



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS**

**MÁRCIO ALENCAR BARREIRA**

**QUIMIOPREVENÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER COLORRETAL  
APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE PTEROSTILBENE E PROBIÓTICO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE INTESTINAL COM 1,2-DIMETIL-  
HIDRAZINA**

**FORTALEZA - CE**

**2023**

MÁRCIO ALENCAR BARREIRA

**QUIMIOPREVENÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER COLORRETAL  
APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE PTEROSTILBENE E PROBIÓTICO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE INTESTINAL COM 1,2-DIMETIL-  
HIDRAZINA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de concentração: comportamento biocelular em neoplasias.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

**FORTALEZA - CE**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B254q Barreira, Márcio Alencar.

Quimioprevenção de lesões precursoras do câncer colorretal após suplementação de pterostilbene e probiótico em modelo experimental de carcinogênese intestinal com 1,2-dimetil-hidrazina / Márcio Alencar Barreira. – 2023.

152 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Coorientação: Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo.

1. Câncer colorretal. 2. Focos de criptas aberrantes. 3. Probióticos. 4. Microbiota intestinal. 5. Carcinogênese. I. Título.

---

CDD 617

MÁRCIO ALENCAR BARREIRA

QUIMIOPREVENÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER COLORRETAL  
APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE PTEROSTILBENE E PROBIÓTICO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE INTESTINAL COM 1,2-DIMETIL-  
HIDRAZINA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor.

Aprovada em: 30/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Ana Paula Bomfim Soares Campelo.  
Centro Universitário Christus

---

Prof. Dr. Federico Vicente Pallardó  
Universidade de Valência

*Aos meus pais, esposa e filhos que são minhas fontes de inspiração, apoio e me fazem uma pessoa mais forte e melhor.*

*A todos os pesquisadores que estudam meios de prevenir ou retardar o aparecimento da neoplasia de colón.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Deus por ter conