domínios transmembranares, separados por duas alças extracelulares, com três componentes citoplasmáticos, uma alça intracelular e ambos os terminais amino e carboxil localizados no interior da célula (Figura 14) (Danesh-Meyer & Green, 2008; Skerrett & Williams, 2017; Epifantseva & Shaw, 2018). Atualmente são reconhecidas 21 isoformas de Cx em humanos, nomeadas de acordo com o peso molecular do polipeptídeo, em kilodaltons (kDa). Dessas, as mais conhecidas são Cx26, Cx32 e Cx43, com ênfase na Cx43, por ser a mais prevalente nos tecidos e mais investigada.

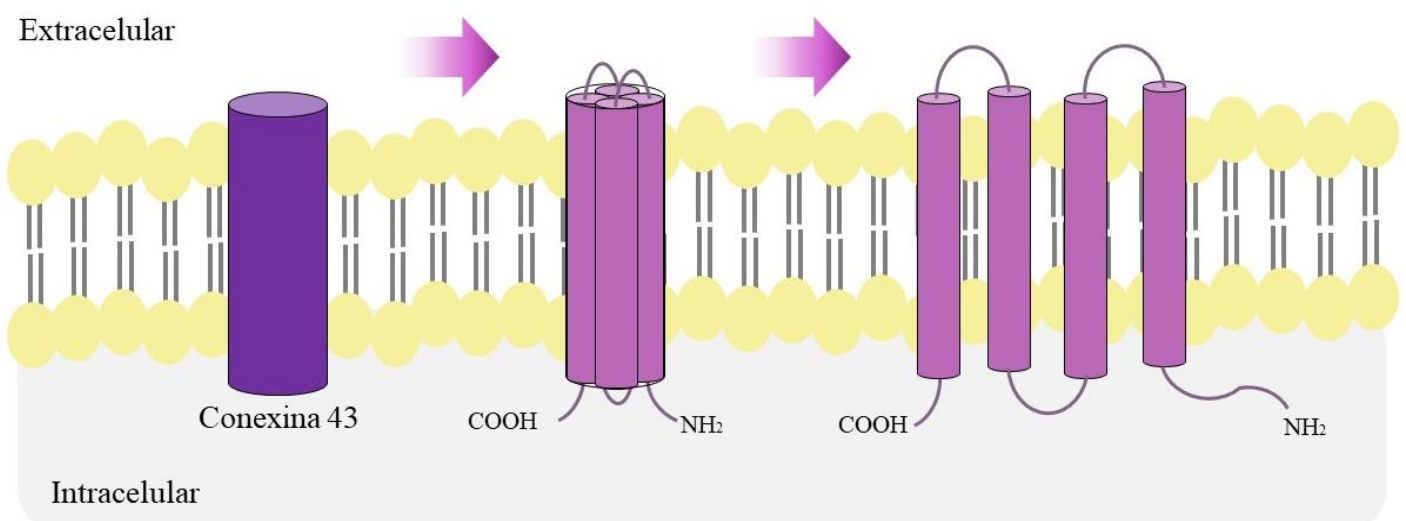


Figura 14: Estrutura da Conexina 43. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServer (<https://smart.servier.com/>).

As Cx normalmente seguem o padrão secretor clássico durante a formação de JGAP, onde é sintetizada pelos ribossomos ligados à membrana e integrada no retículo endoplasmático. Em sequência, as Cxs são oligomerizadas em locais específicos para cada Cx, ocorrendo no retículo endoplasmático para a Cx26 e Cx32, e no aparelho trans-Golgi para a Cx43. Após esse processo, as Cxs são transportadas para a superfície celular com o auxílio de microtúbulos e proteínas motoras, onde formam um hemicanal hexaédrico, denominado de conexon (Figura 15). Os conexons homoméricos são compostos por apenas um tipo de Cx, enquanto os

heteroméricos por diferentes tipos (Danesh-Meyer & Green, 2008; Beyer & Berthoud, 2018; Campenhout et al., 2020). O tempo de meia vida também pode variar de acordo com a isoforma da Cx. Em hepatócitos de roedores, a meia-vida da Cx32 tem duração aproximada de cinco horas, enquanto leva uma hora e meia, desde a síntese até a degradação (por digestão interna com proteassomas), para a Cx43 em cardiomiócitos (Fallon & Goodenough, 1981; Harris, 2001).

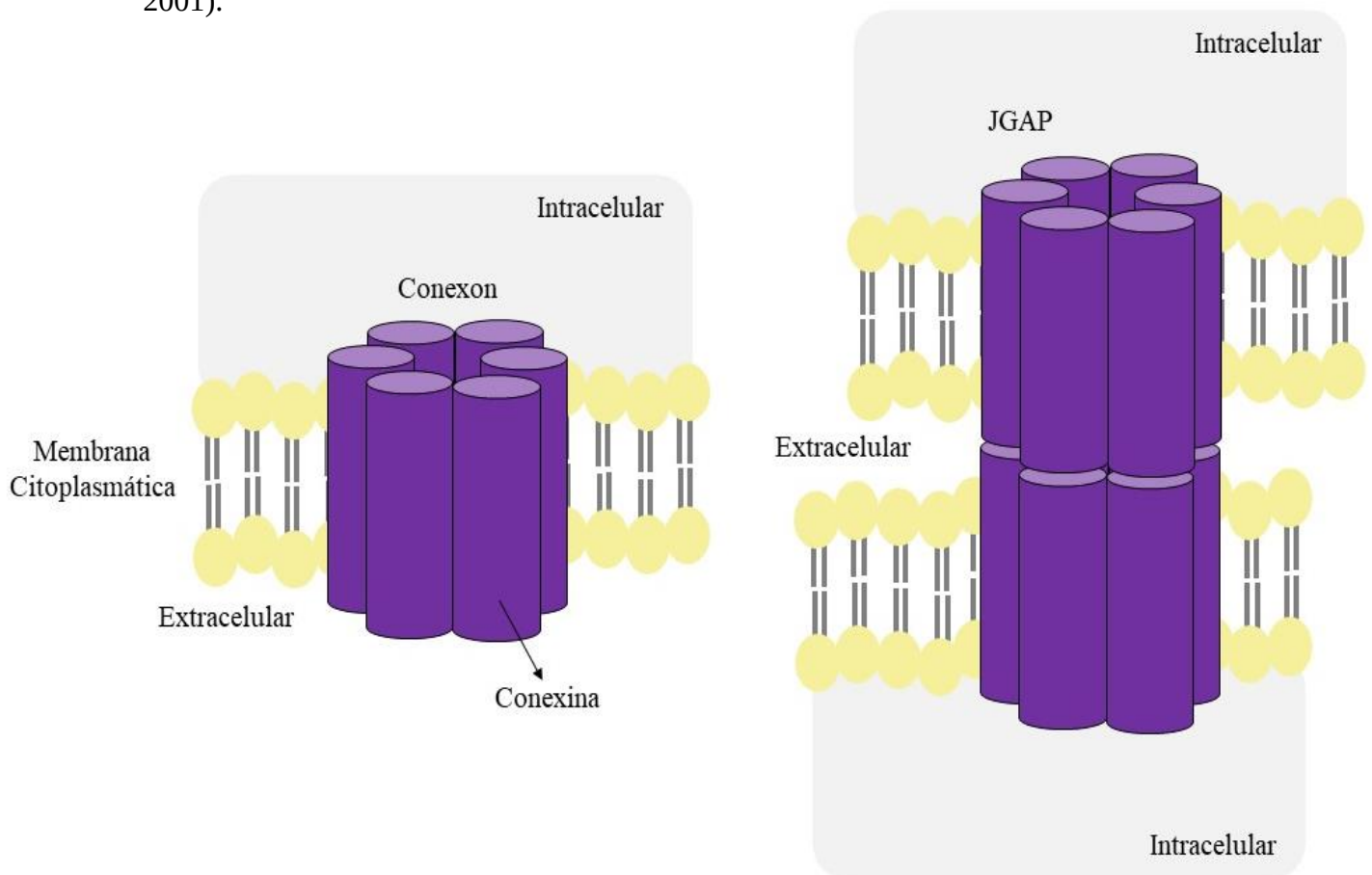


Figura 15: Estrutura do Conexon e suas Junções GAP; Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

2.2.2 Funções da Conexina 43

As Cxs exercem funções JGAP-dependentes, hemicanais-dependentes ou isolada de ambos, sendo hemicanal- e JGAP-independentes. A Cx43 exerce papéis importantes na fisiologia normal dos tecidos, estando presente em diversos órgãos como olho, pele, pulmão, coração, mama, fígado, estômago, rim, próstata, cólon e no sistema nervoso central (SNC). (Danesh-Meyer & Green, 2008; Dbouk et al., 2009; Boengler & Schulz, 2017; Epifantseva & Shaw, 2018). Um exemplo de função JGAP-dependente pode ser observado por conta de uma propriedade comum das Cxs, que são controladas por estímulos elétricos e podem exibir vários tipos de condutância dependentes de voltagem (Spray et al., 1979). A Cx43 exerce uma função

fundamental em tecidos excitáveis ao facilitar a comunicação entre as células vizinhas, e transmitir o potencial de ação de forma mais rápida, contribuindo com a sincronicidade dos batimentos cardíacos e a propagação dos sinais elétricos cerebrais (Shaw & Rudy, 1997; Martins-Marques et al., 2015; Walrave et al., 2018). Para a passagem do potencial de ação em direção única, é necessário que exista assimetria estrutural, como no caso das JGAP heteroméricas, onde um conexon tem reação rápida ao estímulo elétrico e o outro não. Contudo, as relações heteroméricas das Cxs ainda devem ser melhores investigadas (Oh et al., 1999; Bukauskas et al., 2002; Defourny et al., 2019).

Outras funções, agora hemicanais-dependentes, das Cxs é a regulação do crescimento, proliferação e morte celular, através da interação dessas com proteínas como a β -catenina e a família das caderinas, além de proteínas de zônula de oclusão, proteínas superexpressas em nefroblastoma ou da família do linfoma-2 de células B (Bcl-2) e quinase 1, reguladora de sinais de apoptose (Campenhout et al., 2020). Como exemplo, a Cx43 é capaz de interagir com a β -catenina (proteína envolvida na adesão celular, conectando o citoesqueleto das células adjacentes) nas regiões de contato entre célula-célula, e regular a via de sinalização Wnt/ β -catenina, controlando através dessa interação, os mecanismos envolvidos na renovação, regeneração e também na morte celular. Esse, é um dos mecanismos propostos pela ação supressora tumoral da Cx43, que quando expressa em altos níveis resulta no sequestro da β -catenina e consequentemente na redução da sua atividade em cardiomiócitos (Ai et al., 2000; Valenta et al., 2012; Kanczuga-Koda et al., 2014; Nusse & Clevers, 2017; Campenhout et al., 2020).

A capacidade das Cxs influenciarem na proliferação celular e apoptose também foi demonstrado de maneira hemicanal- e JGAP-independente, onde o estado de fosforilação dessa proteína pode influenciar nesses mecanismos. Além disso, a ação isolada dessa proteína também foi observada no controle da progressão do câncer, na diferenciação dos músculos e na regulação e desenvolvimento genético (Aasen et al., 2016; Campenhout et al., 2020; Totland et al., 2020). As Cxs por si só, são capazes de influenciar no ciclo celular, pela mediação da expressão de reguladores do crescimento e morte celular, podendo também afetar diretamente na transcrição genética. Um exemplo da ação da Cx43 na transcrição de genes, foi observado por um grupo de aminoácidos localizados na região C-terminal dessa proteína, que foram capazes de inibir o c-Src, um proto-oncogene, em células de glioma e astrócitos. Foi identificado também, que parte dessa região C-terminal está localizada no núcleo, e a relocação da Cx43 pode inibir o crescimento celular. Os efeitos dessa proteína também podem ser

identificados na transcrição de genes determinantes na homeostase tecidual, controlados por JGAP, no entanto, o papel da Cx43 nesse contexto ainda precisa ser elucidado. (Dang et al., 2003; González-Sánchez et al., 2016; Campenhout et al., 2020).

2.2.3 Relatos da Conexina 43 no Cólon

No cólon humano normal, são expressas as Cx43, Cx32, Cx26, Cx45 e Cx31.9 (RNA mensageiro/proteínas), localizadas em compartimentos intracelulares ou como domínios de JGAP na membrana plasmática. As Cxs intestinais, assim como em outros órgãos, exercem padrões de expressão específicos em cada tipo celular. A Cx43 é distribuída entre as células epiteliais das criptas e principalmente na camada muscular da mucosa. Em testes de imunohistoquímica, a superfície luminal da mucosa apresentou imunorreatividade fraca para essa proteína, com marcação pontual na borda interna, próxima à submucosa e na camada circular da muscular externa. No entanto, a camada muscular longitudinal não exibiu imunorreatividade para Cx43, demonstrando sua ausência nessa região. Em contraste a Cx26 e Cx32, apenas a Cx43 estava presente nas arteríolas do cólon, embora todas as Cxs citadas estejam presentes nas células epiteliais, principalmente no epitélio superficial da mucosa colônica, sem variação dos níveis de expressão entre elas (Kanczuga-Koda et al., 2004; Maes et al., 2015; Sirnes et al., 2015).

A Cx43 atua em funções fisiológicas importantes no intestino, onde é marcável desde a embriogênese pela promoção da transferência de sinais necessários no endoderma intestinal, evento importante para a formação adequada do tubo digestório (Saund et al., 2012). Seu envolvimento em processos essenciais na embriogênese, tornou-se impossível a investigação do nocaute (KO) da Cx43 *in vivo*. Limitação que foi observada desde o primeiro modelo desenvolvido, onde os animais morreram logo após o nascimento, devido a uma falha na troca gasosa pulmonar, provocada pelo aumento significativo do ventrículo direito, onde o coração foi o único órgão que apresentou morfogênese anormal. Esse resultado também foi relatado em outros estudos, que buscaram por outras formas de avaliar essa proteína (Reaume et al., 1995; Lo, 2000; Vaidya et al., 2001; Gunther et al., 2013).

Demonstrado em células intersticiais de Cajal e em miócitos de músculo liso (células responsáveis pelo controle da motilidade intestinal), as JGAP de Cx43 também estão envolvidas na estimulação dos nervos intestinais, devido as suas características excitáveis, descritas anteriormente (Nemeth et al., 2000; Daniel et al., 2001; Sibaeve et al., 2006). Em células de músculo liso no intestino de roedores, a inibição da Cx43 provocou alterações na resposta

visceromotora e na contratilidade muscular, além de reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal, ampliar a infiltração de neutrófilos e o espessamento da túnica muscular (Doring et al., 2007). Outra forma da Cx43 modular a motilidade e o trânsito colônico, se dá pela interação dessa com a resposta ao cálcio na glia entérica, observado em cólon de camundongos (McClain et al., 2014).

Além disso, a Cx43 atua como um componente importante durante a resposta imune inata no epitélio intestinal. Tal que a ativação de receptores *Toll-like 2* provoca o aumento da expressão dessa Cx, controlando sua função de barreira, o que contribui com a restituição dos danos provocados por processos inflamatórios (Ey et al., 2009; Maes et al., 2015). Demonstrado pela primeira vez em 2010, as JGAP de Cx43 funcionais no intestino atuam como um mecanismo molecular no controle da excreção de água no caso de diarreia infecciosa. Durante a infecção por um patógeno causador de diarreia em murinos, similar a *Escherichia Coli*, os níveis proteicos de Cx43 aumentaram nos colonócitos de camundongos. Essa alteração resultou na abertura funcional dos hemicanais na membrana apical das células infectadas, estando envolvida na liberação de água e contribuindo com a diarreia (Guttman et al., 2010). As funções da Cx43 no cólon são ilustradas na Figura 16.

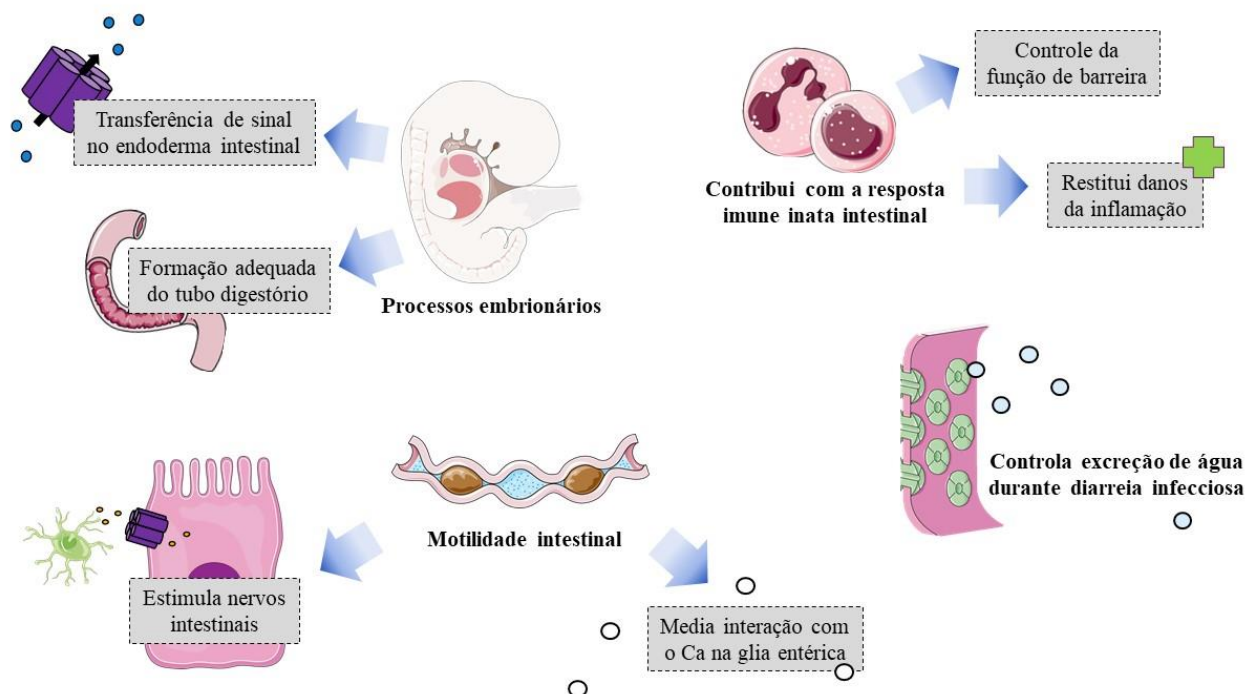


Figura 16: Funções da Conexina 43 no Cólon. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

2.2.4 A Conexina 43 e suas interações com o Câncer Colorretal

Em 1966, foi proposto pela primeira vez a relação entre comunicação celular através de JGAP e o câncer, por Loewenstein e Kanno, que identificou uma perda de acoplamento elétrico nas células de tumores hepáticos, responsável pela alteração da CI em todos os cânceres avaliados (Loewenstein & Kanno, 1966). Resultado que foi posteriormente demonstrado em outras investigações, que com o passar dos anos, ficou evidente que a relação entre as JGAP com o câncer é muito mais complexa do que foi inicialmente imaginado (Aasen et al., 2016). A presença da Cx43 no epitélio normal e sua frequente mutação nos tumores de cólon, são indicações da relação dessa proteína com a carcinogênese colorretal (Dubina et al., 2002; Han et al., 2011). No CCR, a Cx43 tem baixa expressão ou está deslocada da membrana plasmática para compartimentos intracelulares, não se organizando como JGAP. Esses eventos foram demonstrados pelo estudo *in vitro*, onde nenhuma das linhagens avaliadas foram capazes de realizar CI via JGAP (Kanczuga-Koda et al., 2010; Sirnes et al., 2012). Nos estágios iniciais da doença, a expressão da Cx43 foi significativamente menor em adenomas com alto grau de displasia, adenomas maiores e adenomas vilosos, em relação a mucosa normal circundante, mas não foi observada diferença significativa na expressão entre os adenomas. Enquanto que a presença da Cx43 na mucosa próxima ao adenoma, pode ser um fator indicativo do potencial maligno dessa lesão (Bišćanin et al., 2016).

Pela avaliação *in situ* de tumores colorretais, foi indicada a presença da Cx43 de forma difusa no citoplasma, núcleo ou em compartimentos intracelulares, onde a maioria dos tumores expressavam a Cx43 e combinavam essas localizações. Já nos tumores com baixa expressão ou ausência da Cx43, foi observado um quadro clínico pior, com sobrevida (livre de recidiva e global) significativamente menor do que os demais pacientes. No CCR em estágio I e II, a perda da expressão da Cx43 foi correlacionada com a redução da sobrevida (livre de recidiva e global), mas nenhuma associação foi observada nos estágios III e IV (Sirnes et al., 2012). Ao comparar os níveis de expressão da Cx43 em tumores colorretais primários e de estágio III e IV, foi observado um aumento da Cx43 estromal no estágio mais avançado. Dessa forma, a expressão estromal dessa proteína é um possível indicador do potencial metastático do CCR (Radic et al., 2016). Outros estudos corroboraram com esses resultados, demonstrando que a Cx43 não está expressa em todos os casos de adenomas e CCR, por vezes presente apenas de forma focal na mucosa normal circundante ao CCR, com expressão reduzida nos estágios iniciais e relacionada com o tipo histológico e as propriedades invasivas do câncer (Ismail et al., 2014; Ayad et al., 2020).

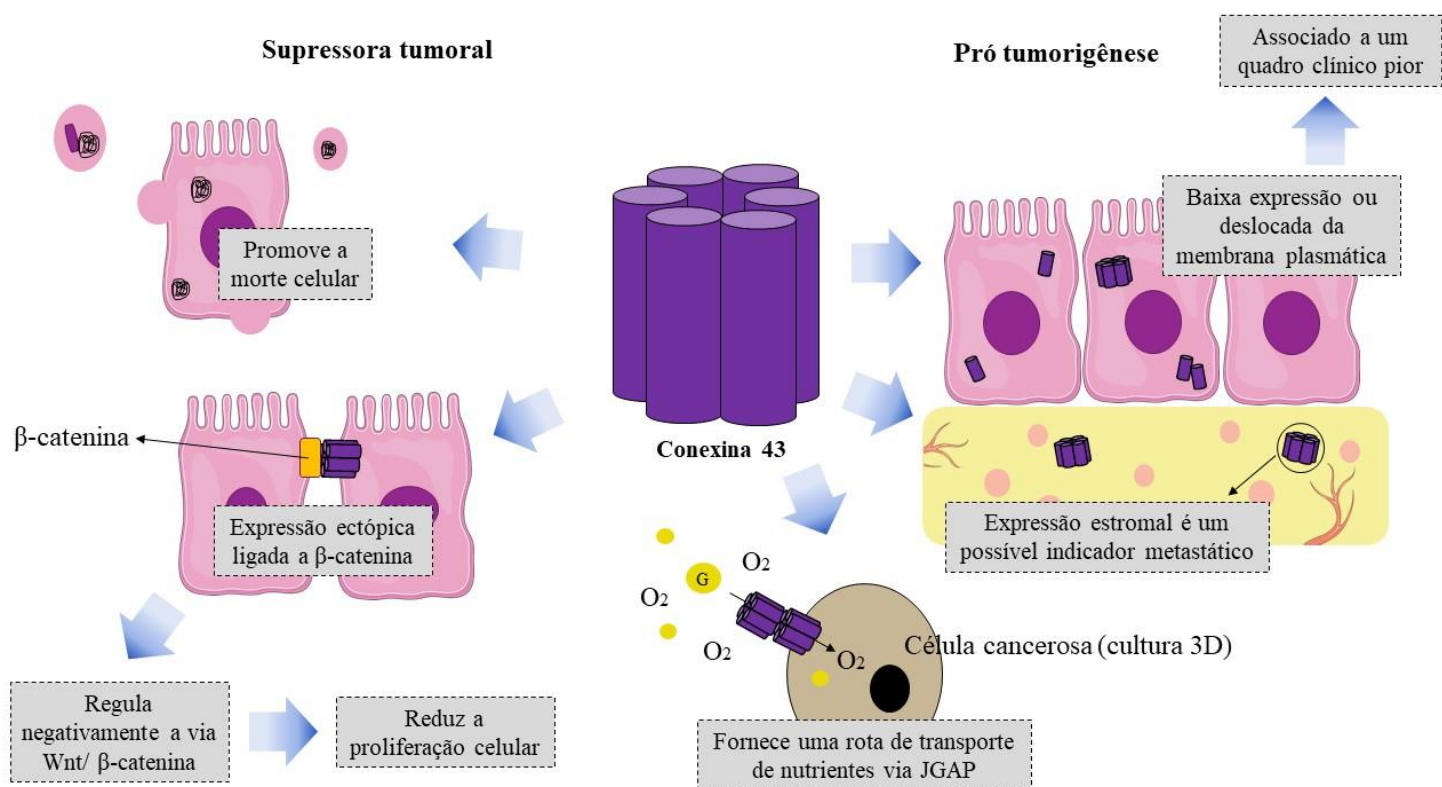


Figura 17: Relatos da Conexina 43 na Carcinogênese Colorretal. Junções GAP (JGAP), Glicose (G), Oxigênio (O₂). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

A princípio, as Cxs foram classificadas como supressoras tumorais via funcionamento normal das JGAP, no entanto, resultados controversos foram aparecendo, marcados pelo aumento significativo da expressão de Cxs em diversos tipos de câncer. Parte da complexidade desses resultados pode ser explicado pela grande importância das Cxs não apenas no tumor, mas também nos tecidos normais do paciente. Portanto, deve ser levada em consideração a isoforma da Cx, o estágio da doença e qual tecido foi acometido (Han et al., 2011; Aasen et al., 2016; Ayad et al., 2020). A Cx43 por sua vez, apesar de também ter associações negativas, é predominantemente relacionada com bons resultados, incluindo no CCR (Sirnes et al., 2012; Tanaka et al., 2016). O efeito supressor tumoral dessa proteína foi elucidado pela primeira vez através de células HT29 transfectadas, a fim de expressar a Cx43 nos compartimentos intracelulares. Apesar da ausência de JGAP funcionais, a Cx43 expressa esteve associada com uma redução significativa no crescimento da cultura *monolayer*, independente de ancoragem e dos xenoinxertos. As células que expressavam a Cx43 foram mais propensas a exibir alterações morfológicas semelhantes as células apoptóticas, além da expressão ectópica dessa proteína estar parcialmente ligada a β-catenina na membrana plasmática, tanto de células apoptóticas

quanto em proliferação, sendo assim, capaz de regular negativamente a via de sinalização Wnt e reduzir a proliferação celular, demonstrando o papel supressor da Cx43 no CCR (Sirnes et al., 2012).

Apesar dos dados apresentados (sintetizados na Figura 17), existem resultados controversos na literatura tanto na sua expressão quanto função. A Cx43 também foi evidenciada em marcações raras e pontuais na mucosa colônica normal, acompanhada de um aumento progressivo de sua expressão citoplasmática durante a transição epitélio normal, para adenoma e CCR, localizada predominantemente no citoplasma das células cancerosas, nos componentes estromais e nas regiões invasivas do CCR. Em adicional, não foi observada qualquer atividade nuclear da β -catenina no epitélio colônico, ou relação entre seus níveis com a Cx43 (Han et al., 2011). Contradizendo sua ação supressora tumoral via funções JGAP-independentes, a Cx43 foi demonstrada por ser capaz de reduzir a área nuclear necrótica em esferoides de CCR (linhagem HT29 e HCT116), ao fornecer uma rota de transporte para os nutrientes necessários no metabolismo de tumores sólidos, via JGAP, promovendo vantagem no crescimento dessas células (Gong et al., 2022). Visto a complexidade das interações, a desarmonia dos resultados e a recente investigação das Cxs, ainda existem lacunas para serem respondidas quanto aos papéis da Cx43 na carcinogênese colorretal.

2.3 Panexina 1

2.3.1 Estrutura da Panexina 1

A investigação do genoma humano em busca de estruturas similares as inexas (proteínas análogas as Cxs, formadoras de JGAP em invertebrados), revelou a existência de genes possivelmente formadores de JGAP, denominados de “*pannexins*” (Panchin et al., 2000). Atualmente são identificadas três Panxs no genoma de humanos e roedores, denominadas progressivamente por números arábicos. A Panx1 e Panx3 são mais relacionadas entre si, com uma distância de 30 Mb entre seus genes codificantes, enquanto que o gene PANX2 em humanos é específico para o cérebro. Análises de *northern blot* revelaram a presença da Panx1 e Panx2 em diversos tecidos de roedores, como no SNC, olho, tireoide, próstata e rim (Bruzzone et al., 2003; Vogt et al., 2005). A sondagem dos tecidos humanos confirmou a ampla distribuição da Panx1, que é encontrada principalmente no coração, nas gônadas e no músculo esquelético, enquanto que aparentemente a Panx2 está restrita ao cérebro. A Panx3 é a mais restrita, detectada apenas na pele (Bruzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004; Barbe et al., 2006).

A Panx1, categorizada como onipresente, é composta por quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares, uma alça intracelular e resíduos terminais citosólicos C e N. Acreditava-se que os hemicanais de Panx1, ou panexons, se oligomerizavam como hexâmeros, tais quais as Cxs, mas recentemente foi revelado sua estrutura heptaédrica de subunidades idênticas ao redor de um eixo central. A estrutura da Panx1 e do panexon, podem ser observadas na Figura 18 (Penuela et al., 2014; Deng et al., 2020; Navis et al., 2020; Qu et al., 2020). A região terminal-C tem baixa densidade e além disso, flexibilidade própria, o que indica seu papel como portão de canal. A ativação dos canais de Panx1 pode ocorrer de forma irreversível pela clivagem da caspase na região terminal-C, no entanto essa não é a única forma de ativação, visto que a remoção desse terminal não impede a variação de voltagem do canal (Chiu et al., 2017; Mou et al., 2020). Foram identificadas duas formas distintas de abertura do panexon, cada uma com o seu próprio nível de permeabilidade, dependendo do tipo de ativação (Wang et al., 2014). A abertura desse poro pelo meio extracelular ocorre através dos domínios transmembranares, enquanto que a abertura interna é feita pela região C-terminal. Externamente, o canal de Panx1 é revestido por compostos hidrofóbicos e básicos, enquanto carrega um potencial eletrostático líquido positivo no citoplasma, proposto por atrair ânions e ATP de carga negativa. A Panx1 tem um único sítio de glicosilação identificado, localizado na segunda alça extracelular. A grande maioria dessas proteínas estão alocadas na membrana celular, exibindo glicosilação complexa, o que pode impedir a formação das JGAP (Penuela et al., 2014; Deng et al., 2020; Michalski et al., 2020; Navis et al., 2020).

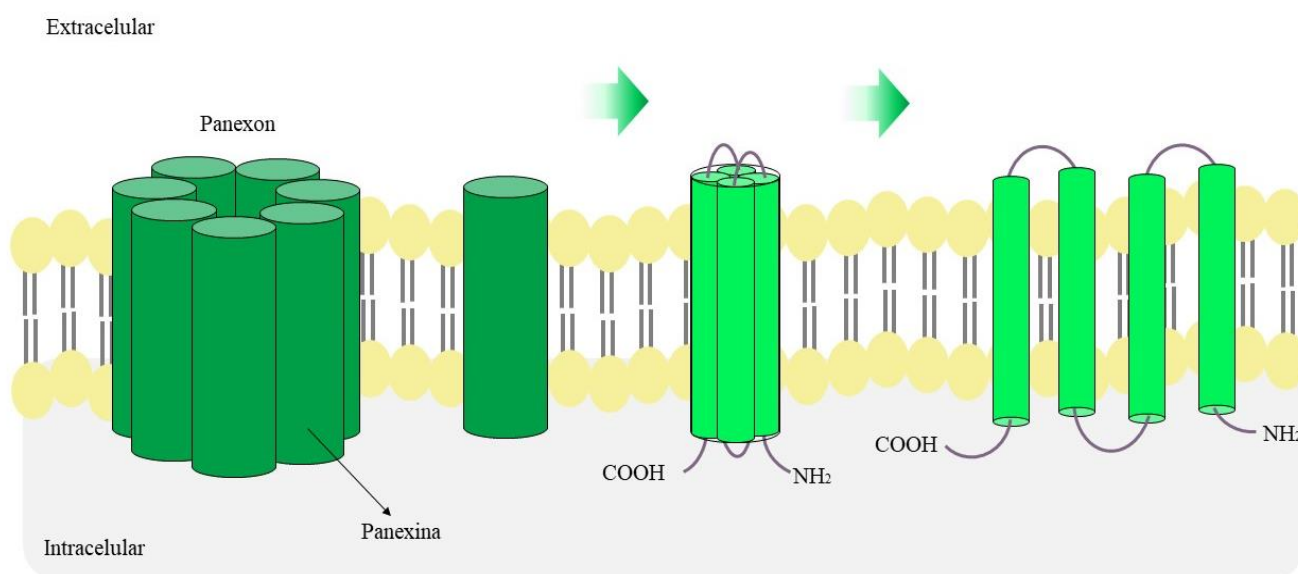


Figura 18: Estrutura do Panexon e da Panexina 1. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

2.3.2 Funções da Panexina 1

Devido as similaridades das estruturas proteicas de Panx1 e Cx43, a elucidação dos papéis da Panx1 foi direcionada por resultados previamente encontrados em outros estudos de JGAP (Barbe et al., 2006) e foram sumariadas na Figura 19. Todas as Panxs demonstraram a capacidade de formar panexons, comprovada através da captação de corantes (Locovei et al., 2007; Thompson et al., 2008). Inicialmente, a Panx1 sozinha ou em combinação com a Panx2, foi dita por formar JGAP com insensibilidade a potências transjuncionais de polaridade (Bruzzzone et al., 2003, 2005). No entanto, as placas formadoras da JGAP de Panx possuem uma conformação morfológica diferente das placas de Cx, além de não existirem evidências ultraestruturais da formação de JGAP de Panx ou como qualquer outra estrutura de membrana em vertebrados. Dessa forma, as Panx são consideradas incapazes de formar JGAP e seu mecanismo de ação é hemicanal-dependente (Rash et al., 1998; D'hondt et al., 2009; MacVicar & Thompson, 2010; Plotkin & Stains, 2015).

Os panexons são permeáveis assim como os conexons, possibilitando a passagem de íons e metabólitos, podendo variar o tamanho de abertura do poro de acordo com a sua forma de ativação (Chiu et al., 2017). Classificado como “poro de alta condutância”, os panexons de Panx1 permitem a liberação do ATP, sendo esse o metabólito mais estudado dentro dessa condição e uma das principais funções atribuídas a Panx1. Com isso, esses hemicanais podem controlar o funcionamento celular ao influenciarem nas condições elétricas da célula, que quando em seu maior diâmetro de abertura, podem conduzir a passagem não seletiva de íons, facilitando a despolarização da membrana celular. (Bao et al., 2004; Chiu et al., 2017; Yeung et al., 2020). No entanto, a interação entre o estado de condutância e a permeabilidade do soluto dentro desse contexto, ainda é controverso, justificado mais uma vez pela complexidade dessas interações (Yeung et al., 2020). As formas de ativação dos panexons são consideradas uma propriedade única das Panxs, podendo acontecer por estresse mecânico, despolarização de membrana, elevado cálcio intracelular ou potássio extracelular, por clivagem de caspase no terminal-C, proteínas receptoras, entre outros. Apesar de não formarem JGAP funcionais, os hemicanais de Panx são importantes na sinalização parácrina e no transporte Ca^{2+} e ATP, podendo promover a comunicação celular de outras maneiras (D'hondt et al., 2009; Chiu et al., 2017). A contribuição desses canais nas ondas de Ca^{2+} ainda é uma função em debate para as Panxs, visto a grande importância da liberação de ATP durante esse fenômeno, que é responsável pela comunicação celular em diversos tecidos, principalmente no SNC (Bennett et al., 2003; Goodenough & Paul, 2003; Barbe et al., 2006).

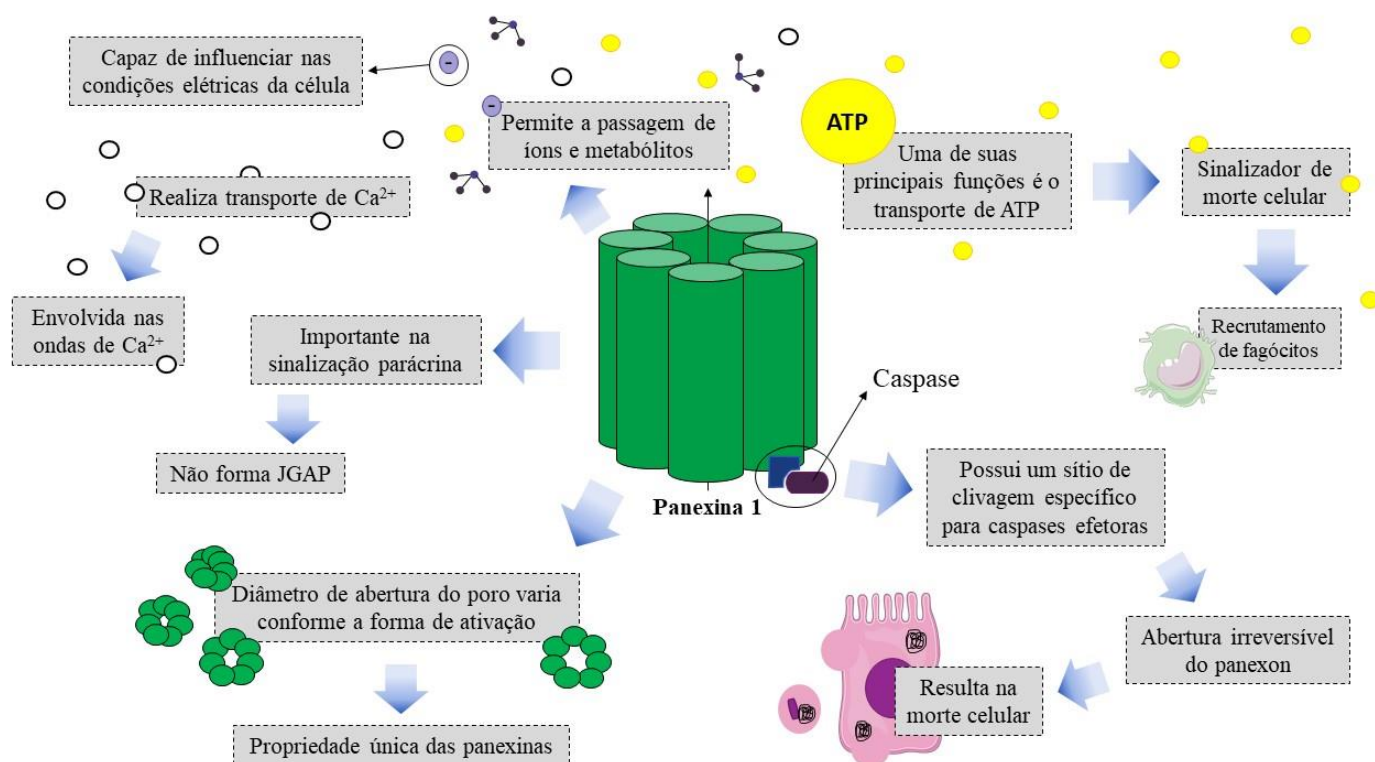


Figura 19: Funções Biológicas da Panexina 1. Junção GAP (JGAP). Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

A Panx1, também está relacionada com outros eventos celulares, como morte programada, inflamação, desordens neurológicas e até mesmo na carcinogênese (Mou et al., 2020). No contexto da morte celular programada, os panexons de Panx1 atuam mediando a sinalização da célula apoptótica, através da liberação de nucleotídeos de ATP e UTP, sinalizadores de morte celular, capazes de recrutar fagócitos nos estágios iniciais desse processo. A inibição desses canais resultou na redução da liberação desses nucleotídeos e, consequentemente, no recrutamento de monócitos pelas células apoptóticas. Corroborando com isso, a alta expressão desses panexons aumentou a liberação de ATP, o recrutamento de células e a apoptose. Além disso, a abertura irreversível do canal pela clivagem de caspases efetoras (caspase-3 e caspase-9) à Panx1, pode ser um evento importante na morte celular (Chekeni et al., 2010; Sang et al., 2019). A liberação de ATP pelos panexons de Panx1, também é o mecanismo proposto de promoção da inflamação por essa proteína. Demonstrado em um modelo de piroptose, a clivagem dependente de caspase-11 na Panx1 permitiu o extravasamento de ATP e com isso, a ativação dos receptores purinérgicos P2X7 e a promoção da inflamação. A ausência da Panx1 anulou os efeitos da inflamação nesse contexto, enquanto que a estimulação da via da caspase-11 *in vivo*, resultou em alta mortalidade dos camundongos selvagens após promoção da piroptose. Esses resultados revelam o papel da Panx1 na

inflamação em função da caspase-11 (Yang et al., 2016).

2.3.3 Relatos da Panexina 1 no Cólon e na Carcinogênese Colorretal

No cólon humano normal, a presença de genes codificantes da Panx1 foi investigada por PCR em tempo real. Os resultados demonstraram a existência desses genes tanto na camada muscular quanto na mucosa colônica. Para investigar a localização específica dessa proteína no cólon, foi realizado a marcação por imuno-histoquímica da Panx1, que esteve presente em todas as camadas. Na mucosa, a Panx1 está localizada no citoplasma e na membrana celular das células epiteliais e caliciformes. A lâmina própria exibiu forte marcação para Panx1 em algumas fibras nervosas e vasos sanguíneos pequenos, contando também com leucócitos polimorfonucleares positivos para essa proteína (exceto linfócitos). Já na camada muscular da mucosa, a imunorreatividade estava fraca. Na camada submucosa, a marcação para Panx1 foi presente nos gânglios submucosos, no endotélio, em eritrócitos e leucócitos. A muscular externa teve forte expressão da Panx1 nas fibras varicosas dentro do plexo mioentérico e em diversos corpos de neurônios. Nesse mesmo estudo, a expressão da Panx1 também foi avaliada em contextos de doença inflamatória intestinal, como na colite ulcerativa e na doença de Crohn. Em ambas as doenças os níveis de expressão da Panx1 na camada muscular estavam significativamente reduzidos quando comparados ao grupo controle, efeito que também foi observado de maneira sutil, porém significativa, na mucosa do grupo com doença de Cron. Esses resultados podem indicar participação dessa proteína na manutenção da fisiologia normal do cólon (Diezmos et al., 2013).

O estudo das Panxs é recente e ainda existem poucas evidências a respeito dessas proteínas no intestino, tanto em seu funcionamento normal quanto no CCR. Algumas das funções e interações já relatadas da Panx1 em ambos os contextos são apresentadas na Figura 20. Baseado na relação da Panx1 com as ondas de propagação de cálcio, descrita anteriormente, foi proposto o envolvimento dessa proteína na motilidade intestinal, visto que essas ondas antecedem a contração muscular motora da defecação. A ausência da Panx1 inibiu as ondas de cálcio ou provocou ondas residuais lentas, que se iniciam em locais anormais e podem viajar na direção contrária. Dessa forma, a resposta motora foi condizente com a forma de propagação das ondas de cálcio. Em adicional, a ausência da Panx1 afetou a confiabilidade das células marcapasso, visto que o tempo do ciclo se tornou irregular. Esse conjunto de resultados demonstrou o papel da Panx1 na motilidade intestinal em modelo de *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo (Peters et al., 2007). Já o estudo em modelo *in vivo* de colite em ratos, identificou

que a inibição da Panx1 foi capaz de prevenir a morte dos neurônios entéricos e a manifestação de disfunções motoras no cólon. Com isso, foi relatado o envolvimento da Panx1 em um complexo de sinalização neuronal entre receptores P2X7 e caspases, o que provoca a morte das células nervosas e, conseqüentemente, em alterações na motilidade intestinal no contexto das doenças inflamatórias intestinais (Gulbransen et al., 2012). O papel da Panx1 no cólon ainda é um campo importante de estudos, com pontos para serem elucidados, a fim de compreender os mecanismos dessa estrutura a fim de desenvolver novas abordagens protetivas ou terapêuticas para diversas doenças.

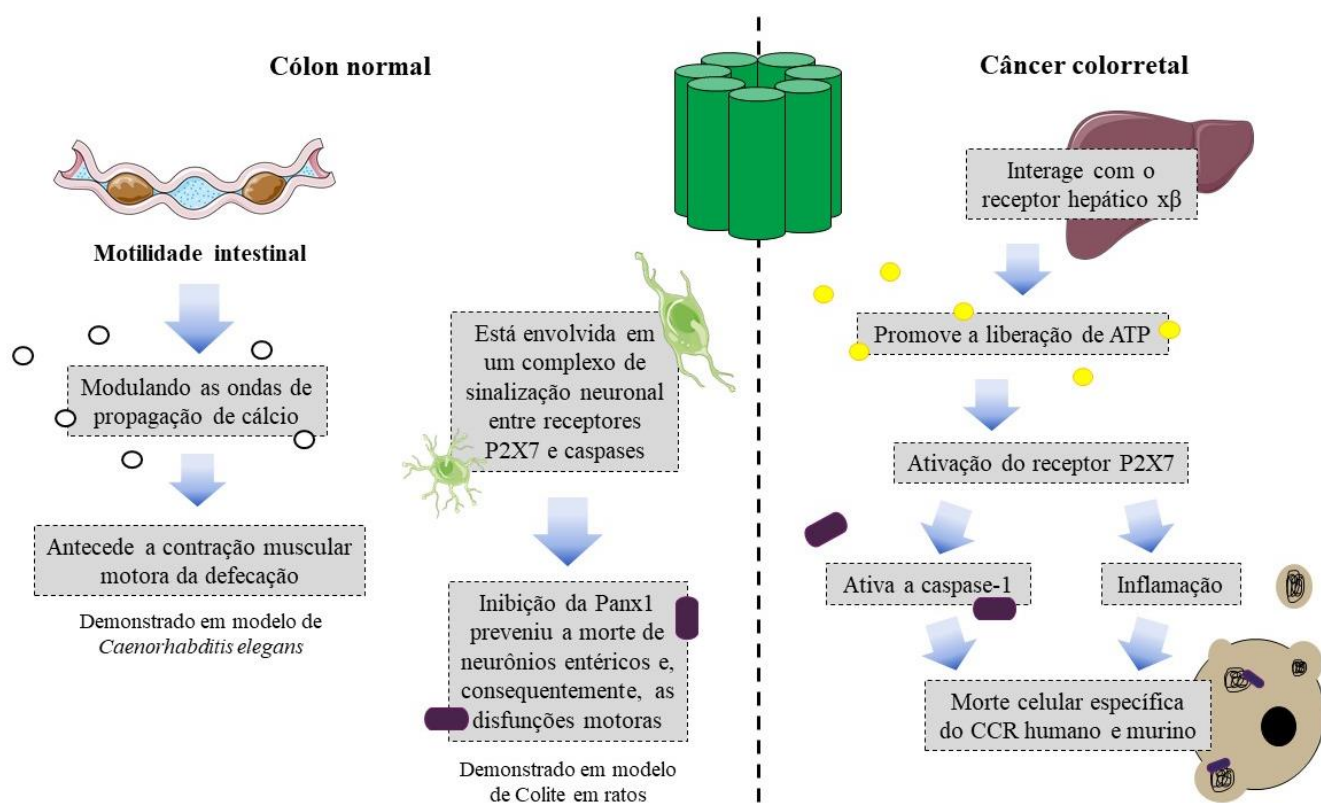


Figura 20: Relatos da Panexina 1 no Cólon e no Câncer Colorretal. Imagem confeccionada com o auxílio da plataforma SMARTServier (<https://smart.servier.com/>).

Também relacionada com o câncer, a Panx1 foi dita por atuar na sensibilidade ao ATP extracelular, nos processos metastáticos (demonstrado em células de câncer de mama) e na modulação do crescimento e metabolismo de melanomas (Draganov et al., 2015; Furlow et al., 2015; Sayedyahosseini et al., 2021). No entanto, o papel dessa proteína no CCR ainda não está claro, com poucas informações disponíveis na literatura sobre esse contexto. Em 2014, foi demonstrado pela primeira vez a participação da Panx1 em mecanismos moleculares do CCR, que através da interação com os receptores hepáticos $X\beta$, foi capaz de promover a liberação de ATP, que por sua vez mediou a ativação do receptor P2X7, requerido para a ativação da

caspase-1 e na inflamação. Dessa forma, a Panx1 esteve envolvida na indução da morte celular específica de células humanas e murinas de CCR, por meio da piroptose dependente de caspase-1 (Derangère et al., 2014). Alguns anos depois, os canais de Panx1 foram investigados farmacologicamente em células de CCR T84, quanto ao seu envolvimento na captação e liberação celular de anandamida, um neurotransmissor que atua em receptores canabinóides. No entanto, nenhum efeito significativo na absorção ou hidrólise do neurotransmissor foi observado. Essa hipótese também foi testada em outras linhagens de câncer de próstata e de neuroblastoma, que atingiram o mesmo resultado, indicando a ausência de envolvimento dos panexons de Panx1 nesse mecanismo dentro das condições avaliadas (Alhouayek et al., 2019). De toda forma, fica claro que poucas respostas estão disponíveis de como a Panx1 atua no cólon e no CCR, principalmente em modelos *in vivo*, por isso a investigação desse contexto pode ser de grande importância e contribuição para a ciência.

2.3.4 A Panexina 1 e sua Relação com o Câncer

Apesar da escassez de informações quanto a Panx1 no CCR, podemos compreender a relação dessa proteína com outros tipos de câncer. Furlow et al., (2015) identificou através do sequenciamento de RNA de transcriptoma total, uma mutação que codifica uma forma truncada do canal de Panx1, denominada de Panx1¹⁻⁸⁹. Essa mutação resulta na alteração das subunidades monoméricas para um canal heximérico de membrana plasmática, que quando ativado, permite a liberação de ATP pelas células, efetuando um mecanismo de sinalização autócrina e parácrina intravascular bem estabelecido (Corriden & Insel, 2010). Essa mutação esteve frequentemente enriquecida em células metastáticas de câncer de mama. Comumente, durante a progressão metastática a maioria das células alojadas na microvasculatura dos órgãos terminais acabam morrendo com a deformação mecânica, no entanto, os canais de Panx1¹⁻⁸⁹ permitem a sobrevivência da célula metastática durante esse evento. Essas observações foram justificadas pelo aumento da liberação de ATP pelos canais mecanossensíveis de Panx1, atuando como um supressor autócrino da apoptose, ocasionada pelos receptores purinérgicos P2Y. Coerente a isso, a inibição farmacológica dos canais de Panx1 reduziu a capacidade metastática das células do câncer de mama (Furlow et al., 2015). A relação da Panx1 com os receptores P2X7 e P2X4 também foi demonstrada em células de câncer de mama, através do uso da ivermectina (fármaco antiparasitário), que foi capaz de alternar o equilíbrio entre as funções pró sobrevivência e citotoxicidade tumoral, devido a sinalização purinérgica. A elevada expressão dos receptores P2X7, ativados por ATP, é associada ao crescimento tumoral e o desenvolvimento de

metástases, enquanto que ao mesmo tempo, a liberação de ATP promove a morte imunogênica das células cancerosas. A ação da ivermectina foi mediada pela abertura ampliada dos canais de Panx1, controlada pelos receptores P2X4 e P2X7, resultando em morte celular apoptótica e necrótica, associada a ativação da caspase-1 (Figura 21) (Draganov et al., 2015).

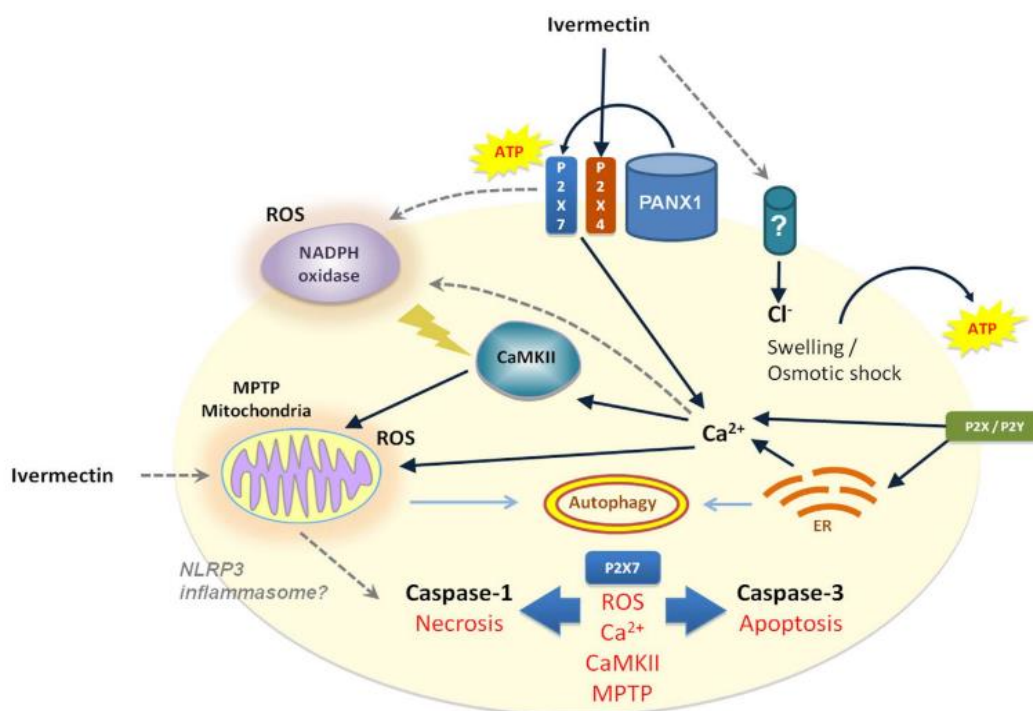


Figura 21: Mecanismo Proposto de Morte Celular induzida por P2X4/P2X7/Pannexina-1. Imagem retirada de Draganov et al., 2015.

O melanoma é o tipo de câncer com a maior quantidade de achados quanto ao comportamento da Panx1 no câncer, visto que essa proteína está altamente expressa em todos os estágios de progressão da doença, descrita por regular mecanismos celulares de proliferação, migração e invasão. A investigação *in vitro* do melanoma, demonstrou que a interação direta da Panx1 com a β -catenina foi capaz de modular o crescimento e o metabolismo das células. Nesse estudo, a expressão proteica da β -catenina esteve significativamente reduzida pelo silenciamento gênico ou inibição da Panx1, acompanhada pelo seu deslocamento da membrana celular e supressão de genes envolvidos na via Wnt. Os resultados indicaram o envolvimento da Panx1 na progressão do melanoma, sendo proposto que esse mecanismo pode ser relevante em outros contextos (Sayedyahosseini et al., 2021). Outro estudo demonstrou que a inibição dos canais de Panx1 foi capaz de reduzir significativamente o crescimento e a migração nas linhagens celulares A375-P e A375-MA2, além de aumentar a produção de melanina. Em tumores xenográficos, o bloqueio dos canais reduziu significativamente o peso e a capacidade

invasiva do melanoma, seguido pela redução dos níveis da β -catenina, indicando que a Panx1 provavelmente modula a via de sinalização Wnt/ β -catenina (Freeman et al., 2019).

De acordo com os estudos apresentados, o ATP está envolvido tanto nos mecanismos de progressão quanto supressão tumoral, além de atuar na inflamação provocada por necrose, e ser um dos principais componentes bioquímicos do microambiente tumoral (Vultaggio-Poma et al., 2020). Dessa forma, fica evidente a importância do ATP nos mecanismos da tumorigênese, relação bem estabelecida na literatura. Na década de 80, foi relatado que o tratamento por 48 horas com 40 pM de ATP inibiu o crescimento de células tumorais humanas, por meio da interrupção do ciclo celular na fase S, seguido de morte celular. Posteriormente nessa mesma década, esses achados foram complementados com a demonstração *in vivo* de que o tratamento por 10 dias seguidos de injeções intraperitoneais de ATP, inibiu o crescimento de tumores xenográficos das células CT26 (adenocarcinoma de cólon) e resultou na atividade inibidora dos nucleotídeos de adenina nos xenoenxertos de células CAPAN-1 (adenocarcinoma pancreático), com baixas cargas tumorais e remissão, em alguns casos, em ambos os modelos (Rapaport, 1983, 1988). Depois disso, outros estudos também buscaram compreender o efeito do ATP extracelular no câncer e alcançaram resultado parecidos (Haskell et al., 1998; Agteresch et al., 2000; Shabbir et al., 2008).

Devido aos achados sobre o comportamento do ATP no câncer, os receptores P2X7 passaram a ser considerados possíveis alvos terapêuticos, no entanto, a curva de ativação controlada desses receptores é muito íngreme para o ATP extracelular ou fármacos análogos ao ATP, estabelecendo um limite para essa abordagem. As estratégias alternativas contam com moduladores alostéricos positivos, ou seja, compostos que potencializam os receptores P2X7 mesmo em baixas quantidades de ATP, hipertermia combinada a adição de ATP, visto que a hipertermia promove a morte das células tumorais via ativação dos receptores P2X7, e por fim, com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática aos quimioterápicos via abertura do poro P2X7 (Munerati et al., 1994; de Andrade Mello et al., 2017; Matty et al., 2019). No microambiente tumoral, o ATP estimula os receptores P2X7 e a liberação de IL-1 β , efetuando um passo chave na morte celular imunogênica (MCI), um tipo de morte celular atípica (Galluzzi et al., 2017). Quimioterápicos como a mitoxantrona, as antraciclinas e a oxaliplatina, usada no tratamento do CCR, promovem a liberação de ATP via canais de Panx1 ou receptores P2X7 e a MCI (Ohshima et al., 2010). Apesar disso, o elevado nível de ATP pode gerar grandes quantidades de adenosina e assim, promover imunossupressão. Portanto, reduzir a geração de adenosina pode ser uma alternativa eficiente para essa situação, onde os canais de Panx1 e o

receptor P2X7 são alvos adequados para intervenção (Furrow et al., 2015; Vultaggio-Poma et al., 2020).

Assim como a Cx43, o papel da Panx1 nos processos da carcinogênese continua controverso, de tal forma que alguns trabalhos relatam o envolvimento da Panx1 com o desenvolvimento de metástase no câncer de mama e a progressão tumoral do melanoma, enquanto outros relatam achados opostos sobre essa proteína no CCR, onde atua na morte específica das células cancerosas. Para complementar esse contexto de ações divergentes, o próprio ATP, principal molécula liberada pelos panexons de Panx1, se relaciona tanto com a progressão quanto com a supressão tumoral dependendo do sítio de câncer. Especialmente no CCR, o ATP foi demonstrado por inibir o crescimento tumoral, mecanismo de ação realizado pela oxaliplatina, via canais de Panx1. Com tudo, o conjunto de informações apresentado indica um campo promissor de investigações para o câncer tanto nesse quanto em outros sítios, onde a compreensão mais aprofundada dessa estrutura pode ser enriquecedora para a ciência.

3. Objetivo

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho é avaliar as implicações da deleção heteróloga da Cx43 e homóloga da Panx1 nos estágios iniciais da carcinogênese de cólon quimicamente induzida em camundongos

4. Referências

- AASEN, T. et al. Gap junctions and cancer: Communicating for 50 years. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 12, p. 775–788, 2016.
- AFRIN, S. et al. Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. **Molecules**, v. 21, n. 2:169, 2016.
- AGTERESCH, H. J. et al. Pharmacokinetics of intravenous ATP in cancer patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 49–55, 2000.
- AI, Z. et al. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 2, p. 161–171, 2000.
- AKTER, S. et al. Smoking and colorectal cancer: A pooled analysis of 10 population-based cohort studies in Japan. **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 3, p. 654–664, 2021.
- ALHOUAYEK, M. et al. Role of pannexin-1 in the cellular uptake, release and hydrolysis of anandamide by T84 colon cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- ALRAWI, S. J. et al. Aberrant crypt foci. **Anticancer Research**, v. 26, n. 1 A, p. 107–119, 2006.
- AMITAY, E. L. et al. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 11, p. 1604–1610, 2020.
- ANTONUCCI, R. et al. Vitamin D deficiency in childhood: Old lessons and current challenges. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 3, p. 247–260, 2018.
- ARAGHI, M. et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 7, p. 511–518, 2019.
- ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017.
- ASHKTORAB, H. et al. A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34546–34557, 2016.
- AUGUSTUS, G. J.; ELLIS, N. A. Colorectal Cancer Disparity in African Americans: Risk Factors and Carcinogenic Mechanisms. **American Journal of Pathology**, v. 188, n. 2, p. 291–303, 2018.
- AYAD, E. et al. Expression of “connexin 43” in colorectal carcinomas: Histopathological and immunohistochemical study. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. A, p. 354–359, 2020.
- BABY, B.; ANTONY, P.; VIJAYAN, R. Antioxidant and anticancer properties of berries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2491–2507, 2018.
- BAIDOUN, F. et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 9, p. 998–1009, 2021.
- BAO, L.; LOCOVEI, S.; DAHL, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. **FEBS Letters**, v. 572, n. 1–3, p. 65–68, 2004.
- BARANOVA, A. et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap

junction proteins. **Genomics**, v. 83, n. 4, p. 706–716, 2004.

BARDOU, M.; BARKUN, A.N.; MARTEL, M. Obesity and colorectal cancer. **Gut**, v. 62, n. 6, p. 933–947, 2013.

BEACH, R. et al. BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 1069–1075, 2005.

BENNETT M. V. L. et al. New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 11, p. 610–617, 2003.

BEYER E. C.; BERTHOUD V. M. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1860, n. 1, p. 5–8, 2018.

BIRD R. P.; GOOD C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 395–402, 2000.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, v. 93, n. 1, p. 55–71, 1995.

BIŠCANIN A. et al. Cx43 expression in colonic adenomas and surrounding mucosa is a marker of malignant potential. **Anticancer Research**, v. 36, n. 10, p. 5437–5442, 2016.

BOENGLER, K.; SCHULZ, R. Connexin 43 and mitochondria in cardiovascular health and disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 982, n. Cx, p. 227–246, 2017.

BOSETTI, C. et al. Aspirin and the risk of colorectal and other digestive tract cancers: an updated meta-analysis through 2019. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 5, p. 558–568, 2020.

BRADBURY, K. E.; MURPHY, N.; KEY, T. J. Diet and colorectal cancer in UK Biobank: A prospective study. **International Journal of Epidemiology**, v. 49, n. 1, p. 246–258, 2020.

BRENNAN, C. A. et al. Aspirin modulation of the colorectal cancer-associated microbe fusobacterium nucleatum. **mBio**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2021.

BRODY, H. Colorectal cancer. **Nature**, v. 521, n. 7551, p. S1, 2015.

BRUZZONE, R. et al. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13644–13649, 2003.

BRUZZONE, R. et al. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 5, p. 1033–1043, 2005.

BUKAUSKAS, F. F. et al. Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/connexin 43-EGFP gap junctions: Properties of fast and slow gating mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7113–7118, 2002.

BURN, J. et al. Cancer prevention with aspirin in hereditary colorectal cancer (Lynch syndrome), 10-year follow-up and registry-based 20-year data in the CAPP2 study: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 395, n. 10240, p. 1855–1863, 2020.

BÜRTIN, F.; MULLINS, C. S.; LINNEBACHER, M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 13, p. 1394–1426, 2020.

BUSKERMOLLEN, M. et al. Colorectal cancer screening with faecal immunochemical testing, sigmoidoscopy or colonoscopy: A microsimulation modelling study. **The BMJ**, v. 367, 2019.

CAETANO B. F. R. et al. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. **Toxicology letters**, v. 329, p. 67-79, 2020.

CAMPENHOUT R. V. et al. Non-canonical roles of connexins. **Progress in Biophysics Molecular Biology**, v. 153, p. 35-41, 2020.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330-337, 2012.

CAPUANO, E. The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3543–3564, 2017.

CHAN, A. O. O. et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 5, p. 1823–1830, 2002.

CHANG, S. W.; LEE, H. C. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. **Pediatrics and Neonatology**, v. 60, n. 3, p. 237–244, 2019.

CHEKENI F. B. et al. Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 863-867, 2010.

CHEN, X. et al. Smoking, Genetic Predisposition, and Colorectal Cancer Risk. **Clinical and translational gastroenterology**, v. 12, n. 3, p. e00317, 2021.

CHENG, L. et al. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 34, n. 6, p. 573–580, 2011.

CHIU, H. M. et al. Effectiveness of fecal immunochemical testing in reducing colorectal cancer mortality from the One Million Taiwanese Screening Program. **Cancer**, v. 121, n. 18, p. 3221–3229, 2015.

CHIU, Y. H. et al. A quantized mechanism for activation of pannexin channels. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–15, 2017.

CHOI, J. W. et al. Longitudinal tracing of spontaneous regression and anti-angiogenic response of individual microadenomas during colon tumorigenesis. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 724–732, 2015.

CHOI, Y. J.; MYUNG, S. K.; LEE, J. H. Light alcohol drinking and risk of cancer: A meta-analysis of cohort studies. **Cancer Research and Treatment**, v. 50, n. 2, p. 474–487, 2018.

CLAPPER, M. L.; CHANG W-C.L.; COOPER H.S. Dysplastic Aberrant Crypt Foci: Biomarkers of Early Colorectal Neoplasia and Response to Preventive Intervention. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa)**, v. 13, n. 3, p. 229–240, 2020.

CORRIDEN R.; INSEL P. A. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell

regulation. **Science Signaling**, v. 3, n.104, re1, 2010.

D'HONDT, C. et al. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? **BioEssays**, v. 31, n. 9, p. 953–974, 2009.

DANESH-MEYER, H. V.; GREEN, C. R. Focus on Molecules: Connexin 43 - Mind the gap. **Experimental Eye Research**, v. 87, n. 6, p. 494–495, 2008.

DANG, X.; DOBLE, B. W., KARDAMI, E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 242, p. 35-38, 2003.

DANIEL, E. E. et al. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? **Neurogastroenterology and Motility**, v. 13, n. 4, p. 297–307, 2001.

DBOUK, H. A. et al. Connexins: A myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. **Cell Communication and Signaling**, v. 7, 2009.

DE ANDRADE MELLO, P. et al. Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 67254–67268, 2017.

DE PALMA, F. D. E. et al. The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 3–5, 2019.

DEFOURNY, J; THELEN, N; THIRY, M. Cochlear connexin 30 homomeric and heteromeric channel exhibit distinct assembly mechanisms. **Mechanisms of Development**, v. 155, p. 8-14, 2019.

DEKKER, E. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 2019.

DENG, Z. et al. Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 373–381, 2020.

DERANGÈRE, V. et al. Liver X receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 12, p. 1914–1924, 2014.

DE-SOUZA A. S. C.; COSTA-CASAGRANDE T. A. Animal modelos for colorectal cancer. **Brazilian Archives of digestive surgery**, v. 32, n. 2, p. e1369, 2018.

DIEZMOS, E. F. et al. Expression and localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 6, p. 395–405, 2013.

DÖRING, B. et al. Ablation of connexin43 in smooth muscle cells of the mouse intestine: Functional insights into physiology and morphology. **Cell and Tissue Research**, v. 327, n. 2, p. 333–342, 2007.

DOUAIHER, J. et al. Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations. **Journal of Surgical Oncology**, v. 115, n. 5, p. 619–630, 2017.

DOUBENI C. A. et al. Neighborhood socioeconomic status and use of colonoscopy in an insured population – a retrospective cohort study. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36392, 2012.

DOW, L. E. et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1539–1552, 2015.

DRAGANOV, D. et al. Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via

Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 1–17, 2015.

DREW D. A.; CAO Y, CHAN A. T. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 03, p. 173-186, 2016.

DROST, J. et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 43–47, 2015.

DUBINA, M. V. et al. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 32, p. 4992–4996, 2002.

EPIFANTSEVA I.; SHAW R. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1860, n. 1, p. 40-47, 2018.

ESAKKY, P.; MOLEY, K. H. Paternal smoking and germ cell death: A mechanistic link to the effects of cigarette smoke on spermatogenesis and possible long-term sequelae in offspring. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 435, p. 85–93, 2016.

EY, B. et al. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 33, p. 22332–22343, 2009.

EYL, R. E. et al. Potential determinants of physical inactivity among long-term colorectal cancer survivors. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 12, n. 5, p. 679–690, 2018.

FALLON, R. F.; GOODENOUGH, D. A. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. **The Journal of cell biology**, v. 90, n. 2, p. 521–526, 1981.

FIGUEIREDO, J. C. et al. Smoking-associated risks of conventional adenomas and serrated polyps in the colorectum. **Cancer Causes and Control**, v. 26, n. 3, p. 377–386, 2015.

FREEMAN, C. et al. Impact of Sugar on the Body. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 1, p. 2255–2266, 2018.

FREEMAN, T. J. et al. Inhibition of pannexin 1 reduces the tumorigenic properties of human melanoma cells. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 1–24, 2019.

FU T. et al. FXR regulates intestinal cancer stem cell proliferation. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 1098-1112, 2019.

FURLOW P. W. et al. Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 7, p. 943-952, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 2, p. 97–111, 2017.

GAMAGE, S. M. K. et al. Dual role of heme iron in cancer; promotor of carcinogenesis and an inducer of tumour suppression. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 120, n. April, p. 104642, 2021.

GERLINGER, M. et al., Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 10, p. 883–892, 2012.

- GLAUERT H. P.; BENNINK M. R. Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine by cultured rat colon epithelial cells. **Nutrition and Cancer**, v. 5, n. 2, p. 78-86, 1983.
- GOLOVKO, D. et al. Colorectal cancer models for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 1217–1229, 2015.
- GONG, K. et al. Gap junctions mediate glucose transfer to promote colon cancer growth in three-dimensional spheroid culture. **Cancer Letters**, v. 531, p. 27–38, 2022.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Connexin43 recruits PTEN and Csk to inhibit c-Src activity in glioma cells and astrocytes. **Oncotarget**, v. 7, p. 49819-49833, 2016.
- GOODARZI, E. et al. Worldwide incidence and mortality of bladder cancer and human development index: An ecological study. **Indian Journal of Medical Specialities**, v. 11, n. 2, p. 88, 2020.
- GOODENOUGH, D. A.; PAUL, D. L. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 4, p. 285–294, 2003.
- GOODENOUGH D. A.; PAUL D. L. Gap junctions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 1:a002576, 2009.
- GORADEL N. H. et al. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A mechanistic overview. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2337-2344, 2019.
- GULBRANSEN B. D. et al. Activation of neuronal P2X7 receptor-Pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 600-604, 2012.
- GUNES, S. et al. Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. **Andrologia**, v. 50, n. 9, p. 1–17, 2018.
- GÜNTHER, S. et al. Effects of a murine germ cell-specific knockout of Connexin 43 on Connexin expression in testis and fertility. **Transgenic Research**, v. 22, n. 3, p. 631–641, 2013.
- GUO, C. G. et al. Aspirin Use and Risk of Colorectal Cancer among Older Adults. **JAMA Oncology**, v. 7, n. 3, p. 428–435, 2021.
- GUO, L. L. et al. Vitamin D intake as well as circulating 25-hydroxyvitamin D level and risk for the incidence and recurrence of colorectal cancer precursors: A meta-analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. August, p. 1–17, 2022.
- GUPTA, A. K.; SCHOERR, R. E. Aberrant crypt foci: Are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 1, p. 59–65, 2009.
- GUPTA, S. Screening for Colorectal Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 393–414, 2022.
- GUTTMAN, J. A. et al. Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhea during infectious enteric disease. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 218–226, 2010.
- HAIDARI, F. et al. The Effects of UVB and Vitamin D on Decreasing Risk of Colorectal Cancer Incidence and Mortality: A Review of the Epidemiology, Clinical Trials, and Mechanisms. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 5, p. 709–717, 2019.

HAN Y. et al. Connexin 43 expression increases in the epithelium and stroma along the colonic neoplastic progression pathway: Implications for its oncogenic role. **Gastroenterology Research and Practice**, n. 2011:561719, 2011.

HARRIS, A. L. Emerging issues of connexin channels: Biophysics fills the gap. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 34, n. 3, p. 325-472, 2001.

HASKELL, C. M. et al. Phase II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage III and Stage IV non-small cell lung cancer. **Investigational New Drugs**, v. 16, n. 1, p. 81–85, 1998.

HATTORI, N. et al. Cigarette smoke, but not novel tobacco vapor products, causes epigenetic disruption and cell apoptosis. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 24, n. November, p. 100865, 2020.

HAUTSALO, J. et al. Biological control of strawberry crown rot is substrate dependent phenomenon. **Journal of Berry Research**, v. 6, n. 1, p. 65–79, 2016.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 172–184, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER. Acetaldehyde. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**. V. 71, p. 319-335, 1999.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**. V. 114, 2018.

ISMAIL, R. et al. Pathological implications of Cx43 down-regulation in human colon cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 7, p. 2987–2991, 2014.

IYENGAR, N. M. et al. Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 35, p. 4270–4276, 2016.

JIN F. et al. Tobacco-specific carcinogens induce hypermethylation, DNA adducts and DNA damage in Bladder Cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, PA)**, v. 10, n. 10, p. 588-597, 2017.

JO, A. et al. New onset of type 2 diabetes as a complication after cancer diagnosis: A systematic review. **Cancer Medicine**, v. 10, n. 2, p. 439–446, 2021.

JODAL, H. C. et al. Colorectal cancer screening with faecal testing, sigmoidoscopy or colonoscopy: A systematic review and network meta-analysis. **BMJ Open**, v. 9, n. 10, 2019.

JOH, H. et al. Simple sugar and sugar-sweetened beverage intake during adolescence and risk of colorectal cancer precursors. **Gastroenterology**, v. 161, n. 1, p. 128–142, 2022.

KANCZUGA-KODA, L. et al. Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon - An immunohistochemical study. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 42, n. 4, p. 203–207, 2004.

KANCZUGA-KODA L. et al. Gradual loss of functional gap junction with progression of colorectal

cancer – a shift from membranous Cx32 and Cx43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. **In Vivo**, v. 24, n. 1, p. 101-107, 2010.

KANCZUGA-KODA, L. et al. E-cadherin and β -catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 7, n. 6, p. 1863–1870, 2014.

KANG, J.; VALERIO, L. G. Investigating DNA adduct formation by flavor chemicals and tobacco byproducts in electronic nicotine delivery system (ENDS) using in silico approaches. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 398, p. 115026, 2020.

KATONA B. W.; WEISS J. M. Chemoprevention of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 368-388, 2020.

KECHICHIAN, E.; EZZEDINE, K. Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 223–235, 2018.

KELLY, J. J.; SIMEK, J.; LAIRD, D. W. Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 3, p. 701–721, 2015.

KERR, J.; ANDERSON, C.; LIPPMAN, S. M. Physical activity, sedentary behavior, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 8, p. e457–e471, 2017.

KEUM B. T.; CHOI A. Y. Gendered racism, family and external shame, depressive symptoms, and alcohol use severity among Asian American men. *Cultural Diversity & Ethnic Minority Psychology*, 2021.

KEUM, N. N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, 2019.

KIM, D. S.; SCHERER, P. E. Obesity, diabetes, and increased cancer progression. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 45, n. 6, p. 799–812, 2021.

KIM, J. Y. et al. Effects of a 12-week home-based exercise program on quality of life, psychological health, and the level of physical activity in colorectal cancer survivors: a randomized controlled trial. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 8, p. 2933–2940, 2019.

KIM, S. R. et al. Effect of red, processed, and white meat consumption on the risk of gastric cancer: An overall and dose-response meta-analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 826, 2019.

KOLB, R.; SUTTERWALA F. S.; ZHANG W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 97, p. 77-89, 2016.

KOWALCZYK, M. et al. Occurrence of colorectal aberrant crypt foci depending on age and dietary patterns of patients. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.

KOWALCZYK, M. et al. Rectal aberrant crypt foci (ACF) as a predictor of benign and malignant neoplastic lesions in the large intestine. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.

KOWALCZYK, M. et al. The effect of smoking on the number and type of rectal aberrant crypt foci (Acf)—first identifiable precursors of colorectal cancer (crc). **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2021.

KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. Molecular biology and genetics of gap junction channels. **Seminars in cell biology**, v. 3, n. 1, p. 3–16, 1992.

LAHOUAR, L. et al. Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fiber of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. **Food Chemistry**, v. 149, p. 271–276, 2014.

LANGDON, R. J. et al. Epigenetic modelling of former, current and never smokers. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2021.

LEE, S. et al. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of colorectal cancer in South Korea: A case-control study. **Alcohol**, v. 76, p. 15–21, 2019.

LEVINE, D. S.; HAGGITT, R. C. Normal histology of the colon. **American Journal of Surgical Pathology**, 1989.

LI, Y.; HECHT, S. S. Metabolism and DNA Adduct Formation of Tobacco-Specific N-Nitrosamines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1–38, 2022.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, n. September, p. 1–9, 2021.

LING, S. et al. Association of type 2 diabetes with cancer: A meta-analysis with bias analysis for unmeasured confounding in 151 cohorts comprising 32 million people. **Diabetes Care**, v. 43, n. 9, p. 2313–2322, 2020.

LIU, L. et al. GFPT2 promotes metastasis and forms a positive feedback loop with p65 in colorectal cancer. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 8, p. 2510–2522, 2020.

LO, C. W. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: Insights from the connexin knockout mice. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. 346–348, 2000.

LOCOVEI S. et al. Pannexin 1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. **FEBS letters**, v. 581, n. 3, p. 483–488, 2007.

LOEWENSTEIN W.R.; KANNO Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, n. 5029, p. 1248–1249, 1966.

LOPEZ-CALEYA, J. F. et al. The role of calcium and vitamin D dietary intake on risk of colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of case–control studies. **Cancer Causes and Control**, v. 33, n. 2, p. 167–182, 2022.

LOPEZ-CERON, M.; PELLISE, M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. **Colorectal Disease**, v. 14, n. 4, p. 157–164, 2012.

MA, P. et al. Daily sedentary time and its association with risk for colorectal cancer in adults. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 22, p. 1–6, 2017.

MACLEOD, R. A. F. et al. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 4, p. 555–563, 1999.

MACVICAR, B. A.; THOMPSON, R. J. Non-junction functions of pannexin-1 channels. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 93–102, 2010.

MADUNIĆ, K. et al. Colorectal cancer cell lines show striking diversity of their O-glycome reflecting the cellular differentiation phenotype. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 1, p. 337–350,

2021.

MAES, M. et al. Roles of connexins and pannexins in digestive homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 15, p. 2809–2821, 2015.

MARTINS-MARQUES, T. et al. To beat or not to beat: Degradation of Cx43 imposes the heart rhythm. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, p. 476–481, 2015.

MATANO, M. et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, p. 256–262, 2015.

MATTY, M. A. et al. Potentiation of P2RX7 as a host-directed strategy for control of mycobacterial infection. **eLife**, v. 8, p. 1–27, 2019.

MCCLAIN, J. L. et al. Ca²⁺ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 497–507, 2014.

MCNABNEY, S. M.; HENAGAN, T. M. Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: A focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1–28, 2017.

MEHTA, R. S. et al. Dietary Patterns and Risk of Colorectal Cancer Subtypes Classified by *Fusobacterium nucleatum* in Tumor Tissue HHS Public Access Author manuscript. **JAMA Oncol**, v. 3, n. 7, p. 921–927, 2017.

MICHALSKI, K. et al. The Cryo-EM structure of a pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. **eLife**, v. 9, p. 1–14, 2020.

MOSER, A. R. et al. ApcMin: A mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. **European Journal of Cancer**, v. 31, n. 7–8, p. 1061–1064, 1995.

MOTSCHMAN, C. A.; TIFFANY, S. T. Combined smoking and alcohol cues: Effects on craving, drug-seeking, and consumption. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 45, n. 9, p. 1864–1876, 2021.

MOU, L. et al. Structural basis for gating mechanism of Pannexin 1 channel. **Cell Research**, v. 30, n. 5, p. 452–454, 2020.

MUNERATI, M. et al. Macrophages loaded with doxorubicin by ATP-mediated permeabilization: Potential carriers for antitumor therapy. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1224, n. 2, p. 269–276, 1994.

NA, H. K.; LEE, J. Y. Molecular basis of alcohol-related gastric and colon cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 47–76, 2016.

NAVIS, K. E. et al. Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 15, p. 2163–2172, 2020.

NEMETH, L.; MADDUR, S.; PURI, P. Immunolocalization of the Gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 35, n. 6, p. 823–828, 2000.

NEWMARK, H. L. et al. 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**, v. 30, n. 1, p. 88–92, 2009.

NUCCI, M. R. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. **Human Pathology**, v. 28, n. 12, p. 1396–1407, 1997.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985–999, 2017.

O'KEEFE, S. J. D. et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

OCVIRK, S.; O'KEEFE, S. J. D. Dietary fat, bile acid metabolism and colorectal cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 73, p. 347–355, 2021.

ODOUX, C. et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 6932–6941, 2008.

OH, S. et al. Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. **Journal of General Physiology**, v. 114, n. 3, p. 339–364, 1999.

OHSHIMA, Y. et al. γ -Irradiation induces P2X7 receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1800, n. 1, p. 40–46, 2010.

OLIVEIRA I. A. et al. Enzymatic and structural properties of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (hGFAT2). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 296:100180, 2020.

OTORI, K. et al. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. **Cancer**, v. 83, n. 5, p. 896–900, 1998.

OU, J. et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 111–120, 2013.

PAN, J. H. et al. Cruciferous vegetables and colorectal cancer prevention through microRNA regulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 12, p. 2026–2038, 2018.

PANCHINA, Y. et al. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. **Current Biology**, v. 10, n. 13, p. 473–474, 2000.

PEETERS, P. J. H. L. et al. The risk of colorectal cancer in patients with type 2 Diabetes: Associations with treatment stage and obesity. **Diabetes Care**, v. 38, n. 3, p. 495–502, 2015.

PENUELA, S. et al. Pannexin channels and their links to human disease. **Biochemical Journal**, v. 461, n. 3, p. 371–381, 2014.

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

PETERS, M. A. et al. A Calcium Wave Mediated by Gap Junctions Coordinates a Rhythmic Behavior

in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 17, n. 18, p. 1601–1608, 2007.

PETERSMANN, A. et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 127, n. Suppl 1, p. S1–S7, 2019.

PLOTKIN, L. I. & STAINS, J. P. Connexins and pannexins in the skeleton: gap junction, hemichannels and more. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 15, p. 2853–2867, 2015.

QIU, S.; JIANG, C.; ZHOU, L. Physical activity and mortality in patients with colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 29, n. 1, p. 15–26, 2020.

QU, R. et al. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. **Cell Research**, v. 30, n. 5, p. 446–448, 2020.

RADIĆ, J. et al. Connexin 43 expression in primary colorectal carcinomas in patients with stage III and IV disease. **Anticancer Research**, v. 36, n. 5, p. 2189–2196, 2016.

RAPAPORT, E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 114, n. 3, p. 279–283, 1983.

RAPAPORT, E. Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 24, n. 9, p. 1491–1497, 1988.

RASH, J. E.; YASUMURA, T.; DUDEK, F. E. Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord. **Cell Biology International**, v. 22, n. 11–12, p. 731–749, 1998.

REAUME A. G. et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1831–1834, 1995.

RESTIFO D. et al. Differential relationship between colorectal cancer and diabetes in a nationally representative sample of adults. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 32, n.9, p. 819–823, 2018.

REŽEN, T. et al. The role of bile acids in carcinogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 79, p. 243, 2022.

RONCUCCI, L. et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. **Human Pathology**, v. 22, n. 3, p. 287–294, 1991.

ROSENBERG, D. W. et al. Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3551–3554, 2007.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183–196, 2009.

RUIZ-CASADO, A. et al. Exercise and the Hallmarks of Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 6, p. 423–441, 2017.

SÁEZ, J. C. et al. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1359–1400, 2003.

SAFIRI, S. et al. The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 12, p. 913–933, 2019.

SANG, Q. et al. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 485, 2019.

SAUND, R. S. et al. Gut endoderm is involved in the transfer of left-right asymmetry from the node to the lateral plate mesoderm in the mouse embryo. **Development (Cambridge)**, v. 139, n. 13, p. 2426–2435, 2012.

SAYEDYAHOSSEIN, S. et al. Pannexin 1 binds β -catenin to modulate melanoma cell growth and metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100478, 2021.

SCHMID, D.; LEITZMANN, M. F. Television viewing and time spent sedentary in relation to cancer risk: A meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, p. 1–19, 2014.

SCHOEN, R. E. et al. The natural history of aberrant crypt foci. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 67, n. 7, p. 1097–1102, 2008.

SEILER C. L. et al. Inhalation exposure to cigarette smoke and inflammatory agents induces epigenetic changes in the lung. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 11290, 2020.

SELLERS, R. S.; MORTON, D. The colon: From banal to brilliant. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 1, p. 67–81, 2014.

SEO B. R. et al. Obesity-dependent changes in interstitial ECM mechanics promote breast tumorigenesis. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 301, 301ra130, 2015.

SHABBIR M. et al. Effect of extracellular ATP on the growth of hormone-refractory prostate cancer in vivo. **BJU International**, v. 102, n. 1, p. 108–112, 2008.

SHAW R. M.; RUDY Y. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. **Circulation Research**, v. 81, n. 5, p. 727–741, 1997.

SHOEMAKER R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813–823, 2006.

SIBAEV, A. et al. Are gap junctions truly involved in inhibitory neuromuscular interaction in mouse proximal colon? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 8, p. 740–745, 2006.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 3, p. 177–193, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal Cancer in the Young: Epidemiology, Prevention, Management. **American Society of Clinical Oncology**, v. 40, p. 1–14, 2020.

SINGER, M. V.; FEICK, P.; GERLOFF, A. Alcohol and smoking. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 2, p. 177–183, 2011.

SINGH, B. et al. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, v. 132, p. 109114, 2020.

SINGH, S. et al. Incidence of Diabetes in Colorectal Cancer Survivors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 6, p. 1–7, 2016.

SIRNES, S. et al. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 3, p. 570–581, 2012.

SIRNES, S. et al. Connexins in colorectal cancer pathogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2015.

SKERRETT I. M.; WILLIAMS J. A structural and functional comparison of Gap junction channels composed of connexins and innexins. **Developmental Neurobiology**, v. 77, n. 5, p. 522–547, 2017.

SOLTANI, G. et al. Obesity, diabetes and the risk of colorectal adenoma and cancer. **BMC Endocrine Disorders**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

SONG, Y. et al. A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 8, p. 973–989, 2017.

SPRAY. Dependence Junctional. **Science**, n. 22, 1979.

STANIMIROV, B.; STANKOV, K.; MIKOV, M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v. 14, n. 1, p. 18–33, 2015.

SUH S.; KIM K-W. Diabetes and cancer: Cancer should be screened in routine diabetes assessment. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 43, n. 6, p. 733–743, 2019.

SUNG H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUPACHAI, K. et al. Association between low fruit and vegetable consumption and colorectal polyps in Thailand. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 9, p. 2733–2737, 2020.

TAKAYAMA, T. et al. Analysis of K-ras, APC, and β -catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 599–611, 2001.

TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793–804, 2007.

TANAKA, T. et al. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 4, n. 6, p. 989–993, 2016.

TANG, Y.; ZHANG, J. L. Recent developments in DNA adduct analysis using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 31–55, 2020.

- THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal cancer and nutrition. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.
- THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, p. 330-337, 2012.
- THOMPSON, R. J. et al. Hemichannels Augments Aberrant Bursting in the Hippocampus. **Science**, v. 322, n. 5907, p. 1555–1559, 2008.
- TOTLAND, M. Z. et al. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 573–591, 2020.
- TSE, G.; ESLICK, G. D. Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 1, p. 128–139, 2014.
- TURESKY R. J. Mechanistic evidence for red meat and processed meat intake and cancer risk: A follow-up on the International Agency for Research on Cancer Evaluation of 2015. **Chimia**, v. 72, n. 10, p. 718-724, 2018.
- VAIDYA, D. et al. Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. **Circulation Research**, v. 88, n. 11, p. 1196–1202, 2001.
- VAIOPOULOS, A. G. et al. Concise review: Colorectal cancer stem cells. **Stem Cells**, v. 30, n. 3, p. 363–371, 2012.
- VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β 2-catenin. **EMBO Journal**, v. 31, n. 12, p. 2714–2736, 2012.
- VAN BLARIGAN, E. L. et al. Association of survival with adherence to the American cancer society nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors after colon cancer diagnosis the CALGB 89803/alliance trial. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 6, p. 783–790, 2018.
- VEKIC, J. et al. Diabetes and colorectal cancer risk: A new look at molecular mechanisms and potential role of novel antidiabetic agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, 2021.
- VERNIA, F. et al. Dietary factors modulating colorectal carcinogenesis. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2021.
- VIEIRA, A. R. et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1788–1802, 2017.
- VIGNERI P. G. The insulin/IGF system in colorectal cancer development and resistance to therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. 230, 2015.
- VLASHI E.; PAJONK F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 28-35, 2015.
- VOGT, A.; HORMUZDI, S. G.; MONYER, H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 141, n. 1, p. 113–120, 2005.
- VULTAGGIO-POMA, V.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP: A feasible target for

- cancer therapy. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 1–22, 2020.
- WALRAVE, L. et al. Inhibition of astroglial connexin43 hemichannels with TAT-Gap19 exerts anticonvulsant effects in rodents. **Glia**, v. 66, n. 8, p. 1788–1804, 2018.
- WALUGA, M. et al. Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 69, n. 3, p. 325–336, 2018.
- WANG, H. et al. Novel colon cancer susceptibility variants identified from a genome-wide association study in African Americans. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 12, p. 2728–2733, 2017.
- WANG, J. et al. The membrane protein Pannexin1 forms two open-channel conformations depending on the mode of activation. **Science Signaling**, v. 7, n. 335, p. 1–21, 2014.
- WANG, X. et al. Association between Smoking and Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. **JNCI Cancer Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2021.
- WU, Q. J. et al. Cruciferous vegetables intake and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis of observational studies. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 4, p. 1079–1087, 2013.
- XU, X. T. et al. Meta-analysis: Circulating adiponectin levels and risk of colorectal cancer and adenoma. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, n. 4, p. 234–244, 2011.
- YAMASAKI, H. et al. Intercellular communication and carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 333, n. 1–2, p. 181–188, 1995.
- YANG, C. et al. Passive Smoking and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Observational Studies. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, v. 28, n. 5, p. 394–403, 2016.
- YANG, J.; YU, J. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. **Protein and Cell**, v. 9, n. 5, p. 474–487, 2018.
- YEUNG A. K.; PATIL C. S.; JACKSON M. F. Pannexin-1 in the CNS: emerging concepts in health and disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 154, n. 5, p. 468–485, 2020.
- YUAN, C. et al. Sugar-sweetened beverage and sugar consumption and colorectal cancer incidence and mortality according to anatomic subsite. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 115, n. 6, p. 1481–1489, 2022.
- ZENG, H. et al. Butyrate inhibits cancerous HCT116 colon cell proliferation but to a lesser extent in noncancerous NCM460 colon cells. **Nutrients**, v. 9, n. 1, 2017.
- ZHANG, L. et al. Trends in and predictions of colorectal cancer incidence and mortality in China from 1990 to 2025. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 98, p. 1–9, 2019.
- ZHANG, X. et al. Interactions Between Vitamin D and Calcium Intake, Vitamin D Receptor Genetic Polymorphisms, and Colorectal Cancer Risk. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, n. 6, p. 1895–1905, 2021.
- ZHU B. et al. The relationship between diabetes and colorectal cancer prognosis: A meta-analysis based on the cohort studies. **PLoS One**, v. 19, n. 4, e0176068, 2017.



Capítulo II – Artigos Científicos





Article

The Implications of Connexin 43 Deficiency during the Early Stages of Chemically Induced Mouse Colon Carcinogenesis

Sara Gomes Espírito Santo ¹, Tereza Cristina da Silva ², Mathieu Vinken ³ , Bruno Cogliati ² ,
Luís Fernando Barbisan ^{4,†} and Guilherme Ribeiro Romualdo ^{1,4,*,†}

¹ Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-687, São Paulo, Brazil

² School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-270, São Paulo, Brazil

³ Department of In Vitro Toxicology and Dermato-Cosmetology, Vrije Universiteit Brussel (VUB), 1090 Brussels, Belgium

⁴ Department of Structural and Functional Biology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-689, São Paulo, Brazil

* Correspondence: guilherme.romualdo@unesp.br; Tel.: +55-1438800469

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Santo, S.G.E.; da Silva, T.C.; Vinken, M.; Cogliati, B.; Barbisan, L.F.; Romualdo, G.R. The Implications of Connexin 43 Deficiency during the Early Stages of Chemically Induced Mouse Colon Carcinogenesis.

Antioxidants **2022**, *11*, 2368.

[https://](https://doi.org/10.3390/antiox11122368)

doi.org/10.3390/antiox11122368

11122368 Academic Editor:

Stanley Omaye

Received: 3 November 2022

Accepted: 26 November 2022

Published: 30 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Colorectal cancer (CRC), associated with an increased intake of processed red meats, saturated fats, and simple carbohydrates accompanied by low dietary fiber, fruits, and vegetables consumption, presents a high epidemiological burden. Connexin43 (Cx43) protein, which forms gap junctions or hemichannels, has tumor suppressor or oncogenic activities in a cancer type- and stage-dependent manner. Cx43 expression varies during colon carcinogenesis, and its functional role is not fully understood. Thus, we evaluated the implications of Cx43 heterologous deletion (Cx43^{+/-}) during the early stages of a chemically induced model of colon carcinogenesis. Female C57BL/6J mice (wild-type or Cx43^{+/-}) were submitted to a colon carcinogenesis model induced by 1,2 dimethylhydrazine (DMH). Mice were euthanized eight hours (week 7) or 30 weeks (week 37) after the last DMH administration to evaluate subacute colon toxicity outcomes or the burden of (pre)neoplastic lesions, respectively. At week 7, Cx43 deficiency inferred no alterations in the DMH-induced increase in systemic (peripheral blood), in situ (colonocytes) DNA damage, and apoptosis in the colonocytes. At week 30, Cx43^{+/-} mice presented an increase in preneoplastic aberrant crypt foci (ACF) multiplicity, while no alterations were observed in colorectal adenoma (CRA) occurrence, multiplicity, volume, proliferation, growth, and β -catenin immunoexpression. Similarly, an in silico analysis of human CRA showed decreased mRNA expression of Cx43 with no correlation with proliferation, apoptosis, and β -catenin markers. These findings indicate the discrete role of Cx43 in the early stages of chemically induced mouse colon carcinogenesis.

Keywords: aberrant crypt foci; colon carcinogenesis; colorectal adenoma; connexin 43; C57BL/6J mouse; 1,2-dimethylhydrazine

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC), which is mainly a sporadic disease (55–70%) associated with inappropriate dietary patterns and lifestyle, accounts for as much as 10% of all incident cases and cancer-related deaths worldwide, totaling about 2 million new cases and nearly 1 million deaths annually [1]. By 2040, there will be 63–67% and 77–80% projected increases in incidence and mortality, respectively [1]. The current CRC epidemiological burden is closely related to the human development index (HDI), as, in the high HDI Western countries, the efficient diagnosis and screening methods are responsible for the decreased incidence and increased survival. In middle-to-low HDI countries, CRC screening is quite heterogeneous, leading to late diagnosis (~25% cases), which is usually associated

with advanced disease stage, synchronous metastases, and reduced survival rates (up to ~10%) [2–4]. In these countries, the so-called “Westernization of lifestyle”, which includes the use of tobacco and alcoholic beverages, physical inactivity, increased intake of processed red meats, low dietary fiber, fruits, and vegetables, accounts for the increased CRC risk and burden [5–9].

The complex and multistage process in which sporadic CRC emerges, defined as colorectal carcinogenesis, encompasses a morphological–molecular sequence based on the transformation of the normal colorectal glandular epithelium into a colorectal adenoma (CRA) and, ultimately, into an invasive and metastatic adenocarcinoma [10,11]. Over the past decades, several attempts have been made to enable the early diagnosis of CRC, and the detection of aberrant crypt foci (ACF) as preneoplastic lesions has been long postulated in both human and rodent studies [12–15]. ACF consists of methylene blue stainable, large, “slit-like”, and thick aberrant crypts (AC), featuring KRAS mutations in humans and p53 or β -catenin mutations and accumulation in rodents, alterations that also feature in the late stages of colon carcinogenesis [16–18]. Accumulating clinical, morphological, and molecular evidence indicates that ACF are precursors of CRA and, ultimately, CRC [19]. In particular, short-to-medium-term chemically induced bioassays in both rats and mice have been widely applied in preclinical research to unveil the potential predisposing of promoting or preventive agents, as well as the screening of putative molecular targets. Among those, 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and its metabolite azoxymethane (AOM) are organ-specific complete carcinogens capable of inducing ACF and neoplastic lesions mainly located in the middle and distal colon of different rat and mouse strains [20–23]. In the liver of rodents, DMH is oxidized to AOM—that is, hydrolyzed to methylazoxymethanol (MAM). MAM reaches the colon through bile or blood circulation, and it is converted into alkylating reactive metabolites by β -glucuronidase, β -glucosidase, and sulfatase bacterial enzymes [24–26]. In brief, these molecules implicate oxidative stress and genomic instability—which is a cancer hallmark—in the colonocytes, leading to the emergence and accumulation of epigenomic or genomic alterations in key oncogenes or oncosuppressor genes. In fact, not only the oxidative stress but also the antioxidant status (e.g., enzymatic and nonenzymatic antioxidant agents) are directly implicated in different stages of rodent and human colon carcinogenesis [20,27]. These molecular alterations reflect on the appearance of ACF, which may progress to colorectal neoplasia [19,28].

Connexins are part of a family of proteins composed of 21 isoforms classified according to their molecular weight. These proteins are integral membrane proteins that may form functional hemichannels, enabling the communication between the cytosol and extracellular milieu, which may further dock between adjacent cells to form gap junctions, which facilitate intercellular communication. Both hemichannels and gap junctional intercellular communication (GJIC) enable the bidirectional exchange of small and hydrophilic molecules (e.g., microRNAs, metabolites, ions, and secondary messengers) playing essential roles in cell growth, differentiation, and tissue homeostasis. Furthermore, channel-independent biological functions have also been described for connexin proteins, as such [29–32]. Of all connexins, Cx43 is most ubiquitously expressed in the normal gastrointestinal system, including the colon, where it is sparsely distributed in intracellular compartments, and punctuated in the plasma membrane, likely representing GJIC in the colonic mucosa [33].

During colon carcinogenesis, the roles of Cx43 as a tumor suppressor or oncogene are not fully understood [34]. Although the majority of CRC are positive for the Cx43 protein, findings suggest that Cx43 may be absent/downregulated in CRC samples and cell tumor lines, which is associated with a loss of GJIC function. Indeed, the absence of Cx43 expression (~10% CRC) goes hand in hand with poor clinical outcomes, such as advanced stage, the presence of metastasis, and reduced relapse-free and overall survival [35–37]. In a cohort of 29 human microdissected samples of benign adenomatous polyps to poorly differentiated CRC, only Cx43 was found to be mutated in the multifunctional C-terminal domain of the protein, and its expression was restricted to invasive structures of exophytic CRC (50%) while absent in CRA and endophytic CRC, thereby demonstrating a potential

role of the mutated Cx43 protein in the advanced stages of colon carcinogenesis [38]. These clinical findings indicate that the maintenance of nonmutated Cx43 expression and its normal function may act as a tumor suppressor during colon carcinogenesis. In this respect, the transfection of Cx43 into human CRC HT29 cells, which do not express the Cx43 protein, reduced the growth of these cells in monolayer and tumor xenografts by partly colocalizing with β -catenin and downregulating the Wnt signaling pathway, which is frequently activated in colon carcinogenesis [35]. In contrast to these findings, in a cohort of 50 samples, Cx43 immunoexpression was found to progressively increase from CRA to the late stages of CRC, although no association with the clinical parameters was established [39]. More recently, the transfection of Cx43 into HCT116 and HT-29 spheroids was found to upregulate mTOR, downregulate AMPK signaling, and increase the ATP content and glucose oxygen consumption in a GJIC-dependent manner, leading to a growth advantage in spheroids and xenografts [40]. In addition, the analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database indicated that higher Cx43 levels are associated with worse clinical outcomes in CRC (e.g., advanced stage, presence of lymph metastasis, and invasion depth) [40].

Although Cx43 is downregulated or displays aberrant localization in human CRA [41], the available experimental and clinical data predominantly encompass the late stages of colon carcinogenesis, and early stages are usually underappreciated. For this reason, the present study evaluated the implications of Cx43 heterologous deletion (Cx43^{+/-}) in mice on the early steps of chemically induced colon carcinogenesis. This is the first report on the use of Cx43-deficient animals on colon carcinogenesis. These findings show a minor role of this protein on the subacute carcinogen-induced outcomes and also reveal a discrete effect on preneoplastic and neoplastic lesion development.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Female wild-type (WT) C57BL/6J mice were obtained from the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (USP, São Paulo—SP, Brazil) and kept in Botucatu Medical School of the São Paulo State University (UNESP, São Paulo—SP, Brazil). Heterozygous Cx43-deficient mice (Cx43^{+/-}) were generated by replacing exon 2 of the Cx43 gene with the neomycin resistance gene and backcrossed with WT C57BL/6J. Heterozygous animals were used, since the corresponding homozygous null mutation for Cx43 is lethal [42].

2.2 Experimental Design and Sampling

After a 2-week acclimation period, six-week-old female WT and Cx43^{+/-} C57BL/6J mice were subjected to the well-established 1,2 dimethylhydrazine (DMH)-induced model of colon carcinogenesis. Animals were subjected to 2 cycles of DMH injection (20 mg/kg body weight (b.wt.)) or NaCl% 0.9% vehicle intraperitoneal (i.p.) injections once a week for three weeks (weeks 1–3 and 5–7), with a week of rest between them (week 4) ($n = 18$ animals/genotype) (Figure 1). The dose of DMH carcinogen and the experimental design were based on the findings of Richards [43] and James et al. [44]. Both vehicle and DMH-injected animals ($n = 6$ mice/genotype) were euthanized at an early timepoint (week 7), namely 8 h after the last DMH administration, to evaluate the effects of Cx43 on carcinogen-induced genotoxicity and subacute colon toxicity outcomes. This time-point comprises the colonic crypt apoptosis peak after DMH injection [45]. The remaining animals ($n = 12$ mice/genotype) were euthanized at a late timepoint (week 37), namely 30 weeks after the last DMH administration, aiming for the screening of (pre)neoplastic lesions (Figure 1). Both euthanasia procedures were performed by exsanguination under ketamine/xylazine anesthesia (100/16 mg/kg b.wt., i.p.). The tail end was collected for Cx43 genotyping, and the liver was collected and weighted. The animals received chow and water ad libitum. The animals were housed in polypropylene cages (4 animals/cage)

in a room maintained at 22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity and with a 12-h light/dark cycle (light between 07:00 a.m. and 07:00 p.m.).

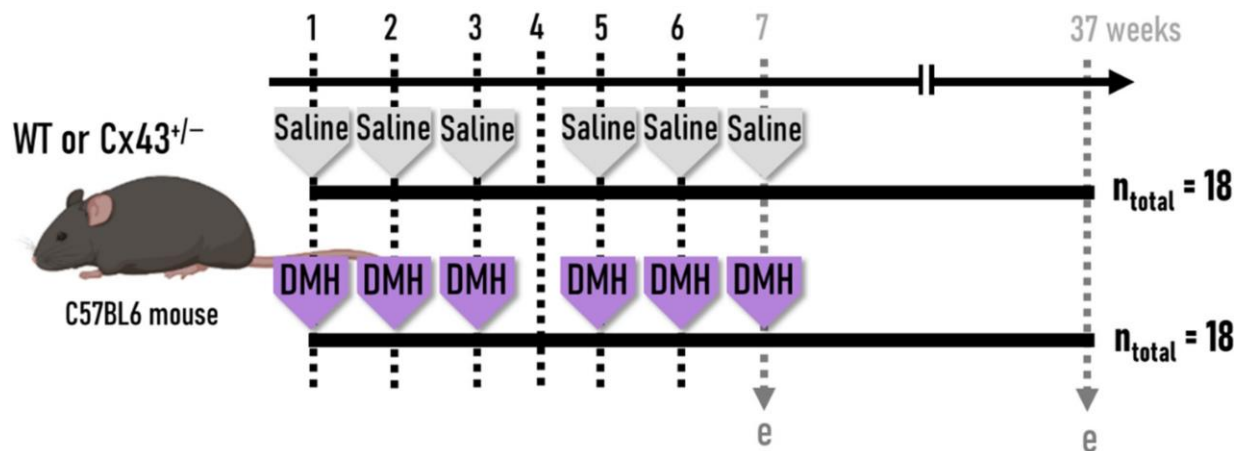


Figure 1. Experimental design. Saline: 1xNaCl 0.9% i.p. administration; DMH: 1 × 20 mg/kg/b.wt. i.p. administration; e: euthanasia; n_{total}: total number of mice per genotype.

At both timepoints (weeks 7 and 37), the large intestine was removed, opened longitudinally, and gently rinsed with 0.9% saline to remove residual bowel contents, and the length was then measured (cm). At week 7, distal colon samples (1–2 cm) were collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for biochemical analysis. Subsequently, the colon specimens were fixed flat in methacarn solution (60% methanol, 30% chloroform, and 10% acetic acid) for 12 h (4 °C) and transferred to 70% alcohol. At week 37, methacarn-fixed colons were stained with 1% methylene blue solution for analysis and the quantification of preneoplastic ACF [12]. At this timepoint, macroscopic tumors were counted, measured with a digital caliper, excised from the colon specimens, and individually fixed in methacarn. At both weeks 7 and 37, flat-fixed distal colon specimens (~2 cm width segments) and tumors were embedded in paraffin for histological analysis. Distal colon specimens were collected at both timepoints, since the increased amount of DMH-induced DNA adducts in this section was positively correlated to the higher incidence of (pre)neoplastic alterations compared to the middle/proximal colon sections [44,46]. All procedures described were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the São Paulo State University (UNESP) (acceptance number 569210721).

2.3 Genotyping

DNA was extracted from the tail end of mice, and a polymerase chain reaction (PCR) was performed using primer pairs oIMR0092 (AAT CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT C), oIMR6174 (AGG TGG TGT CCA GAG CCT TA), and oIMR6175 (CAC GTG AGC CAA GTA CAG GA) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). The cycling conditions were: 1 cycle (94 °C for 2 min.); 10 cycles (94 °C for 20 s, 65 °C for 30 s, and 68 °C for 40 s); 28 cycles (94 °C for 20 s, 60 °C for 35 s, and 72 °C for 40 s); and 1 cycle (72 °C for 5 min). Samples were loaded onto a 2% agarose gel with a specific nucleic acid dye at 80 V for 45 min. The PCR product was evaluated in the Chemidoc image system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Representative gel photos can be observed in Supplementary Figure S1.

2.4 Genotoxicity Assessment

Peripheral blood samples from the orbital plexus were obtained 4h after the last DMH administration (week 7) for the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. The timepoint was based on a similar approach that identified increased colon genotoxicity after a single DMH injection at the same dose (and route) [47]. Blood samples were mixed with low-melting point agarose (100 µL 0.75% in PBS, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA), spread on slides precoated with normal point agarose (1.5% in PBS, Invitrogen), and coverslipped. Following agarose solidification (4 °C for 5 min), coverslips were carefully removed, and slides were incubated with cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10) overnight at 4 °C. Subsequently, the slides were immersed in fresh cold alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH > 13) for 20 min. Electrophoresis was conducted for 20 min at 1 V/cm (300 mA). The slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), dehydrated in 100% ethanol, and stained with SYBR Gold solution (1:10,000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fifty randomly selected nucleoids were counted per slide (duplicate) in an epi-fluorescence microscope (Olympus BX-50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using Comet Assay IV software (Perceptive Instruments, Bury St Edmunds, UK). The tail intensity (% of DNA in the comet tail) was calculated.

2.5 ACF Screening and Tumor Analysis

In methylene blue-stained colon specimens, ACF number/cm (mean number of ACF per colon length), aberrant crypt (AC)/cm (mean number of AC per colon length), and ACF multiplicity (mean number of AC per ACF) were calculated for each group [12]. During necropsy, macroscopic gross tumors were measured using a digital caliper, and the tumor volume was calculated using the following formula: $\text{length} \times \text{width} \times \text{depth} \times 1/2$. Sections (5 µm) were obtained from methacarn-fixed and paraffin-embedded tumor samples and stained with hematoxylin and eosin (HE). In HE-stained sections, neoplastic lesions were identified and further classified into CRAs (differential features: polypoid lesions with branching hyperplastic/dysplastic tubular crypts and the reduction/absence of goblet cells restricted to the mucosa), according to the “International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice” criteria [48]. The tumor incidence (percentage of CRA-bearing mice) and multiplicity (mean number of CRA per mouse) were calculated.

2.6 Immunohistochemistry Analysis

Tumor or distal colon sections (5 µm) were subjected to antigen retrieval in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0, 5 min, 120 °C) in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation, Denmark). Following an endogenous peroxidase blockade with 10% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) (15 min), the slides were treated with skim milk (60 min) and incubated with primary antibodies directed against Ki-67 (i.e., cell proliferation, MA5-14520, 1:100 dilution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), cleaved caspase-3 (i.e., apoptosis, PA577887, 1:50 dilution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), phosphorylated-H2AX (i.e., DNA damage marker, MA5-27753, 1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), or β-catenin (ab32572, E247, 1:400 dilution, Abcam, Cambridge, UK) in a humidified chamber (overnight, 4 °C). The slides were incubated with a one-step horseradish peroxidase polymer (EasyPath—Erviegas, Indaiatuba, São Paulo, Brazil) (20 min). The reaction was visualized with 3-diaminobenzidine (DAB) chromogen (Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA) and counterstained with Harris’ hematoxylin. A semiquantitative analysis for Ki-67, cleaved caspase-3, and H2AX was performed in 15 randomly selected crypts/animal/section (distal colon) or 6 fields (CRA) (20× objective, 1 section/animal). Both positive and negative epithelial cells were counted, and the results were expressed as the percentage (%) of Ki-67+, cleaved caspase-3+, or H2AX+ cells per crypt or CRAs. The growth index of each tumor was also calculated, considering the % of proliferating cells (Ki-67+) minus the % of apoptotic cells (caspase-3+). For β-catenin, the occurrence (%) of each pattern of staining (nucleus, cytoplasm, and/or membrane) was evaluated in all CRA. A score of intensity was also calculated for this marker, regardless of cellular localization: 0 (absence), 1 (weak), 2 (moderate), and 3 (strong). The analyses were performed by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7 Analysis of Antioxidant Enzymes

Total proteins were extracted from 50–100 mg of distal colon samples in KCl buffer (1.15%) and were quantified by Bradford's method. Total proteins were used to determine the activities of superoxide dismutase (SOD) [49] and catalase [50]. SOD activity was measured based on the inhibition of the superoxide radical reaction with pyrogallol. The catalase activity was determined in a 30% H₂O₂ PBS solution. The absorbance was measured at 420 (SOD) or 240 (catalase) nm in a microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA).

2.8 In Silico Analysis of Human CRA Samples

Using the R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<https://r2.amc.nl/>, accessed on 1 June 2021), the mRNA levels of GJA1 (Cx43, Gene ID: 2697) and its correlation with β -catenin (CTNNB1, gene ID: 1499), caspase-3 (CASP3, gene ID: 836), Ki-67 (MKI67, gene ID: 4288), and other classical colon carcinogenesis-related genes (Supplementary Figures S2 and S3) were evaluated. The analysis was performed in two different publicly available datasets: Galamb—18—MAS5.0—u133p2 (GEO ID: gse15960) dataset [51], which comprised a whole-genome oligonucleotide microarray analysis of laser microdissected human normal mucosa, CRA, and CRC samples ($n = 6$ for each class), and Balazs—53—MAS5.0—u133p2 (GEO ID: gse4183) dataset [52], which was also selected and comprised high-density oligonucleotide microarray data of whole biopsy samples of the normal colon ($n = 8$), CRA ($n = 15$), and CRC ($n = 15$) samples.

2.9 Statistical Analysis

Biological correlations were performed by using Pearson's correlation test (Pearson's r coefficient). CRA incidence data were analyzed by Fisher's exact test. Pairwise comparisons were evaluated by Student's t - or Mann–Whitney tests. Other data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis tests, followed by a *post hoc* Tukey test. Data presentation and the number of replicates are detailed in the footnotes and captions. The aforementioned analyses were performed using Prism GraphPad software (V4.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Cx43 Deficiency Does Not Alter DMH Effects on Body Weight, Liver Weights, or Colon Length at Weeks 7 and 37

At week 7, eight hours after the last carcinogen administration, animals that received six applications of DMH showed decreased body weights compared to saline-treated WT animals ($p = 0.0056$), regardless of the genotype (Figure 2A). The colon length and absolute liver weight were similar between both genotypes, independent from carcinogen administration (Figure 2A). DMH-administered WT mice had increased relative liver weights compared to their WT saline counterparts ($p = 0.03$) (Figure 2A). At week 37, only DMH-treated Cx43^{+/-} mice displayed decreased body weights compared to the saline-treated WT animals ($p = 0.006$) (Figure 2B). Nonetheless, the colon length and liver weights remained unmodified in both genotypes, regardless of carcinogen administration (Figure 2B). At both moments analyzed, the food intake remained unchanged among groups (data not shown).

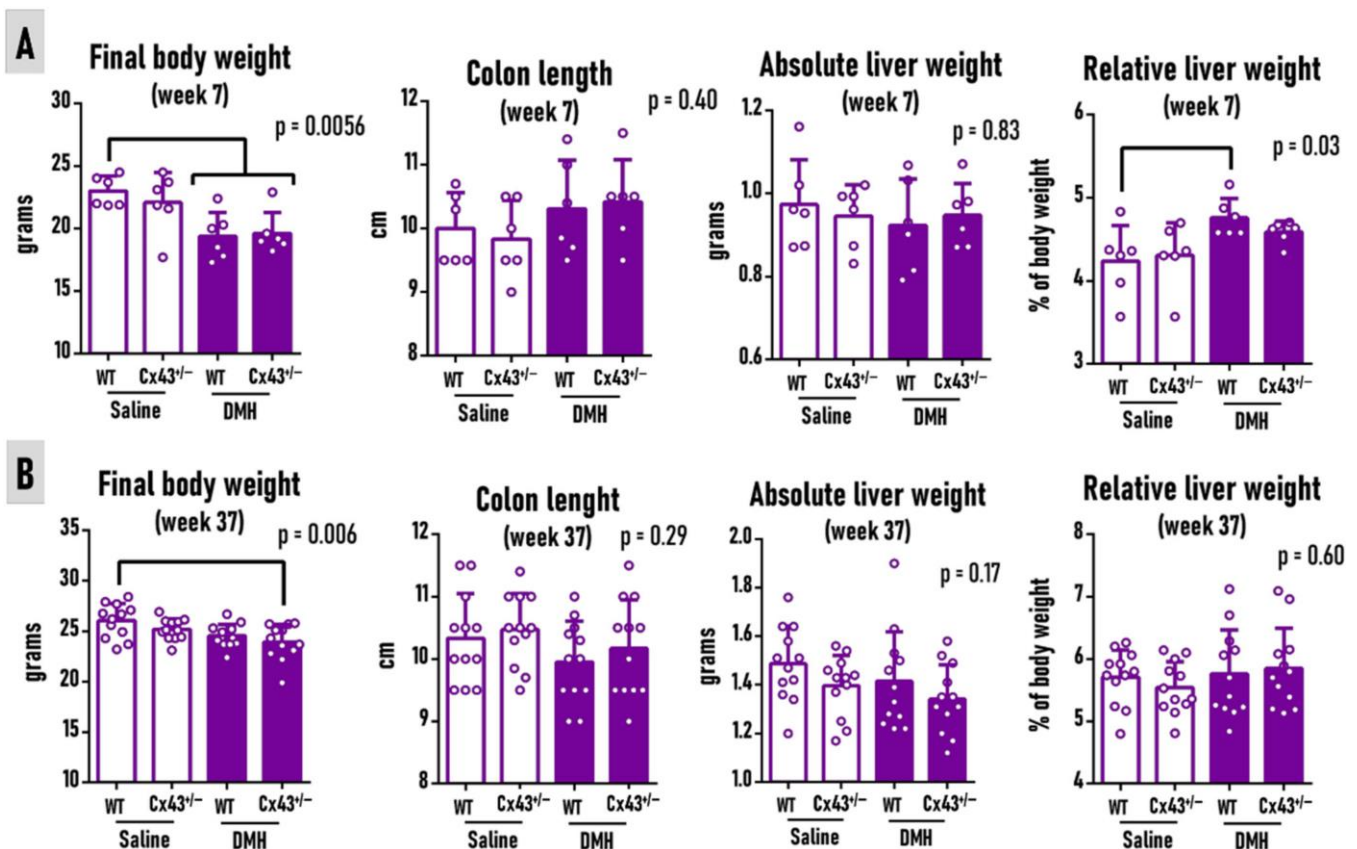


Figure 2. Implications of connexin 43 heterologous deletion (Cx43^{+/-}) on the final body weight, colon length, and absolute and relative liver weights during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in C57BL/6J mice at weeks (A) 7 and (B) 37. WT: wild-type. $n = 6$ (week 7) or 12 (week 37) mice/group/genotype. Data were presented as mean + standard deviation and data points. Data were analyzed by the one-way ANOVA and *post hoc* Tukey test ($p < 0.05$).

3.2 Cx43 Deficiency Does Not Alter Carcinogen-Induced Outcomes at Week 7

Eight hours after the last carcinogen administration, the Cx43^{+/-} genotype did not modify the DMH-mediated increase in DNA damage in leukocytes from peripheral blood (comet assay) ($p < 0.0001$) (Figure 3A) or in colonocytes (H2AX expression) ($p = 0.004$) (Figure 3B). The SOD activity was significantly increased ($p = 0.002$), while catalase showed a trend of enhancement in response to DMH exposure, independent from the genotype (Figure 3C). Furthermore, the Cx43 deficiency did not alter the increase in colonocyte apoptosis (caspase-3) caused by genotoxicity induced by DMH ($p = 0.0009$) (Figure 3D). Both groups showed similar colonocyte proliferation levels, regardless of carcinogen administration or Cx43 deficiency ($p = 0.10$) (Figure 3E). Collectively, the results indicate that Cx43 did not alter the subacute carcinogen effects on the colonic mucosa.

3.3 Cx43 Deficiency Slightly Attenuates Preneoplastic ACF Burden at Week 37

All DMH-initiated mice in both genotypes developed ACF, which are larger, darker, and thicker than normal crypts, as pictured in the topographic views of whole-colon mounts stained with methylene blue (Figure 4A). The Cx43^{+/-} genotype did not influence the mean number of ACFs but enhanced the average number of ACs ($p = 0.014$) and slightly increased by 17% the ACF multiplicity (AC per ACF) ($p = 0.003$) (Figure 4A). The different genotypes did not alter the colonocyte proliferation (Ki-67) in the “normal-appearing” crypts (Figure 4B). WT mice subjected to the DMH protocol had increased apoptosis in the “normal-appearing” crypts compared to the noninitiated animals (both WT and Cx43^{+/-}), an effect that was not observed during Cx43 deficiency ($p = 0.014$) (Figure 4C). Thus,

the findings point to a discrete role of Cx43 on crypt cell dynamics and preneoplastic ACF development.

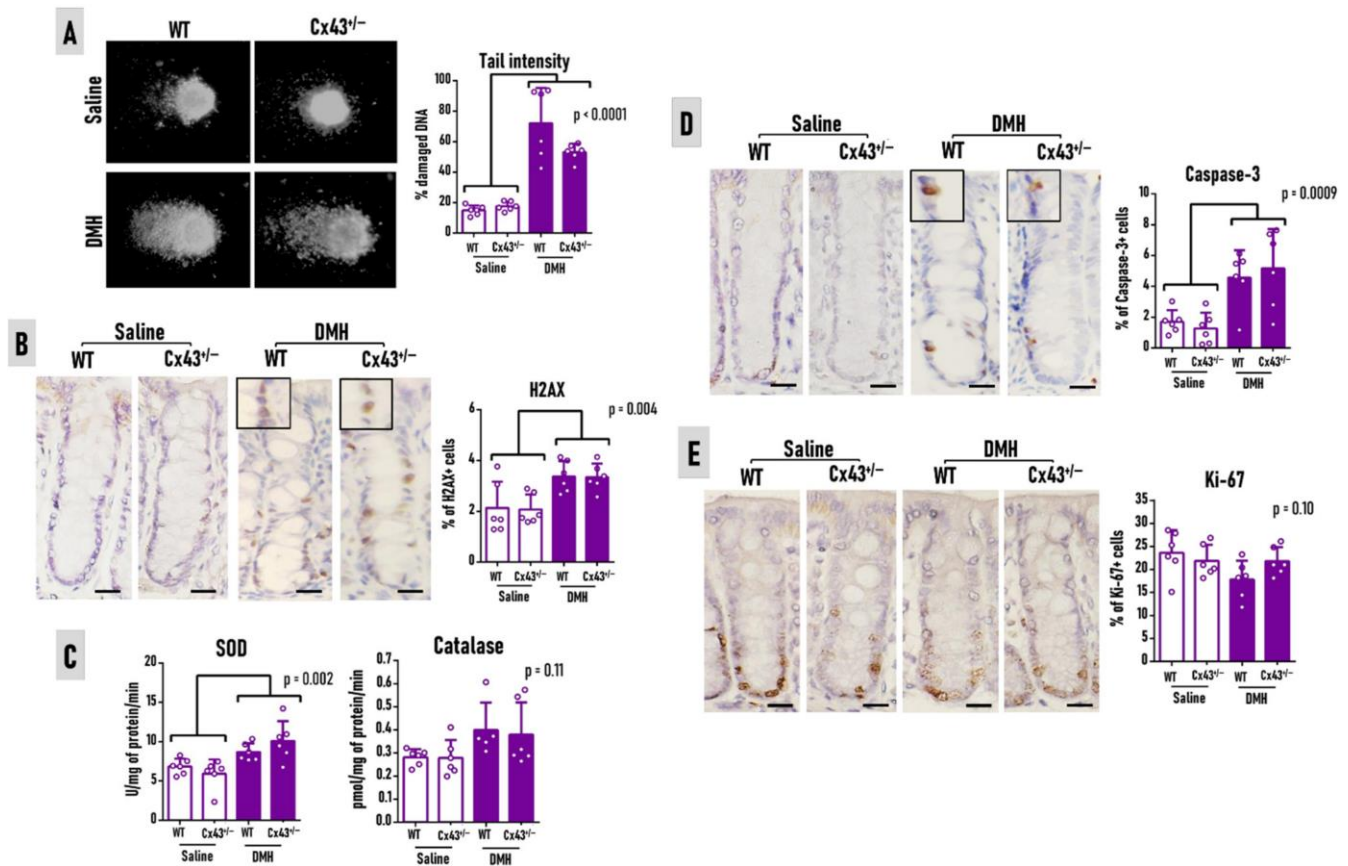


Figure 3. Implications of connexin 43 heterologous deletion (Cx43^{+/-}) on (A) peripheral blood genotoxicity, (B) colonocyte genotoxicity (H2AX), (C) antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes, (D) epithelial crypt apoptosis (caspase-3), and (E) epithelial crypt proliferation (Ki-67) during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in C57BL/6J mice at week 7. (A) Representative nucleoids of the comet assay are presented. (B,D,E) A representative microscopic overview (scale bar: 20 μ m) and semiquantitative analysis of H2AX, Ki-67, and cleaved caspase-3 immunostaining in the colonocytes in both genotypes are presented. WT: wild-type. $n = 6$ mice/group/genotype. Data were presented as mean + standard deviation and data points. Data were analyzed by the one-way ANOVA and *post hoc* Tukey test ($p < 0.05$).

3.4 Cx43 Deficiency Does Not Alter Colorectal Adenoma Burden at Week 37

Although the 37-week-long protocol led to a reduced number of gross macroscopic alterations in DMH-treated mice (Figure 5A), all lesions were identified as CRAs after histopathological analysis in HE-stained sections (Figure 5A). Cx43^{+/-} mice showed similar CRA incidence (5/12, 41.6%, for both genotypes), multiplicity, and volume compared to WT animals (Figure 5A). The immunohistochemistry analysis of Ki-67 also revealed a similar proliferation index and β -catenin score in CRAs for both genotypes (Figure 5B). Regarding the cellular localization, all tumors for both genotypes (5/5, 100%) displayed membranous and cytoplasmic β -catenin staining, revealing no nuclear translocation. Although Cx43^{+/-} increased the number of apoptotic cells in CRAs ($p = 0.025$) (Figure 5A), the reduced percentage of apoptotic cells in all tumors (maximum of $\sim 1.5\%$) did not confer a difference in the tumor growth index (Figure 5B). These results indicate a weak role of Cx43 on CRA development in an early DMH-induced mouse colon carcinogenesis model.

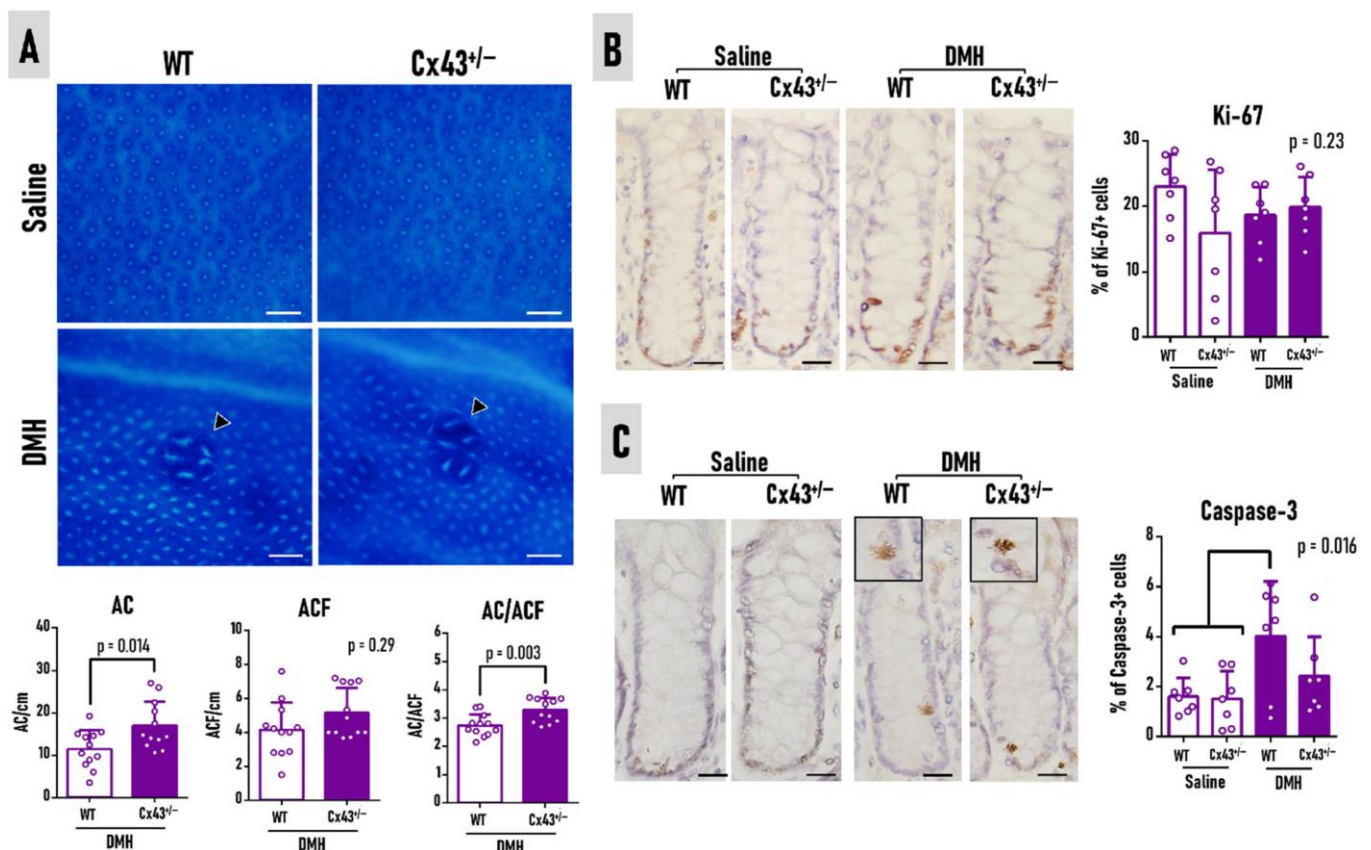


Figure 4. The implications of connexin 43 heterologous deletion (Cx43^{+/-}) on (A) the aberrant crypt foci (ACF) burden, (B) epithelial crypt proliferation (Ki-67), and (C) apoptosis (caspase-3) during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in C57BL/6J mice at week 37.

(A) Representative photomicrographs of a whole mount of colon specimens stained with methylene blue (scale bar: 100 μ m) depicting the absence (noninitiated) or the occurrence of ACF (DMH-initiated mouse) (arrowheads) and colon length, ACF, AC, and AC multiplicity (AC/ACF) data in both genotypes. (B) Representative microscopic overview (scale bar: 20 μ m) and semiquantitative analysis of Ki-67 and cleaved caspase-3 (details) immunostaining in the colonocytes of normal-appearing crypts in both genotypes. WT: wild-type. $n = 7$ (immunohistochemistry) or 12 (ACF data) mice/group/genotype. Data were presented as mean + standard deviation and data points. Data were analyzed by the one-way ANOVA and *post hoc* Tukey test (proliferation and apoptosis) or the Student's *t*-test (ACF data) ($p < 0.05$).

3.5 Cx43 mRNA Is Not Correlated to Ki-67, Caspase-3, and β -Catenin in Human Colorectal Adenoma

Both laser microdissected ($p = 0.023$) and whole biopsy ($p = 0.034$) human samples showed that the expression of the GJA1 gene is significantly downregulated in CRA compared to a normal colon (Figure 6). Nonetheless, in line with the preclinical findings, this decreased expression was not correlated to Ki-67, β -catenin, and caspase-3 genes in this benign and polypoid lesion. Furthermore, TP53, another classical gene involved in late CRC development, also showed the absence of correlation with GJA1 expression in CRA (Supplementary Figure S2). Although a significant positive correlation between GJA1 and KRAS in whole biopsy samples of CRA (and not in laser microdissected ones) (Supplementary Figure S2) was established, GJA1 expression was found to be downregulated, and the RAS pathway is usually activated in colon carcinogenesis [53]. In contrast to these findings, GJA1 expression was upregulated in the whole biopsy samples of CRC when compared to both normal colon and CRA ($p < 0.0001$) and was positively correlated with cell proliferation marker MKI67 ($p = 0.04$, $r = 0.42$) (Supplementary Figure S3).

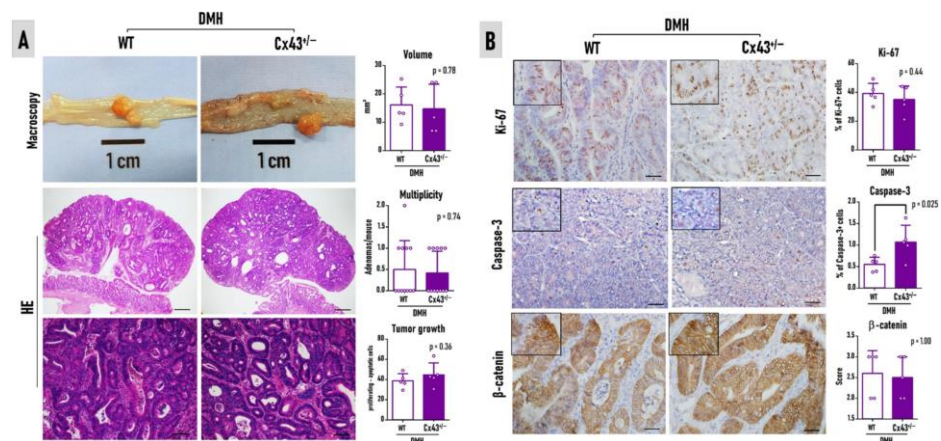


Figure 5. Implications of Cx43^{+/-} on colorectal adenoma (CRA) development during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in C57BL/6J mice at week 37. (A) Representative macroscopic (top) and microscopic overview (HE-stained sections, middle (scale bar: 100 μ m) and bottom (scale bar: 50 μ m)), volume, multiplicity, and tumor growth data of DMH-induced CRA in both genotypes. (B) Representative microscopic overview (details, scale bar: 20 μ m) and semiquantitative analysis of Ki-67, cleaved caspase-3, and β -catenin immunostaining of DMH-induced CRA in both genotypes. WT: wild-type. Data were presented as median + interquartile range (β -catenin) or mean + standard deviation (rest) and data points. Data were analyzed by the Mann–Whitney (β -catenin) or Student's *t*-test (rest) ($p < 0.05$).

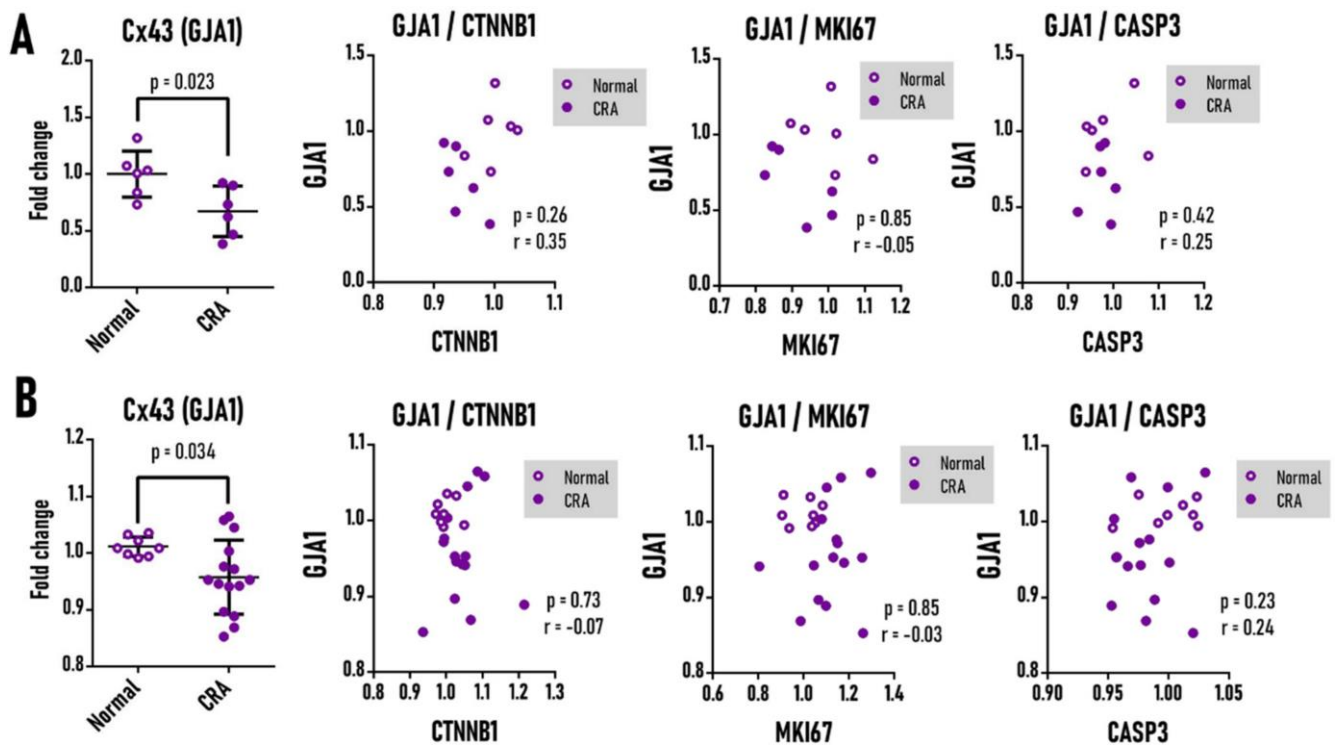


Figure 6. In silico analysis of the Cx43 gene (GJA1) and its correlation with the β -catenin (CTNNB1), Ki-67 (MKI67), and caspase-3 (CASP3) mRNA levels in colonic human samples (A) laser microdissected or (B) whole biopsy samples of a normal mucosa/colon and colorectal adenoma (CRA). A: human normal mucosa and CRA samples ($n = 6$ for each class); B: normal colon ($n = 8$) and CRA ($n = 15$) samples. Data were presented as mean $\pm$ standard deviation and data points. Data were analyzed by the Student's *t*-test or Pearson's correlation test ($p < 0.05$).

4 Discussion

This study was set to investigate the effects of Cx43 deficiency by using heterologous deletion in female C57BL/6J mice during the early stages of DMH-induced colon carcinogenesis. For this purpose, it was investigated whether Cx43 deficiency would modify (A) the subacute toxicity outcomes caused by DMH (8 h after the last administration) and/or (B) the earliest endpoint colonic lesions induced by this carcinogen (30 weeks after the last administration). Cx43 deficiency inferred no alterations in the DMH-induced increase in DNA damage in leukocytes from the peripheral blood or in colonocytes (H2AX marker), antioxidant enzyme activity, and apoptosis in the colonocytes (caspase-3), which are known subacute carcinogen outcomes [20,21]. Furthermore, although Cx43^{+/-} had increased preneoplastic ACF multiplicity, no alterations were observed in the CRA size, occurrence, multiplicity, growth, proliferation (Ki67), and β -catenin expression. The *in silico* analysis of human CRA showed decreased mRNA expression of Cx43, yet, in line with the *in vivo* findings, this downregulation showed no correlation with the proliferation (MKI67) and apoptosis (CASP3) markers, β -catenin, and other classically altered genes during colorectal carcinogenesis. These findings may indicate a discrete implication of Cx43 on the early stages of human and mouse colon carcinogenesis.

Cx43-deficient mice have proven to be valuable in investigating the participation of Cx43 in gastrointestinal physiology and pathology. Since homozygous Cx43^{-/-} mice die at birth, only heterozygous animals can be used for research purposes. Using Cx43^{+/-} mice, Guttman et al. [54] showed that Cx43 is implicated in the physiology of the colon, as Cx43 hemichannels mediate water release from colonocytes during bacterial infections. Nonetheless, in uninfected mice, Cx43 deficiency alone had no effects on the luminal water content. The findings of the present study corroborate with this, as, in saline-injected mice, Cx43 deficiency did not alter the colon crypt proliferation and apoptosis at both timepoints and did not trigger DNA damage in the peripheral blood and the colon, indicating that Cx43 deficiency *per se* may not impair the colon crypt dynamics and implicate genotoxicity in general. Biomedical pre-clinical research in general suffers from a clear male predominance, and models using female animals are usually underappreciated [55]. Despite presenting a slightly lower CRC epidemiological burden that is majorly attributed to healthier lifestyle choices, women are still highly affected by this disease [1]. The indirect tumor-promoting effects of testosterone observed in an AOM-induced model in a C57BL/6J sub-strain, which may also explain the sex disparity in humans [56], should not discourage the use of female mice in chemically induced CRC models reflecting the human disease.

After administration, the procarcinogen DMH undergoes biotransformation in the liver by cytochrome (CYP) P450 enzymes, mainly by the subunit CYP2E1, and it is metabolized to AOM; MAM; and, ultimately, to the methyl diazonium, methyl ions, and other DNA-reactive species [21–26]. These are highly reactive molecules that reach the colon via bile or the bloodstream, alkylating the DNA of colonocytes and contributing to DNA damage and genomic instability cancer hallmarks [21–26]. Eight hours after the last DMH dose, increased phosphorylated H2AX immunoreexpression was observed in colonocytes. Phospho-H2AX is a sensitive molecular marker of double-stranded breaks (DSB) playing a role in signaling and initiating the repair of these DNA lesions [57]. In agreement with this finding, increased single-stranded breaks (SSB) and DSB in peripheral blood were noticed, as depicted by the comet assay, indicating the systemic bioavailability of DMH and its metabolites [21]. In the colonic mucosa, while some of these alterations are repaired, unfixed DNA adducts and DSB may impair the maintenance of genomic stability, “initiating” colonocytes for the carcinogenesis process. Furthermore, in response to the alkylating carcinogen challenge, to keep mucosal homeostasis, morphological and molecular events switch towards cell cycle arrest and apoptotic events, including an increase in mRNA and protein expression of effector caspases [20,58], as equally observed in the present study. The DMH-induced increase in antioxidant enzymes may indicate that endogenous antioxidant systems are acting in response to reactive metabolites generated by carcinogen metabolism 8 h after the last exposure. SOD and catalase are fundamental enzymatic antioxidant agents

that act as a first line of defense against carcinogen-induced oxidative stress. SOD catalyzes the dismutation of two molecules of superoxide anion to hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen, while the catalase-mediated degradation or reduction of H_2O_2 to water and molecular oxygen completed the detoxification process initiated by SOD [59]. After 24 h, the DMH-induced stress progressively impairs these enzymatic antioxidant systems at the transcriptomic and functional levels in both the liver and colon [20]. Although Cx43-related functions are potentially implicated in promoting drug delivery [59], controlling apoptosis, proliferation [40,60–62], and modulating oxidative stress [63,64] in different cell types/organs and biological contexts, no implications of Cx43 deficiency on the DMH-induced subacute challenge outcomes were found in this study.

The screening of DMH endpoint lesions revealed that Cx43 deficiency increased the number of AC and ACF multiplicity, which could indicate a potential tumor-suppressive role of this protein, as previously addressed *in vitro* and in a xenograft mouse model using HT29 CRC cells [35]. CRA incidence, multiplicity, proliferation, apoptosis, and β -catenin expression remained unaltered. Rodent data indicate that ACF occurrence is positively correlated with CRA emergence, indicating that the former are potential precursors of the latter [19,28]. However, it is important to point out that ACF emergence is quite dynamic, and only a minor part of ACF progress to CRA. Indeed, ACF regression over time is a phenomenon observed in both mice [65] and humans [66]. Therefore, the increase in ACF burden in Cx43 deficiency should be considered with caution. In the present study, ACF were the main endpoint lesions, and longer studies with an increased CRA burden and CRC development should be further considered.

The tumor suppressor role attributed to Cx43 during colon carcinogenesis is mostly related to the potential impairment of Wnt/ β -catenin signaling activation [35]. Ectopically expressed Cx43 in HT29 CRC cells, which are naturally low/absent in Cx43, was found to bind and form a membranous complex β -catenin, thus negatively regulating Wnt/ β -catenin signaling. This decrease also resulted in the activation of proapoptotic pathways, regardless of GJIC formation [35]. These findings were observed in the late, and not the early, stage of colon carcinogenesis. In the premalignant stages, alterations in Wnt/ β -catenin signaling are not common. In sporadic colon carcinogenesis in humans, mutations in the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC) gene, which is a negative regulator of the Wnt/ β -catenin pathway, are rare (0–11%) [28]. In a rat model of colon carcinogenesis induced by DMH, no ACF had *Apc* mutations, and only a minor part harbored *Ctnnb1* (β -catenin) mutations (7%). Mutations in *Apc* (~30%) also do not occur in most benign tumors [67,68]. In this current study, no nuclear staining for β -catenin in CRA was found, only a membranous and/or cytoplasmic pattern, indicating no nuclear translocation and Wnt/ β -catenin pathway activation. In contrast, inactivating mutations in APC have been reported in up to 70% of sporadic CRC patients [69], and *Ctnnb1* mutations were found in ~40% of DMH-induced CRC in rats [70]. Thus, the absence of the effects of Cx43 deficiency on the earliest endpoint lesions (ACF and CRA) in mouse colon carcinogenesis may be explained by the increasing importance of Wnt/ β -catenin pathway activation during the late stages of this disease. Noteworthy, most clinical findings indicate that the absence/decreased expression of Cx43 is correlated to an advanced disease stage and the presence of metastasis [35–37]. The role of Cx43 deficiency in the CRA progression to CRC (malignant transformation) should also be considered. The *in silico* cohorts corroborated with these findings, as the downregulation of the Cx43 gene in CRA was not correlated to proliferation (MKI67), apoptosis (CASP3) markers, β -catenin, and other classically altered genes during colon carcinogenesis. Although the number of samples was low, clinical studies are usually performed on whole biopsy samples. Moreover, *in silico* and genome-wide *in vivo* investigations on the implications of Cx43 in ACF are encouraged. Although we found discrete effects of Cx43 deficiency on apoptosis in CRAs, further investigations should consider a recent mechanism described *in vitro*, showing that selenium nanoparticles promote the apoptosis of human glioblastoma cells by activating a Ca^{2+} -dependent mechanism that also relies on Cx43 hemichannel activity [71].

5 Conclusions

Altogether, the findings of this animal study point to the discrete implication of Cx43 in the early stages of chemically induced colon carcinogenesis. As most of the available preclinical and clinical data indicate that Cx43 may function as a tumor suppressor in the late stages of colon carcinogenesis, these findings do not discard the potential clinical value of this protein.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11122368/s1>: Figure S1: Representative agarose gel electrophoresis showing the results of PCR genotyping for wild-type (WT) or Connexin 43 heterozygous (Cx43^{+/-}) mouse. Figure S2: In silico analysis of the correlation of the Cx43 gene (GJA1) with the Kras (KRAS) and p53 (TP53) mRNA levels in human (A) laser microdissected or (B) whole biopsy samples of normal mucosa/colon and colorectal adenoma (CRA). Figure S3: In silico analysis of the Cx43 gene (GJA1) and its correlation with the β -catenin (CTNNB1), Ki-67 (MKI67), caspase-3 (CASP3), Kras (KRAS), and p53 (TP53) mRNA levels in human (A) laser microdissected or (B) whole biopsy samples of normal mucosa/colon, colorectal adenoma (CRA), and colorectal carcinoma (CRC).

Author Contributions: Conceptualization, G.R.R., L.F.B. and B.C.; methodology, T.C.d.S., G.R.R. and S.G.E.S.; software, T.C.d.S., G.R.R. and S.G.E.S.; validation, T.C.d.S., G.R.R. and S.G.E.S.; formal analysis, T.C.d.S., G.R.R. and S.G.E.S.; investigation, T.C.d.S., G.R.R. and S.G.E.S.; resources, G.R.R., L.F.B. and B.C.; data curation, G.R.R., L.F.B. and B.C.; writing—original draft preparation, G.R.R.; writing—review and editing, G.R.R., M.V., L.F.B. and B.C.; visualization, G.R.R., L.F.B. and B.C.; supervision, G.R.R., L.F.B. and B.C.; project administration, S.G.E.S., G.R.R., L.F.B. and B.C.; funding acquisition, G.R.R., L.F.B. and B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Bruno Cogliati was the recipient of the support research from the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants #2018/10953-9 and #2022/02175-1). Sara Gomes Espírito Santo was the recipient of a regular scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES, finance code 001) and of an international exchange program fellowship from CAPES-PRINT. The funders did not influence the writing and interpretation of the data.

Institutional Review Board Statement: All procedures described were approved by the Ethics Committee on Animal Use of São Paulo State University (UNESP) (acceptance number 569210721).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are available in the manuscript, and additional information will be available upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

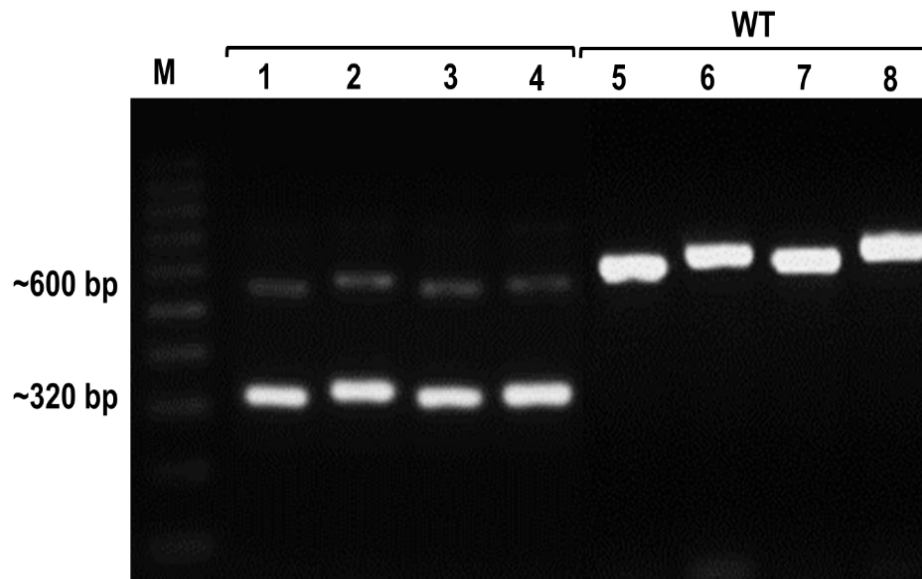
References

1. 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 Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
2. Leporrier, J.; Maurel, J.; Chiche, L.; Bara, S.; Segol, P.; Launoy, G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br. J. Surg.* **2006**, *93*, 465–474. [CrossRef] [PubMed]
3. De Klerk, C.M.; Gupta, S.; Dekker, E.; Essink-Bot, M.L. Socioeconomic and ethnic inequities within organised colorectal cancer screening programmes worldwide. *Gut* **2018**, *67*, 679–687. [CrossRef] [PubMed]
4. Wang, J.; Li, S.; Liu, Y.; Zhang, C.; Li, H.; Lai, B. Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 361–373. [CrossRef]
5. Chan, D.S.M.; Lau, R.; Aune, D.; Vieira, R.; Greenwood, D.C.; Kampman, E.; Norat, T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20456. [CrossRef]
6. Vieira, A.R.; Abar, L.; Chan, D.S.M.; Vingeliene, S.; Polemiti, E.; Stevens, C.; Greenwood, D.; Norat, T. Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 1788–1802. [CrossRef]
7. Murphy, N.; Moreno, V.; Hughes, D.J.; Vodicka, L.; Vodicka, P.; Aglago, E.K.; Gunter, M.J.; Jenab, M. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol. Asp. Med.* **2019**, *69*, 2–9. [CrossRef]

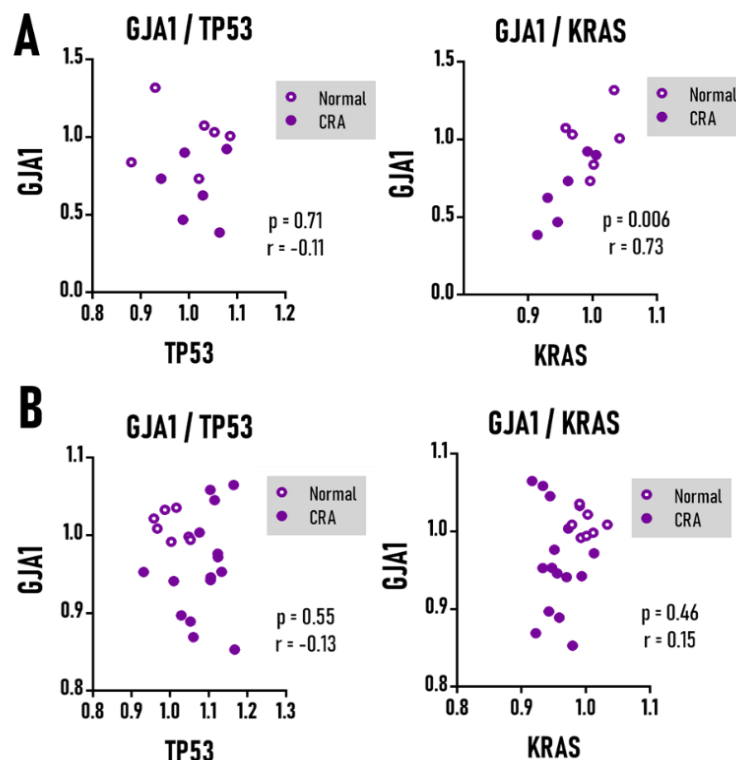
8. Amitay, E.L.; Carr, P.R.; Jansen, L.; Roth, W.; Alwers, E.; Herpel, E.; Kloor, M.; Bläker, H.; Chang-Claude, J.; Brenner, H.; et al. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1604–1610. [\[CrossRef\]](#)
9. Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers* **2021**, *13*, 2025. [\[CrossRef\]](#)
10. Leslie, A.; Carey, F.A.; Pratt, N.R.; Steele, R.J. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* **2002**, *89*, 845–860. [\[CrossRef\]](#)
11. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**, *6*, 759–767. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Bird, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* **1987**, *37*, 147–151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Shpitz, B.; Bomstein, Y.; Mekori, Y.; Cohen, R.; Kaufman, Z.; Neufeld, D.; Galkin, M.; Bernheim, J. Aberrant crypt foci in human colons: Distribution and histomorphologic characteristics. *Hum. Pathol.* **1998**, *29*, 469–475. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Takayama, T.; Katsuki, S.; Takahashi, Y.; Ohi, M.; Nojiri, S.; Sakamaki, S.; Kato, J.; Kogawa, K.; Miyake, H.; Niitsu, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1277–1284. [\[CrossRef\]](#)
15. Bird, R.P.; Good, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol. Lett.* **2000**, *112–113*, 395–402. [\[CrossRef\]](#)
16. Stopera, S.A.; Bird, R.P. Immunohistochemical demonstration of mutant p53 tumour suppressor gene product in aberrant crypt foci. *Cytobios* **1993**, *73*, 73–88.
17. Yamashita, N.; Minamoto, T.; Ochiai, A.; Onda, M.; Esumi, H. Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. Is there preference among K-ras mutants for malignant progression? *Cancer* **1995**, *75*, 1527–1533. [\[CrossRef\]](#)
18. Yamada, Y.; Yoshimi, N.; Hirose, Y.; Kawabata, K.; Matsunaga, K.; Shimizu, M.; Hara, A.; Mori, H. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3323–3327.
19. Wargovich, M.J.; Brown, V.R.; Morris, J. Aberrant crypt foci: The case for inclusion as a biomarker for colon cancer. *Cancers* **2010**, *2*, 1705–1716. [\[CrossRef\]](#)
20. Caetano, B.F.R.; Tablas, M.B.; Romualdo, G.R.; Rodrigues, M.A.M.; Barbisan, L.F. 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.* **2020**, *329*, 67–79. [\[CrossRef\]](#)
21. Rosenberg, D.W.; Giardina, C.; Tanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 183–196. [\[CrossRef\]](#)
22. Perše, M.; Cerar, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat—Experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol. Oncol.* **2005**, *39*, 61–70.
23. Perše, M.; Cerar, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 473964. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Wolter, S.; Frank, N. Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine in isolated perfused rat liver. *Chem. Biol. Interact.* **1982**, *42*, 335–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Wolter, S.; Schmähl, D.; Frank, N. Influence of diet on 1,2-dimethylhydrazine metabolism in rat liver. *Nutr. Cancer* **1984**, *6*, 181–186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Weisburger, J.H. Colon carcinogens: Their metabolism and mode of action. *Cancer* **1971**, *28*, 60–70. [\[CrossRef\]](#)
27. Skrzydlewska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 403–406. [\[CrossRef\]](#)
28. Clapper, M.L.; Chang, W.C.L.; Cooper, H.S. Dysplastic aberrant crypt foci: Biomarkers of early colorectal neoplasia and response to preventive intervention. *Cancer Prev. Res.* **2020**, *13*, 229–239. [\[CrossRef\]](#)
29. Willecke, K.; Jungbluth, S.; Dahl, E.; Hennemann, H.; Heynkes, R.; Grzeschik, K.H. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **1990**, *53*, 275–280.
30. Werner, R.; Levine, E.; Rabadan-Diehl, C.; Dahl, G. Formation of hybrid cell-cell channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5380–5384. [\[CrossRef\]](#)
31. Alexander, D.; Goldberg, G. Transfer of Biologically Important Molecules Between Cells Through Gap Junction Channels. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2045–2058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Dbouk, H.A.; Mroue, R.M.; El-Sabban, M.E.; Talhouk, R.S. Connexins: A myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun. Signal.* **2009**, *7*, 4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kanczuga-Koda, L.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Sobaniec-Łotowska, M.; Sulkowska, M. Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon—An immunohistochemical study. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2004**, *42*, 203–207. [\[PubMed\]](#)
34. Sirnes, S.; Lind, G.E.; Bruun, J.; Fykerud, T.A.; Mesnil, M.; Lothe, R.A.; Rivedal, E.; Kolberg, M.; Leithe, E. Connexins in colorectal cancer pathogenesis. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Sirnes, S.; Bruun, J.; Kolberg, M.; Kjenseth, A.; Lind, G.E.; Svindland, A.; Brech, A.; Nesbakken, A.; Lothe, R.A.; Leithe, E.; et al. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 570–581. [\[CrossRef\]](#)
36. Ismail, R.; Rashid, R.; Andrabi, K.; Parray, F.Q.; Besina, S.; Shah, M.A.; Hussain, M.U. Pathological implications of Cx43 down-

- regulation in human colon cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 2987–2991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ayad, E.; Eesa, A.N.; Radi, R.; Abdel-Salam, L.O.E.F. Expression of “connexin 43” in colorectal carcinomas: Histopathological and immunohistochemical study. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2020**, *8*, 354–359. [\[CrossRef\]](#)
 38. Dubina, M.V.; Iatckii, N.A.; Popov, D.E.; Vasil'ev, S.V.; Krutovskikh, V.A. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* **2002**, *21*, 4992–4996. [\[CrossRef\]](#)
 39. Han, Y.; Zhang, P.J.; Chen, T.; Yum, S.W.; Pasha, T.; Furth, E.E. Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2011**, *2011*, 561719. [\[CrossRef\]](#)
 40. Gong, K.; Hong, Q.; Wu, H.; Wang, F.; Zhong, L.; Shen, L.; Xu, P.; Zhang, W.; Cao, H.; Zhan, Y.; et al. Gap junctions mediate glucose transfer to promote colon cancer growth in three-dimensional spheroid culture. *Cancer Lett.* **2022**, *531*, 27–38. [\[CrossRef\]](#)
 41. Kanczuga-Koda, L.; Koda, M.; Sulkowski, S.; Wincewicz, A.; Zalewski, B.; Sulkowska, M. Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer—A shift from membranous CX32 and CX43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. *In Vivo* **2010**, *24*, 101–108. [\[PubMed\]](#)
 42. Reaume, A.G.; De Sousa, P.A.; Kulkarni, S.; Langille, B.L.; Zhu, D.; Davies, T.C.; Juneja, S.C.; Kidder, G.M.; Rossant, J. Cardiac Malformation in Neonatal Mice Lacking Connexin 43. *Science* **1995**, *267*, 1831–1834. [\[CrossRef\]](#)
 43. Richards, T.C. Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1680–1685.
 44. James, J.T.; Shamsuddin, A.M.; Trump, B.F. Comparative study of the morphologic, histochemical, and proliferative changes induced in the large intestine of ICR/Ha and C57BL/Ha mice by 1,2-dimethylhydrazine. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, *71*, 955–964. [\[PubMed\]](#)
 45. Ijiri, K. Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, and gamma-rays. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6342–6346. [\[PubMed\]](#)
 46. James, J.T.; Autrup, H. Methylated DNA adducts in the large intestine of ICR/Ha and C57BL/Ha mice given 1,2-dimethylhydrazine. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, *70*, 541–546. [\[PubMed\]](#)
 47. Sasaki, Y.F.; Saga, A.; Akasaka, M.; Ishibashi, S. Organ-specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: Difference between intraperitoneal and oral administration. *Mutat. Res.* **1998**, *415*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
 48. Nolte, T.; Brander-Weber, P.; Dangler, C.; Deschl, U.; Elwell, M.R.; Greaves, P.; Hailey, R.; Leach, M.W.; Pandiri, A.R.; Rogers, A.; et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J. Toxicol. Pathol.* **2016**, *29*, 1S–125S. [\[CrossRef\]](#)
 49. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474. [\[CrossRef\]](#)
 50. Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1974.
 51. Galamb, O.; Spisák, S.; Sipos, F.; Tóth, K.; Solymosi, N.; Wichmann, B.; Krenács, T.; Valcz, G.; Tulassay, Z.; Molnár, B. Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 765–773. [\[CrossRef\]](#)
 52. Galamb, O.; Wichmann, B.; Sipos, F.; Spisák, S.; Krenács, T.; Tóth, K.; Leiszter, K.; Kalmár, A.; Tulassay, Z.; Molnár, B. Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48547. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 53. Schell, M.J.; Yang, M.; Teer, J.K.; Lo, F.Y.; Madan, A.; Coppola, D.; Monteiro, A.N.A.; Nebozhyn, M.V.; Yue, B.; Loboda, A.; et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 54. Guttman, J.A.; Lin, A.E.; Li, Y.; Bechberger, J.; Naus, C.C.; Vogl, A.W.; Finlay, B.B. Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease. *Gut* **2010**, *59*, 218–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 55. Clayton, J.A. Studying both sexes: A guiding principle for biomedicine. *FASEB J.* **2016**, *30*, 519–524. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 56. Amos-Landgraf, J.M.; Heijmans, J.; Wielenga, M.C.B.; Dunkin, E.; Krentz, K.J.; Clipson, L.; Ederveen, A.G.; Groothuis, P.G.; Mosselman, S.; Muncan, V.; et al. Sex disparity in colonic adenomagenesis involves promotion by male hormones, not protection by female hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16514–16519. [\[CrossRef\]](#)
 57. Mah, L.J.; El-Osta, A.; Karagiannis, T.C. γH2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **2010**, *24*, 679–686. [\[CrossRef\]](#)
 58. Kerr, C.A.; Hines, B.M.; Shaw, J.M.; Dunne, R.; Bragg, L.M.; Clarke, J.; Lockett, T.; Head, R. Genomic homeostasis is dysregulated in favour of apoptosis in the colonic epithelium of the azoxymethane treated rat. *BMC Physiol.* **2013**, *13*, 2. [\[CrossRef\]](#)
 59. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 287–293. [\[CrossRef\]](#)
 60. Xiao, J.; Zhang, G.; Li, B.; Wu, Y.; Liu, X.; Tan, Y. Dioscin augments HSV-tk-mediated suicide gene therapy for melanoma by promoting connexin-based intercellular communication. *Oncotarget* **2017**, *8*, 798–807. [\[CrossRef\]](#)
 61. Goubaeva, F.; Mikami, M.; Giardina, S.; Ding, B.; Abe, J.; Yang, J. Cardiac mitochondrial connexin 43 regulates apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 97–103. [\[CrossRef\]](#)
 62. Sun, Y.; Zhao, X.; Yao, Y.; Qi, X.; Yuan, Y.; Hu, Y. Connexin 43 interacts with Bax to regulate apoptosis of pancreatic cancer through a gap junction-independent pathway. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 941–948. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 63. Kar, R.; Riquelme, M.A.; Werner, S.; Jiang, J.X. Connexin 43 channels protect osteocytes against oxidative stress-induced cell death. *J. Bone Miner. Res.* **2013**, *28*, 1611–1621. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

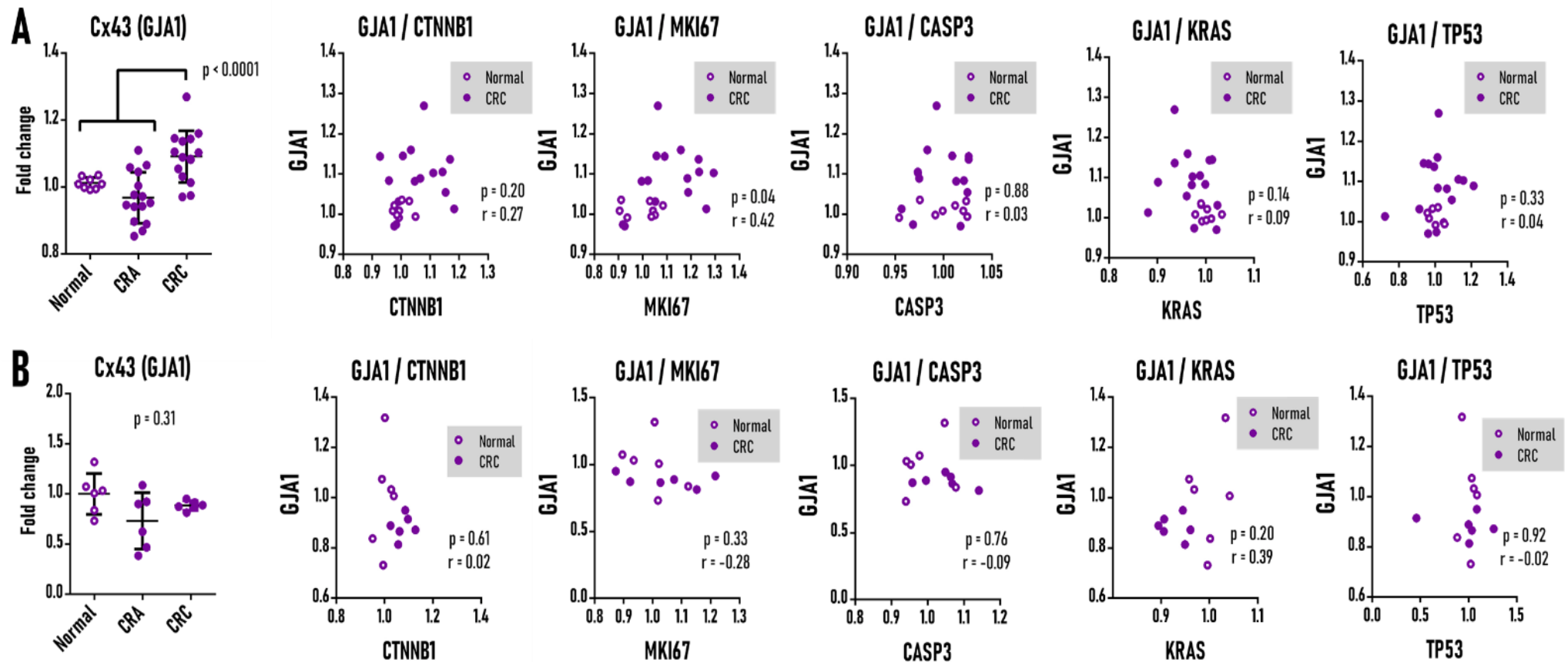
64. Pecoraro, M.; Pala, B.; Di Marcantonio, M.C.; Muraro, R.; Marzocco, S.; Pinto, A.; Mincione, G.; Popolo, A. Doxorubicin-induced oxidative and nitrosative stress: Mitochondrial connexin 43 is at the crossroads. *Int. J. Mol. Med.* **2020**, *46*, 1197–1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Choi, J.W.; Kim, P.; Kim, J.K.; Kim, Y.R.; Fukumura, D.; Yun, S.H. Longitudinal tracing of spontaneous regression and anti-angiogenic response of individual microadenomas during colon tumorigenesis. *Theranostics* **2015**, *5*, 724–732. [[CrossRef](#)]
66. Schoen, R.E.; Mutch, M.; Rall, C.; Dry, S.M.; Seligson, D.; Umar, A.; Pinsky, P. The natural history of aberrant crypt foci. *Gastrointest. Endosc.* **2008**, *67*, 1097–1102. [[CrossRef](#)]
67. Femia, A.P.; Bendinelli, B.; Giannini, A.; Salvadori, M.; Pinzani, P.; Dolara, P.; Caderni, G. Mucin-depleted foci have β -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* **2005**, *116*, 9–15. [[CrossRef](#)]
68. Femia, A.P.; Dolara, P.; Giannini, A.; Salvadori, M.; Biggeri, A.; Caderni, G. Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 445–449. [[CrossRef](#)]
69. Lüchtenborg, M.; Weijenberg, M.P.; Roemen, G.M.J.M.; de Bruijne, A.P.; van den Brandt, P.A.; Lentjes, M.H.F.M.; Brink, M.; van Engeland, M.; Goldbohm, R.A.; de Goeij, A.F.P.M. APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1219–1226. [[CrossRef](#)]
70. Blum, C.A.; Tanaka, T.; Zhong, X.; Li, Q.; Dashwood, W.M.; Pereira, C.; Xu, M.; Dashwood, R.H. Mutational analysis of Ctnnb1 and Apc in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline: Mutational “hotspots” and the relative expression of β -catenin and c-jun. *Mol. Carcinog.* **2003**, *36*, 195–203. [[CrossRef](#)]
71. Turovsky, E.A.; Varlamova, E.G. Mechanism of Ca^{2+} -dependent pro-apoptotic action of selenium nanoparticles, mediated by activation of Cx43 hemichannels. *Biology* **2021**, *10*, 743. [[CrossRef](#)]



Supplementary data 1. Representative agarose gel electrophoresis showing results of PCR genotyping for wild-type (WT) or Connexin 43 heterozygous (Cx43^{+/-}) mouse. Lane M: Marker; Lanes 1-4: Cx43^{+/-} mice, showing a normal allele at ~600 base pairs (bp), and mutant allele at ~320 base pairs (bp); Lanes 5-8: WT mice, showing both alleles at 600 bp.



Supplementary data 2. *In silico* analysis of the correlation of Cx43 gene (GJA1) with Kras (KRAS), and p53 (TP53) mRNA levels in human (A) laser microdissected or (B) whole biopsy samples of normal mucosa/colon, and colorectal adenoma (CRA). A: human normal mucosa, CRA (n=6 for each class); B: normal colon (n=8), CRA (n=15) samples. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation and datapoints. Data were analyzed one-way ANOVA and *post hoc* Tukey test or Pearson's correlation test ($p < 0.05$).



Supplementary data 3. *In silico* analysis of Cx43 gene (GJA1) and its correlation with β -catenin (CTNNB1), Ki-67 (MKI67), caspase-3 (CASP3), Kras (KRAS), and p53 (TP53) mRNA levels in human (A) laser microdissected or (B) whole biopsy samples of normal mucosa/colon, colorectal adenoma (CRA), and colorectal carcinoma (CRC). A: human normal mucosa, CRA and CRC samples (n=6 for each class); B: normal colon (n=8), CRA or CRC (n=15) samples. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation and datapoints. Data were analyzed one-way ANOVA and *post hoc* Tukey test or Pearson's correlation test ($p < 0.05$).

Panx1 knockout promotes preneoplastic aberrant crypt foci development in a chemically induced model of mouse colon carcinogenesis

Sara Gomes Espírito Santos¹; Tereza Cristina da Silva²;

Bruno Cogliati²; Luís Fernando Barbisan³, Guilherme Ribeiro Romualdo^{1,3*}

¹São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

²University of São Paulo (USP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Pathology, São Paulo, São Paulo State, Brazil.

³São Paulo State University (UNESP), Biosciences Institute, Department of Structural and Functional Biology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

*Corresponding author

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

Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin road, 250, 18618-689, Botucatu, SP, Brazil. Tel/Fax: +55 14

38800469. E-mail address: guilherme.romualdo@unesp.br

O presente artigo foi preparado de acordo com as normas da revista
Journal of Molecular Histology (fator de impacto 3,15), a qual será
submetido após exame de defesa

Abstract

Colorectal cancer (CC), the third leading cause of cancer-related deaths worldwide, is a multistep disease, featuring preneoplastic aberrant crypt foci (ACF) as the early morphological manifestation, progressing to adenoma and lately to CC. The hemichannel-forming transmembrane protein Pannexin 1 (Panx1), has contrasting roles in the carcinogenic processes of other cancer types, although the influence of this protein has not been investigated in colon carcinogenesis yet. Thus, this study was conducted to examine the effects of Panx1 knockout (Panx1^{-/-}) on the early events of chemically induced colon carcinogenesis in mouse. For that, Wild type (WT) and Panx1^{-/-} female C57BL6 mice were submitted to a chemically induced model of colon carcinogenesis by receiving six intraperitoneal administrations of 1,2 dimethylhydrazine (DMH) carcinogen. Animals were euthanized eight hours (week 7) or 30 weeks (week 37) after the last DMH administration in order to evaluate sub-acute colon toxicity outcomes or the burden of ACF, respectively. At week 7, Panx1 genetic ablation increased DMH-induced genotoxicity in peripheral blood cells, malondialdehyde levels in the colon, and apoptosis (cleaved caspase-3) in colonic crypts. Of note, at week 37, Panx1^{-/-} animals showed an increase in aberrant crypt (AC), ACF mean number, and ACF multiplicity (AC per ACF) by 56%, 57% and 20%, respectively. In essence, our findings indicate that Panx1 genetic ablation promotes preneoplastic ACF development during chemically induced mouse colon carcinogenesis, and a protective role of Panx1 is postulated. However, more studies are required to understand this relationship and assign Panx1 the tumor suppressor role in CC.

Keywords: aberrant crypt foci; colon carcinogenesis; C57BL6 mouse; dimethylhydrazine.

1. Introduction

Colorectal cancer (CC) is one of the most incident and lethal cancer sites worldwide, resulting in 2 million new cases and almost 1 million deaths annually. Furthermore, increases of 63-67% in incidence and 77-80% in mortality are expected for 2040 (GLOBOCAN, 2020). Most of the CC cases emerge sporadically (55-70%), related to “unhealth” dietary habits and lifestyle, such as smoking, alcohol intake, obesity, physical inactivity, and a diet rich in processed foods, red meat, and sugary drinks (Keum & Giovannucci, 2019). These behaviors are part of “western lifestyle” and can be linked to industrialized countries with elevated rates of human development index (HDI), as well as CC epidemiology burden (Douaiher et al., 2017; Goodarzi et al., 2020). CC develops under the emergence and accumulation of a series of morphological, genetic or epigenetic changes in the epithelial cells from colonic crypts. During this multi-step process, the aberrant crypt foci (ACF) is the earliest histologic alterations to arise (Lopez-Ceron & Pellise, 2012). In methylene blue staining, ACF are distinctively larger than other structures and can be easily morphological identified by its darker, thicker and “slit-like” crypts, allowing a widely used methodology of a quantitative approach to the understanding of colorectal carcinogenesis (Bird, 1987; Roncucci et al., 1991; Clapper et al., 2020). β -catenin or p53 mutations and accumulation are frequently present in rodents ACF and also in CC (Stopera et al., 1993; Yamada et al., 2000; Bird & Good, 2000; Wargovich et al., 2010; Clapper et al., 2020). Both clinical and preclinical assays have documented an association between the presence of ACF and risk for CC development. For these reasons, ACF are considered putative preneoplastic lesions in human colonic mucosa, although their progression towards CC may depend on multiple features (Wargovich et al., 2010; Clapper et al., 2020). In short-to-medium term chemically induced colon carcinogenesis bioassays in rodents, ACF have already proved their predictive value for the prevention, treatment or progression to CC (Perse & Cerar, 2011; Caetano et al., 2020; Amadeu et al., 2022; Bartolomeu et al., 2022). Although some ACF may gather molecular features that support them as CC precursors, the landscape of molecular alterations within these lesions is still not fully unveiled, and the search for molecular targets is warranted.

In this background, Pannexin 1 (Pannx1), the most widely spread and well known hemichannel-forming protein from the pannexin family, is vaguely understood in all colon carcinogenesis stages (Baranova et al., 2004). Composed by four transmembrane domains, with both N- and C-terminal regions located intracellularly, Pannx1 oligomerization leads to a heptameric channel of large pore, the pannexon (Qu et al., 2020). The main function of these panexons is the transportation of ATP, Ca^{2+} and others ions and small molecules, being important to paracrine signaling and many biological functions. However, there is little evidence for Pannx1 distribution and functions in the normal colon. Diezmos et al. (2013) evidenced that Pannx1 is broadly immunoexpressed in all layers of this organ, including the cytoplasm and cell membranes of the enterocytes and goblet cells of the colonic mucosa. A few years later, they proposed that Pannx1 hemichannels have a critical role on colonic inflammation, as the ATP released may activate purinergic P2X7 receptors (P2X7R), promoting inflammation by paracrine signaling. Indeed, the chemical blockade of Pannx1 channels hindered cytokine-induced inflammation in CC Caco-2 cells and in normal cultured human colon strips (Diezmos et al., 2018).

Due to its relevance, Pannx1 is also reported in pathological mechanisms, even in cancer (D'Hondt et al., 2009). Pannx1 overexpression in breast and gastric tumor cells was positively associated to epithelial-mesenchymal transition phenotype-related outcomes, which were reverted by genetic knockdown (Jalaleddine et al., 2019; Ying et al., 2021). In cohorts of breast, gastric, and liver cancers, Pannx1 overexpression was also positively correlated to poor prognosis and/or tumor inflammation (Shi et al., 2019; Jalaleddine et al., 2019; Bao et al., 2021). In contrast to these tumor-promoting outcomes, Pannx1 was demonstrated to interact with liver $\text{X}\beta$ ($\text{LX}\beta$) receptors, leading to an increased ATP release and subsequent P2X7R activation, which induced pyroptosis in human and rodent CC cell lines, acting as a tumor suppressor protein (Derangère et al., 2014). This Pannx1-dependent mechanism was also confirmed in a CT26 xenograft mouse model (Derangère et al., 2014).

Nonetheless, the roles of Panx1 in the early stages of colon carcinogenesis are not evaluated. For this reason, the aim of this study is to elucidate the effects Panx1 knockout (Panx1^{-/-}) on the early events of chemically induced colon carcinogenesis in mouse. In contrast to other gastrointestinal cancers, our preclinical findings indicate that Panx1 deletion promotes preneoplastic ACF development, and a protective property of this protein in early colon carcinogenesis should be further investigated.

2. Methodology

2.1 Experimental design

The global Panx1^{-/-} mice strain (CMV-Cre/Panx1) in C57BL/6 background was generated as previously described (Dvorianchikova et al., 2012). All animals were obtained from the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (USP, São Paulo – SP, Brazil), and kept in Botucatu Medical School of the São Paulo State (UNESP, São Paulo - SP, Brazil). After a two-week acclimation period, six-week-old female wild type (WT) and female Panx1^{-/-} C57BL/6 mice (n = 18 animals/genotype) received six intraperitoneal (i.p.) administrations of 1,2-dimethylhydrazine colon carcinogen (DMH, 20 mg/kg body weight) (Richards, 1977; James et al., 1983), divided in two cycles of three administrations with a rest week between them, or saline 0.9% vehicle, according to the **Figure 1**. At week 7, in order to evaluate the sub-acute toxicity outcomes caused by DMH, animals (6 mice/group/genotype) were euthanized 8 hours after the last administration, as this timepoint encompasses the peak of DMH-induced apoptosis (Ijiri, 1989). At week 37, the remaining animals (12 mice/group/genotype) were euthanized 30 weeks after the last administration, aiming the screening of earliest endpoint lesions induced by this DMH, the preneoplastic ACF (Bird, 1987). The euthanasia procedures were performed by exsanguination under ketamine/xylazine anesthesia (100/16 mg/kg body weight, i.p.). The animals received diet and water *ad libitum*, and were kept in polypropylene cages (4 animals/cage) in a room maintained at 22 ± 2°C, 55 ± 10% humidity, and with a 12-h light/dark cycle (light between 07:00 a.m. and 07:00 p.m.). All procedures described herein were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the São Paulo State University (UNESP) (#569210721).

At the necropsy, the large intestine was removed, opened longitudinally, and gently rinsed with 0.9% saline to remove residual bowel contents, and the colon length was then measured (cm). At week 7, distal colon samples (1-2 cm) were collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for biochemical analysis. Other distal colon specimens were in methacarn solution (60% methanol, 30% chloroform, and 10% acetic acid) for 12 h (4°C), transferred to 70% alcohol, and embedded in paraffin. At week 37, the colon was removed and the whole sample was fixed flat in 10% formalin solution for 24h, and transferred to 70% alcohol for ACF analysis. Distal colon were sampled as they display a higher DMH-induced DNA adduct higher incidence of (pre)neoplastic alterations than middle/proximal colon (James et al., 1983).

2.2 Comet assay

Peripheral blood samples from the retroorbital plexus were obtained 4h after the last DMH administration (week 7) for alkaline single-cell gel electrophoresis assay (Sasaki et al., 1998). Blood samples were mixed with low-melting point agarose (100 µl 0.75% in PBS, Invitrogen), spread on slides pre-coated with normal point agarose (1.5% in PBS, Invitrogen), and coverslipped. Following agarose solidification (4°C for 5 min), coverslips were carefully removed, and slides were incubated with cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) overnight, at 4°C. Subsequently, the slides were immersed in fresh cold alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH > 13) for 20 min. Electrophoresis was conducted for 20 min at 1 V/cm (300 mA). The slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), dehydrated in 100% ethanol, and stained with SYBR Gold solution (1:10000) (Invitrogen, USA). Fifty randomly selected nucleoids were counted per slide (duplicate) in an epi-fluorescence microscope (Olympus BX-50, Japan) using Comet Assay IV software (Perceptive Instruments, UK). Tail intensity (% of DNA in comet tail) was calculated.

2.3 ACF screening

Flat-fixed colon specimens were stained with 1% methylene blue solution and topographically evaluated for FCA occurrence, considering that these lesions feature larger, darker, thicker, and “slit-like” crypts (Bird, 1987). Then, the ACF number/cm² (mean number of ACF per colon length), aberrant crypt (AC)/cm² (mean number of AC per colon length), and ACF multiplicity (mean number of AC per ACF) were calculated for each group (Bird, 1987).

2.4 Immunohistochemistry

Distal colon sections (5 µm) were subjected to antigen retrieval in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0, 5 min., 120°C) in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation, Denmark). Following endogenous peroxidase blockade with 10% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) (15 min), the slides were treated with skim milk (60 min) and incubated with primary antibodies directed against Ki-67 (*i.e.*, cell proliferation, MA5-14520, 1:100 dilution, Thermo Fisher, USA), cleaved caspase-3 (*i.e.*, apoptosis, PA577887, 1:50 dilution, Thermo Fisher, EUA), phosphorylated-H2AX (*i.e.*, DNA damage marker, MA5-27753, 1:200, Thermo Scientific) or β-catenin (ab32572, E247, 1:400 dilution, Abcam, UK) in a humidified chamber (overnight, 4°C). Slides were incubated with a one-step horseradish peroxidase polymer (EasyPath - Erviegas, Brazil) (20 min). The reaction was visualized with 3-diaminobenzidine (DAB) chromogen (Sigma Aldrich, USA), and counterstain with Harris' hematoxylin. Semiquantitative analysis for Ki-67, cleaved caspase-3, and H2AX were calculated in 15 randomly selected crypts/animal/section (distal colon). Both positive and negative epithelial cells were counted, and results were expressed as the percentage (%) of Ki-67+, cleaved caspase-3+, or H2AX+ positive cells per crypt. The analyses were performed by using Image J software (National Institutes of Health, USA).

2.5 Biochemical analysis

Total proteins were extracted from 50-100 mg of distal colon samples in KCl buffer (1.15%) and were quantified by Bradford's method. Total proteins were used to determine malondialdehyde (MDA) levels (Buege & Aust, 1978), and activities of superoxide dismutase (SOD) (Marklund & Marklund, 1974) and catalase (Bergmeyer, 1974). For MDA, the proteins were precipitated in a 10% trichloroacetic acid solution, centrifuged (3000×g, for 5 min.) and the supernatant will be removed. Thiobarbituric acid (TBA) was added in a proportion of 0.67% (1:1) and the samples were heated to 100°C (15 min.). MDA reacted with TBA in a 1:2 ratio (MDA:TBA). SOD activity was measured based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol. The catalase activity was determined in a 30% H₂O₂ PBS solution. Absorbance was measured at 535 (MDA), 420 (SOD), or 240 (catalase) nm in a microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA).

2.6 Statistical analysis

Pairwise comparisons were evaluated by Student *t* test. Other data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis and *a posteriori* Tukey test. Data presentation and the number of replicates are detailed in the footnotes and captions. The aforementioned analyses were performed on Prism GraphPad software (V4.03, GraphPad Software, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 General findings

In the present investigation, genetically ablated Panx1 mice were used since these animals are functional knockouts that express a truncated form of active Panx1 subunits (Dvorianchikova et al., 2012). This model is considered a useful tool for biomedical research, including the investigation of Panx1 roles

on gastrointestinal diseases (Hanstein et al., 2013; Willebrords et al., 2018; Crespo Yanguas et al., 2018). At week 7, groups showed no significant differences on initial and final body weights, absolute and relative liver weights (**Table 1**). At week 37, Panx1^{-/-} animals exposed to DMH had decreased final body weight compared to Saline counterparts ($p = 0.0021$), but no difference was observed between WT or Panx1^{-/-} DMH treated animals. However, absolute and relative liver weights of Panx1^{-/-} animals exposed to DMH were statistically decreased compared to all groups ($p < 0.0001$, for both) (**Table 1**). As diminished body and liver weights are known effects of DMH upon multiple administrations (Ali et al., 2019; Hori et al., 2020), the findings indicate that Panx1 knockout may predispose mice to these deleterious toxicological outcomes. This result contrasts with other findings in the literature, which report that inhibition or genetic deletion of Panx1 hemichannels can alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity or play a protective role in acute liver failure and non-alcoholic steatohepatitis, respectively (Maes et al., 2017; Willebrords et al., 2018). In contrast, saline-treated Panx1^{-/-} animals showed no alterations compared to WT counterparts, demonstrating that the inhibition of this protein itself does not influence these parameters and the observed effects are linked to DMH. Animals presented similar diet intake in both timepoints analyzed (data not shown).

3.2 Panx1 knockout promotes carcinogen-induced peripheral blood genotoxicity and oxidative stress in the colon at week 7

It is well established that DMH is an alkylating colon-specific complete procarcinogen, acting after liver metabolism, which generates methyl diazonium, methyl ions and other reactive species that can reach the colon via bloodstream (Perse & Cerar, 2011). In the colon, DMH metabolites alkylate colonocytes, “initiating” them for carcinogenesis (James et al., 1983; Perse & Cerar, 2011). Four hours after the last carcinogen administration, we observed that Panx1 ablation increased the DMH-induced genotoxicity in nucleated peripheral blood cells, as inferred by comet assay ($p < 0.0001$) (**Figure 2A**), in line with the liver weight data, where the Panx1 knockout may contribute to DMH effects. However, this

effect was not observed in situ, eight hours after the last carcinogen administration, where the Panx1 deletion exerted no alterations in the DMH-mediated increase of H2AX positive colonocytes - an indicator of double-strand DNA breaks (Mah et al., 2010) - (**Figure 3A**).

Furthermore, other secondary reactive metabolites may also be generated as DMH-derived radicals react with membrane lipids, as MDA, which is a known marker of oxidative stress/lipid peroxidation (Ayala et al., 2014; Caetano et al., 2020). The Panx1 knockout resulted in higher DMH-induced MDA levels in the colon ($p = 0.035$) (**Figure 2B**), which is not only implicated on forming DNA adducts, but it may also cause direct cytotoxicity and cell death (Ayala et al., 2014). Despite this result, the SOD and catalase activities remained unaltered by Panx1 genetic ablation (**Figure 2B**). The increase in lipid peroxidation is clearly implicated on CC pathogenesis, demonstrating once again the action of Panx1 during this process (Skrzydowska et al., 2005; Lei et al., 2021). Yet, it is important to point out that Panx1 hemichannels and oxidative stress have an intimate bidirectional relationship. Reactive species may negatively regulate these hemichannels activity, by nitric oxide (NO)-induced structural modification of Panx1 protein, inhibiting the Panx1 hemichannel in human embryonic kidney cells (Poornima et al., 2015). On the other hand, the Panx1-mediated ATP release may activate P2Y/P2X receptors, and subsequent G proteins, triggering the accumulation of NADPH oxidases-generated reactive species in gingival epithelial cells (Hung et al., 2013).

The in situ investigation revealed the increase in cleaved caspase-3 immunolabeling index in the colonic crypts of DMH-exposure Panx1^{-/-} mice ($p = 0.0002$) (**Figure 3B**), which is in accordance to the higher MDA levels in the colon, but no statistical difference was identified between the groups about the proliferation of colonocytes (Ki67) (**Figure 3C**). Other works have linked Panx1 with apoptosis, but contrary to our results, the inhibition of Panx1 hemichannels reduced caspase-3/7 activity in enteric glial cells, where its involvement in cell death through P2X7 receptors was postulated (Loureiro et al., 2022). Similar results were observed in other contexts, according to the cell death signaling role played by Panx1 hemichannels (Chekeni et al., 2010; Huang et al., 2020). Although our results may contrast to the

literature, suggesting that the absence of Panx1 promotes DMH-induced cell death by other mechanisms, most of the available findings mechanistically linking Panx1 and oxidative stress are restricted to *in vitro* bioassays in physiological contexts. Thus, further molecular investigations in the colon carcinogenesis context are necessary.

3.3 Panx1 knockout increases preneoplastic ACF burden at week 37

Thirty weeks after the last carcinogen administration, Panx1^{-/-} animals showed increased ACF ($p = 0.0039$), AC ($p = 0.026$) and ACF multiplicity ($p = 0.005$) by 56%, 57% and 20%, respectively, compared to the WT counterpart (**Figure 4**). Representative microscopic overview of these lesions were observed in hematoxylin and eosin (HE)-stained sections (**Figure 5**). In both preclinical and clinical investigations, the occurrence of ACF is positively correlated with colon tumorigenesis, classified as the earliest morphological manifestation of colon carcinogenesis (Wargovich et al., 2010; Clapper et al., 2020). The promotion of oxidative stress by Panx1 ablation at week 7 is proposed to be partly involved to the enhanced ACF burden at this moment, although other predisposing mechanisms should be considered regardless of carcinogen-related ones. Altogether, our findings indicate that Panx1 knockout may promote the early stages of DMH-induced colon carcinogenesis. However, it is noteworthy that preneoplastic stages, such as ACF, are usually underappreciated in the available bioassays, and Panx1 (and hemichannels) outcomes as tumor promoter or suppressor protein, should consider late stages of the disease and others tumor types. Considering that saline-treated Panx1 ablated mice did not developed ACF, and did not spontaneously develop tumors in previous assays (Laird & Penuela, 2021), the suppressive role of this protein in colon carcinogenesis should not be overestimated as well.

In certain way, our findings are in line with Derangère et al. (2014), that proposed a tumor suppressor role of Panx1 for its participation on a pyroptosis mechanism of CC cells, induced by LXR β /Panx1/NLRP3/caspase-1-pathway (Derangère et al., 2014). Thus, the relevance of this Panx1-dependent mechanism should be further investigated in future studies of chemically-induced colon

carcinogenesis. However, the attenuation of Panx1 does not have a common outcome in all cancers, such that microRNA-mediated Panx1 downregulation is proposed as a chemotherapy resistance mechanism in human oral cancer cells, by negatively interfering in the ATP release involved on chemotherapy-induced tumor cell apoptosis (Yokoyama et al., 2021). The relationship between Panx1 and chemotherapeutic agents was also evaluated in oxaliplatin-sensitive HT-29 human CC cells. In this context, it was demonstrated that both Panx1 and P2X7 receptors are involved in the therapeutic effects of oxaliplatin, and the inhibition of these structures was able to reduce cell mortality caused by the drug (Mannelli et al., 2015). Recent studies have reported that high Panx1 expression enables survival advantages to tumors, increasing their potential for progression, in human tumors and several tumor-derived cell lines (Shi et al., 2019; Jalaeddine et al., 2019; Bao et al., 2021; Laird & Penuela, 2021; Ying et al., 2021).

4. Conclusion

The findings of this investigation indicate that Panx1 knockout contributes to the early events of chemically induced colorectal carcinogenesis. However, is necessary to further investigated into late stages of CC to assign Panx1 the role of a tumor suppressor protein in colon.

5. Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

6. Funding

Bruno Cogliati was the recipient of support research from the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #2018/10953-9, and #2022/02175-1). Sara Gomes Espírito Santo was the recipient of a regular scholarship, and an international exchange program fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES-PRINT). This study was financed in part by CAPES - Finance Code 001. The funders did not influence the writing and interpretation of data.

Parameters/Groups	Saline		DMH		p value
	WT	Panx1 ^{-/-}	WT	Panx1 ^{-/-}	
Weeks 0-7					
n	6	6	6	6	
Initial body weight (g)	18.10 ± 1.26	17.80 ± 0.61	17.85 ± 0.51	17.55 ± 0.95	0.76
Final body weight (g)	19.48 ± 0.63	19.17 ± 0.86	20.83 ± 1.03	20.33 ± 0.78	0.51
Absolute liver weight (g)	0.97 ± 0.10	1.05 ± 0.08	0.92 ± 0.11	1.05 ± 0.09	0.07
Relative liver weight (%)	4.36 ± 0.30	4.90 ± 0.27	4.75 ± 0.23	5.18 ± 0.49	0.055
Colon length (cm)	10.00 ± 0.56	9.66 ± 0.51	10.31 ± 0.76	9.17 ± 1.25	0.13
Weeks 0-37					
n	12	12	12	12	
Initial body weight (g)	17.30 ± 0.92	17.33 ± 1.22	18.26 ± 0.69	17.96 ± 1.72	0.15
Final body weight (g)	24.16 ± 2.65 ab	25.65 ± 2.09 a	23.50 ± 2.53 ab	22.03 ± 1.03 b	0.0021
Absolute liver weight (g)	1.07 ± 0.19 a	1.07 ± 0.14 a	0.95 ± 0.14 a	0.73 ± 0.15 b	<0.0001
Relative liver weight (%)	4.68 ± 0.60 a	4.20 ± 0.39 ab	4.03 ± 0.38 b	3.32 ± 0.68 c	<0.0001
Colon length (cm)	9.95 ± 1.05	9.50 ± 0.95	9.93 ± 0.97	9.59 ± 0.63	0.51

Table 1. Implications of Pannexin 1 knockout on body weight, liver weight, and colon length during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis.

WT: wild-type. n = number of mice/group/genotype. Data are presented as mean + standard deviation. Different letters correspond to statistical difference among groups by one-way ANOVA and *a posteriori* Tukey test (p<0.05).

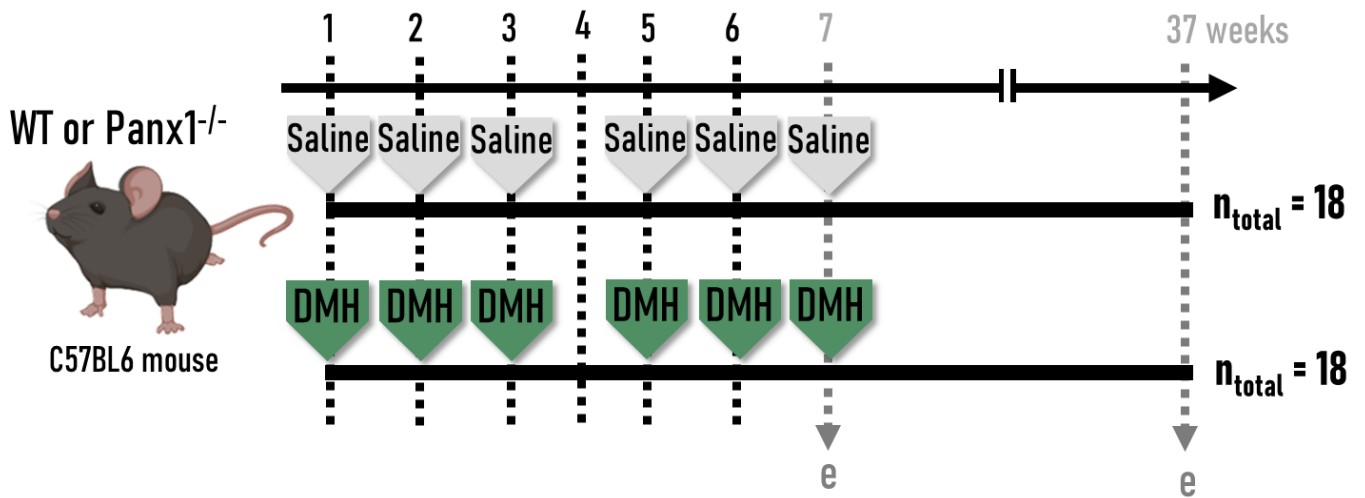


Figure 1. Experimental design. Saline: 1×NaCl 0.9% i.p. administration; DMH: 1×20 mg/kg/b.wt. i.p. administration; e: euthanasia; n_{total}: total number of mice per genotype.

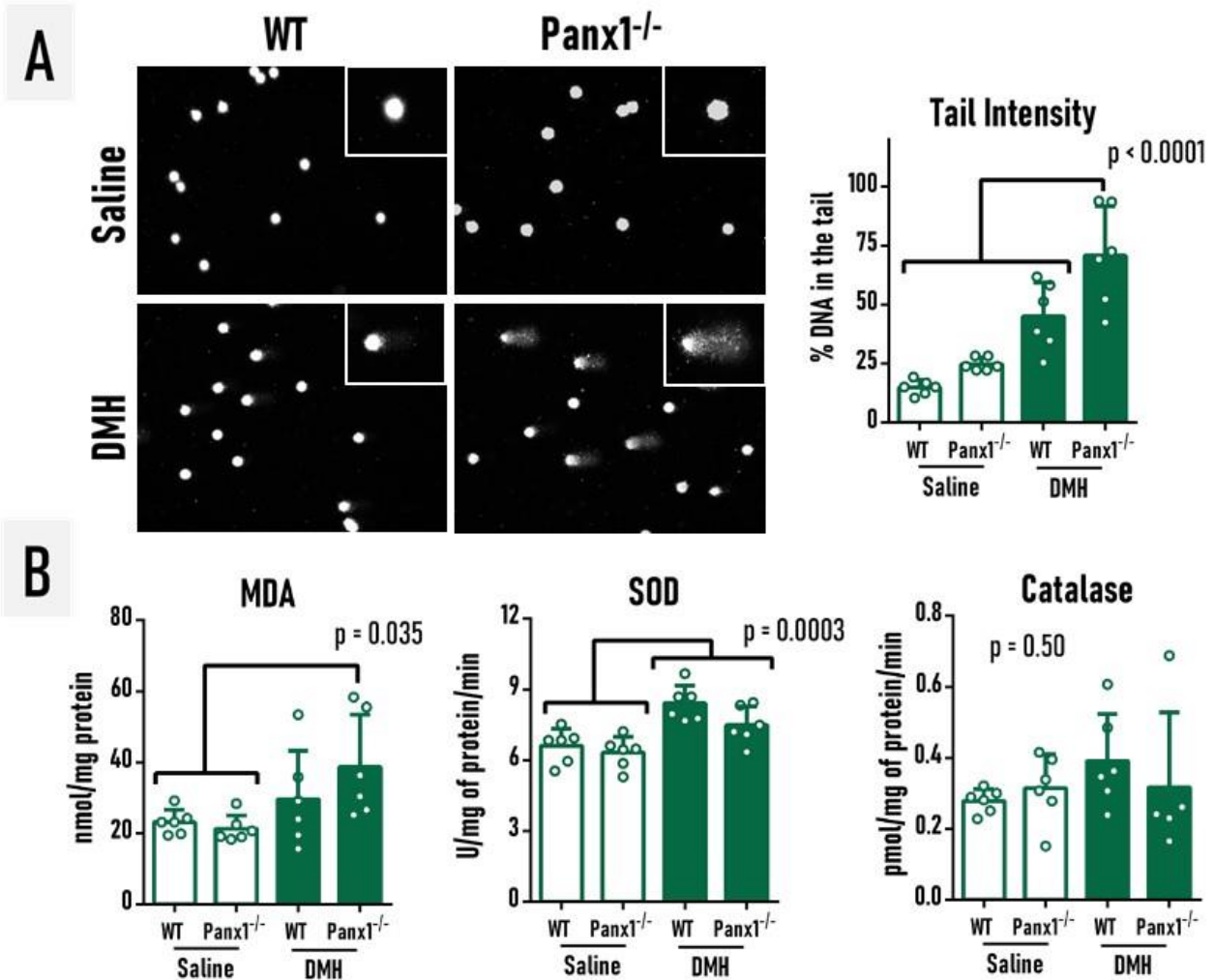


Figure 2. Effects of pannexin 1 knockout (*Panx1*^{-/-}) on (A) peripheral blood genotoxicity, (B) malondialdehyde (MDA) levels and antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase activities in the colon during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in mice at week 7. WT: wild-type. n = 6 mice/group/genotype. Data are presented as mean + standard deviation, and data points. Data were analyzed by one-way ANOVA and a *posteriori* Tukey test ($p < 0.05$).

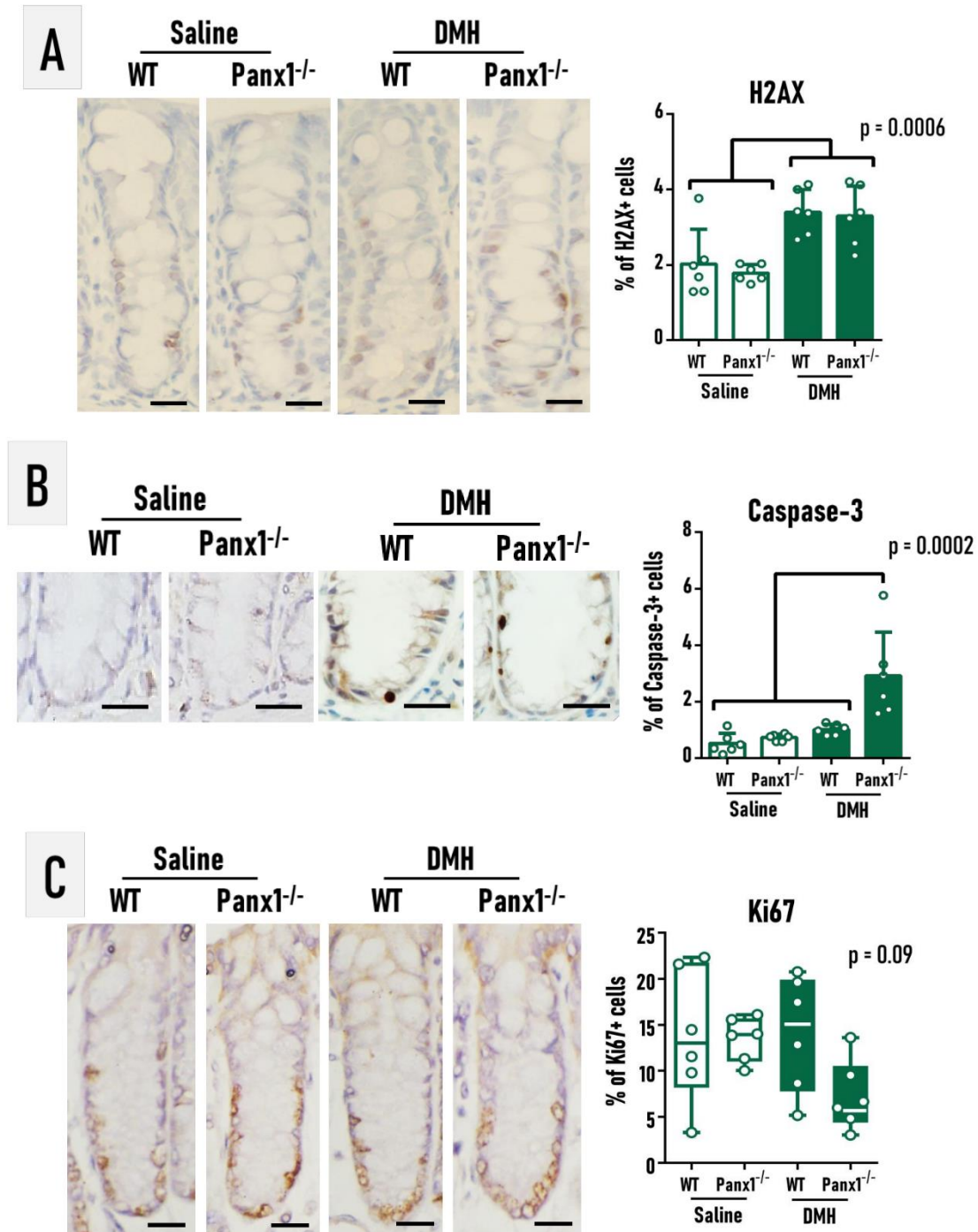


Figure 3. Effects of pannexin 1 knockout (Panx1^{-/-}) on (A) colonocyte genotoxicity (H2AX), (B) crypt apoptosis (caspase-3), and (C) proliferation (Ki67) during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in mice at week 7. Representative microscopic overviews (scale bar: 10 μ m) show that H2AX and Ki67 labelling comprised top, middle and/or bottom crypt compartments, while caspase-3 was restricted to bottom crypt compartment. WT: wild-type. n = 6 mice/group/genotype. Data are presented as mean + standard deviation or box plots, and data points. Data were analyzed by one-way ANOVA (H2AX and caspase-3) or Kruskal-Wallis (Ki-67) and *a posteriori* Tukey test ($p < 0.05$).

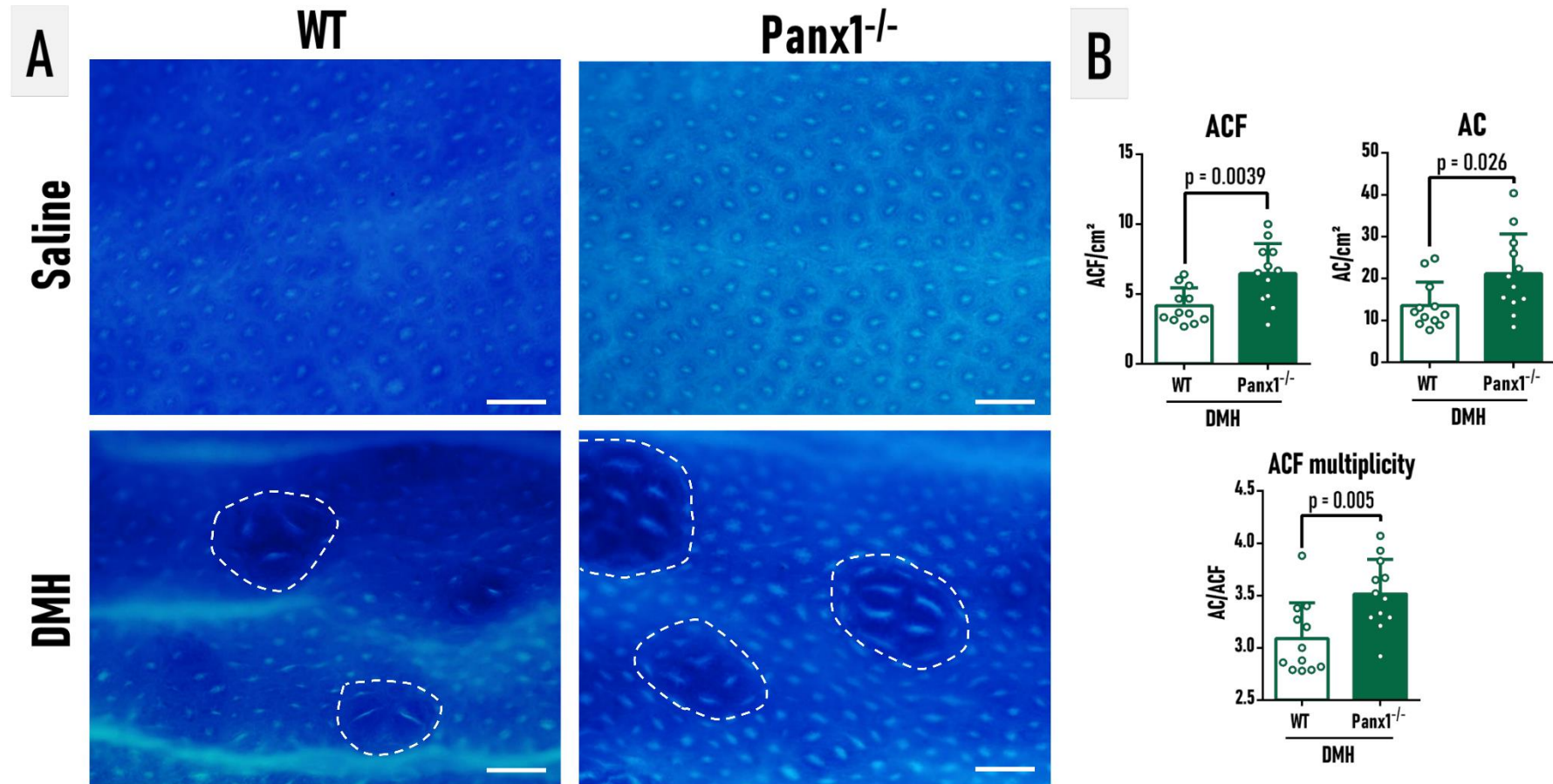


Figure 4. Effects of pannexin 1 knockout (Panx1^{-/-}) on aberrant crypt foci (ACF) burden during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in mice at week 37. (A) Representative photomicrographs of a whole mount of colon specimens stained with methylene blue (scale bar: 100μm) - depicting the absence (non-initiated) or the occurrence of ACF (DMH-initiated mouse) (dotted lines). **(B)** ACF, aberrant crypt (AC), and ACF multiplicity (AC/ACF) data in both genotypes. n = 12 mice/group/genotype. WT: wild type. Data are presented as mean + standard deviation, and data points. Data were analyzed by Student *t*-test ($p < 0.05$).

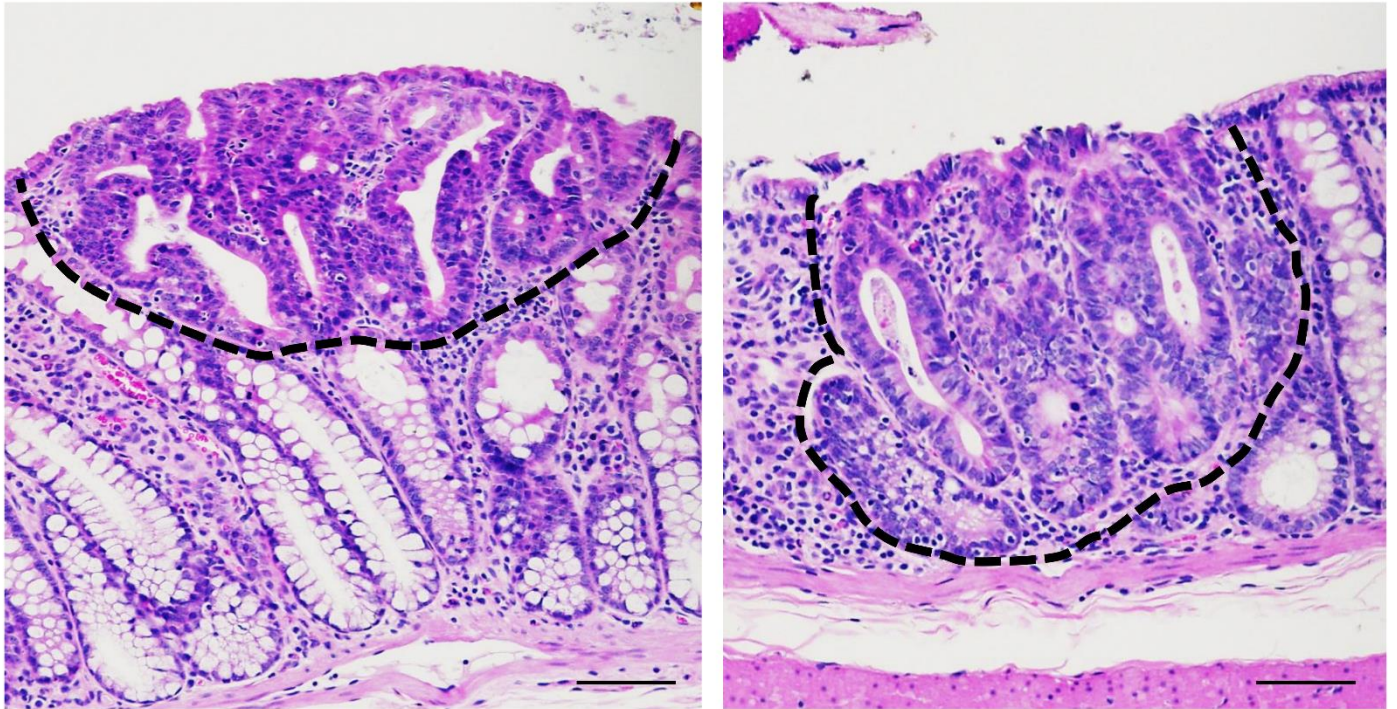


Figure 5. Aberrant crypt foci (ACF). Representative photomicrographs of dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci (ACF) – featuring dysplastic phenotype - in hematoxylin and eosin (HE)-stained sections (dotted lines, scale bar: 50 μ m).

7. References

- Ali MS, Hussein RM, Gaber Y, et al (2019) Modulation of JNK-1/ β -catenin signaling by: *Lactobacillus casei*, inulin and their combination in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *RSC Adv* 9:29368–29383. <https://doi.org/10.1039/c9ra04388h>
- Amadeu SO, Sarmiento-Machado LM, Bartolomeu AR, et al (2022) *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* feeding reduces the early stage of chemically induced rat colon carcinogenesis. *Br J Nutr* 1-11. <https://doi.org/10.1017/s0007114522001350>
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bao L, Sun K, Zhang X (2021) PANX1 is a potential prognostic biomarker associated with immune infiltration in pancreatic adenocarcinoma: A pan-cancer analysis. *Channels* 15:680–696. <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.2004758>
- Baranova A, Dmitry I, Petrash N, et al (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83:706-716. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025>
- Bergmeyer HU (1974) *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed.; Academic Press, New York.
- Bird RP (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37:147–151.
- Bird RP (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93:55-71. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03788-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03788-X)
- Bird RP, Good CK (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)
- Buege, JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol.* 52:302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Caetano BFR, Tablas MB, Romualdo GR, et al (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>
- Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, et al (2010) Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467:863-867. <https://doi.org/10.1038/nature09413>
- Clapper ML, Chang WCL, Cooper HS (2020) Dysplastic aberrant crypt foci: Biomarkers of early colorectal neoplasia and response to preventive intervention. *Cancer Prev Res* 13:229–239. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0316>

- Crespo Yanguas S, da Silva TC, Pereira IVA, et al (2018) Genetic ablation of pannexin1 counteracts liver fibrosis in a chemical, but not in a surgical mouse model. Arch Toxicol 92:2607–2627. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2255-3>
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, et al (2009) Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? Bioessays 31:953-974. <https://doi.org/10.1002/bies.200800236>
- Derangère V, Chevriaux A, Courtaut F, et al (2014) Liver X receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. Cell Death Differ 21:1914-1924. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.117>
- Diezmos EF, Markus I, Perera DS, et al (2018) Blockade of pannexin-1 channels and purinergic P2X7 receptors shows protective effects against cytokines-induced colitis of human colonic mucosa. Front Pharmacol 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00865>
- Diezmos EF, Sandow SL, Markus I, et al (2013) Expression and localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. Neurogastroenterol Motil. 25:e395-e405. <https://doi.org/10.1111/nmo.12130>
- Douaiher J, Ravipati A, Grams B, et al (2017) Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. J Surg Oncol 115:619-630. <https://doi.org/10.1002/jso.24578>
- Draganov D, Gopalakrishna-Pillai S, Chen Y, et al (2015) Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. Sci Rep 5:16222. <https://doi.org/10.1038/srep16222>
- Dvorianchikova G, Ivanov D, Barakat D, et al (2012) Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. PLoS One 7:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031991>
- Fearon ER, Vogelstein BA (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 6:759-767.
- Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al (2017) Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nat Rev Immunol 17:91-111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
- Goodarzi E, Beiranvand R, Naemi H, et al (2020) Worldwide incidence and mortality of bladder cancer and human development index: an ecological study. Indian J Gastroenterol 11:88.
- Hanstein R, Negoro H, Patel NK, et al (2013) Promises and pitfalls of a Pannexin1 transgenic mouse line. Front Pharmacol 4 MAY:1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00061>
- Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, et al (2020) Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen 849:503130. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.503130>
- Huang G, Bao J, Shao X, et al (2020) Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. Life Sci 254:117791. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117791>

- Hung SC, Choi CH, Said-Sadier N, et al (2013) P2X4 Assembles with P2X7 and Pannexin-1 in Gingival Epithelial Cells and Modulates ATP-induced Reactive Oxygen Species Production and Inflammasome Activation. PLoS One 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070210>
- Ijiri, K (1989) Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, and gamma-rays. Cancer Res. 49:6342-6346.
- Jalaeddine N, El-Hajjar L, Dakik H, et al (2019) Pannexin1 is associated with enhanced epithelial-to-mesenchymal transition in human patient breast cancer tissues and in breast cancer cell lines. Cancers (Basel) 11:1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers11121967>
- Jalaeddine N, El-Hajjar L, Dakik H, et al (2019) Pannexin1 is associated with enhanced epithelial-to-mesenchymal transition in human patient breast cancer tissues and in breast cancer cell lines. Cancers (Basel) 11:1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers11121967>
- Ying W, Zheng K, Wu Y, Wang O (2021) Pannexin 1 Mediates Gastric Cancer Cell Epithelial–Mesenchymal Transition via Aquaporin 5. Biol Pharm Bull 44:1111–1119. <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00292>
- James JT, Shamsuddin AM, Trump BF (1983) Comparative study of the morphologic, histochemical, and proliferative changes induced in the large intestine of ICR/Ha and C57BL/Ha mice by 1,2-dimethylhydrazine. J Natl Cancer Inst. 71:955-964.
- 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>
- Laird DW, Penuela S (2021) Pannexin biology and emerging linkages to cancer. Trends in Cancer 7:1119–1131. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.07.002>
- Lei L, Zhang J, Decker EA, Zhang G (2021) Roles of Lipid Peroxidation-Derived Electrophiles in Pathogenesis of Colonic Inflammation and Colon Cancer. Front Cell Dev Biol 9:. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665591>
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, et al (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. Br J Surg 89:845-860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x>
- Lopez-Ceron M, Pellise M (2012) Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. Colorectal Dis 14:e157-64. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02925.x>
- Loureiro AV, Moura-Neto LI, Martins CS, et al (2022) Role of pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by Clostridioides difficile toxins in enteric glia. Front Immunol 13:956340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956340>.
- Maes M, McGill MR, Silva TC, et al (2017) Inhibition of pannexin1 channels alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity. Arch Toxicol. 91:2245-2261. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1885-6>
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010) γH2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. Leukemia 24:679–686

- Mannelli LDC, Marcoli M, Micheli L, et al (2015) Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin-1. *Neuropharmacology* 97:133-141. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.037>.
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient 628 assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47:469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Mello PA, Bian S, Savio LEB, et al (2017) Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. *Oncotarget* 8:67254-67268. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18595>
- Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, et al (2018) Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signal* 14:459-469. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9630-7>
- Nassar D, Blanpain C (2016) Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol* 11:47-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, et al (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473-474. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00576-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00576-5)
- Perše M, Cerar A (2011) Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011:. <https://doi.org/10.1155/2011/473964>
- Peters MA, Teramoto T, White JQ, et al (2007) A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol* 17:1601-1608. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.031>
- Poornima V, Vallabhaneni S, Mukhopadhyay M, Bera AK (2015) Nitric oxide inhibits the pannexin 1 channel through a cGMP-PKG dependent pathway. *Nitric Oxide - Biol Chem* 47:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.04.005>
- Qu R, Dong L, Zhang J, et al (2020) Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. *Cell Res* 30:446-468. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0298-5>
- Richards TC (1977) Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 37:1680–1685.
- Roncucci L, Stamp D, Medline A, et al (1991) Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 22:287-294. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(91\)90163-j](https://doi.org/10.1016/0046-8177(91)90163-j)
- Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, et al (1998) Organ-specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: difference between intraperitoneal and oral administration. *Mutat Res.* 415: 1–12.

- Sayedyahosseini S, Huang K, Li Z, et al (2021) Pannexin 1 binds β -catenin to modulate melanoma cell growth and metabolism. *J Biol Chem* 296:100478. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100478>
- Sayedyahosseini S, Huang K, Li Z, et al (2021) Pannexin 1 binds β -catenin to modulate melanoma cell growth and metabolism. *J Biol Chem* 296:100478. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100478>
- Shi G, Liu C, Yang Y, et al (2019) Panx1 promotes invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *J Cancer* 10:5681–5688. <https://doi.org/10.7150/jca.32986>
- Shi G, Liu C, Yang Y, et al (2019) Panx1 promotes invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *J Cancer* 10:5681–5688. <https://doi.org/10.7150/jca.32986>
- Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, et al (2005) Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 11:403–406. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i3.403>
- Stopera SA, Bird RP (1993) Immunohistochemical demonstration of mutant p53 tumour suppressor gene product in aberrant crypt foci. *Cytobios* 73:73–88.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Vultaggio-Poma V, Sarti AC, Di Virgillio F (2020) Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells* 9:2496. <https://doi.org/10.3390/cells9112496>
- Wargovich MJ, Brown VR, Morris J (2010) Aberrant crypt foci: The case for inclusion as a biomarker for colon cancer. *Cancers (Basel)* 2:1705–1716. <https://doi.org/10.3390/cancers2031705>
- Willebrords J, Maes M, Pereira IVA, et al (2018) Protective effect of genetic deletion of pannexin1 in experimental mouse models of acute and chronic liver disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1864:819–830. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.013>
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y (2000) Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* 60:3323–3327.
- Ying W, Zheng K, Wu Y, Wang O (2021) Pannexin 1 Mediates Gastric Cancer Cell Epithelial–Mesenchymal Transition via Aquaporin 5. *Biol Pharm Bull* 44:1111–1119. <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00292>
- Yokoyama S, Shigeishi H, Murodumi H, et al (2021) Effects of miR-224-5p-enhanced downregulation of pannexin-1 on docetaxel-induced apoptosis in amoeboid-like CD44^{high} oral cancer cells. *Eur J Oral* 129:e12812. <https://doi.org/10.1016/10.1111/eos.12812>

Conclusões Gerais e Perspectivas

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desse trabalho apontam uma relação interessante para a Cx43 e Panx1 na carcinogênese colorretal. A inibição parcial da Cx43 não promoveu alterações quanto aos efeitos agudos do DMH tanto no dano ao DNA sistêmico ou in situ, quanto nos níveis de apoptose nas criptas colônicas. Já a longo prazo, os animais geneticamente modificados apresentaram aumento da multiplicidade de FCA, mas nenhuma alteração foi identificada em adenomas colorretais (ACR) nos mais variados parâmetros, como incidência, multiplicidade, volume, proliferação, crescimento e imunexpressão da β -catenina. Similar a esses achados, a expressão de mRNA de Cx43 esteve reduzida em ACR humanos, mas nenhuma correlação foi identificada quanto a esse mRNA e outros marcadores de proliferação, apoptose e β -catenina. A investigação da inibição total da Panx1 aos efeitos agudos do DMH (em 7 semanas), revelou o aumento da genotoxicidade induzida pelo carcinógeno a nível sistêmico, dos níveis de malondialdeído no cólon e da apoptose nas criptas colônicas. Após 30 semanas, o bloqueio da Panx1 aumentou o número de CA (57%), a média (57%) e a multiplicidade (CA por FCA – 20%) de FCA. Com tudo, esses resultados indicam um papel discreto da Cx43 nos estágios iniciais da carcinogênese de cólon quimicamente induzida em camundongos, e a promoção desses processos e de lesões pré-neoplásicas através da deleção da Panx1.

O estudo dos hemicanais de Cx43 e Panx1 é recente, e a realização desse trabalho contribuiu para ampliar a bagagem de conhecimentos disponíveis sobre essas proteínas no cólon normal e nos estágios iniciais de sua carcinogênese, campo que até então permanece pouco compreendido. Visto a complexidade dos processos envolvidos na carcinogênese colorretal e o estudo apenas dos estágios iniciais dessa neoplasia, seria necessário aprofundar as investigações quanto ao papel da Cx43 e da Panx1 nesse contexto para atribuir propriedades antitumorais a essas proteínas. Com isso, esse estudo pode servir como base ou direcionador para futuras investigações, visto a necessidade de compreender a relação da Cx43 e Panx1 não apenas no CCR, mas em diversos sítios de câncer, permanecendo como um importante campo de investigações.

Atividades acadêmicas (2021 – 2023)

- Internacionalização:

Capacitação em cultura de células tronco tumorais durante um mês na Universidade de Granada (Espanha) (bolsista CAPES-PrInt, 88887.71672/2022-00), fevereiro de 2023.

- Congressos:

Participação como ouvinte do XXI Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, julho de 2022.

Apresentação do trabalho “In vivo and In silico findings on the role of connexin 43 during colon carcinogenesis” no XXI Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, julho de 2022.

- Aula:

Ministração aula teórico-prática de eletroforese em gel de célula única (teste do cometa) na disciplina de técnicas especiais aplicadas ao estudo em patologia junto ao Programa de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, maio de 2022.

- Artigos publicados:

SANTO, SARA GOMES ESPÍRITO; MONTE, MARINA GAIATO; POLEGATO, BERTHA FURLAN; BARBISAN, LUÍS FERNANDO; ROMUALDO, GUILHERME RIBEIRO. Protective effects of ômega-3 supplementation against doxorubicin-induced deleterious effects on the liver and kidneys of rats. MOLECULES, 28, 3004, março de 2023.

SANTO, SARA GOMES ESPÍRITO; DA SILVA, TEREZA CRISTINA; VINKEN, MATHIEU; COGLIATI, BRUNO; BARBISAN, LUÍS FERNANDO; ROMUALDO, GUILHERME RIBEIRO. The Implications of Connexin 43 Deficiency during the Early Stages of Chemically Induced Mouse Colon Carcinogenesis. ANTIOXIDANTS, v. 11, p. 2368, novembro de 2022.

SANTO, SARA GOMES ESPÍRITO; ROMUALDO, GUILHERME RIBEIRO; SANTOS, LEANDRO ALVES DOS; GRASSI, TONY FERNANDO; BARBISAN, LUÍS FERNANDO. Modifying effects of menthol against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in female Swiss mice. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY, v. 1, p. 1-11, novembro de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel da conexina 43 e panexina-1 no processo de carcinogênese química do cólon: análises in vivo e in silico.", protocolada sob o CEUA nº 9569210721 (ID 000260), sob a responsabilidade de **Luis Fernando Barbisan** equipe; *Sara Gomes Espirito Santo; Guilherme Ribeiro Romualdo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 27/08/2021.

We certify that the proposal "The role of connexin 43 and panexin-1 in the process of chemical colon carcinogenesis: in vivo and in silico analyzes.", utilizing 180 Heterogenics mice (180 females), protocol number CEUA 9569210721 (ID 000260), under the responsibility of **Luis Fernando Barbisan** and team; *Sara Gomes Espirito Santo; Guilherme Ribeiro Romualdo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 08/27/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2021](#) a [09/2023](#) Área: [Ciências Biomédicas](#)

Origem: [Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas - USP](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [180](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [16 a 22 g](#)

Local do experimento: Sala de experimentação animal do setor de Anatomia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, usada para estudos com camundongos geneticamente modificados

Botucatu, 27 de agosto de 2021



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



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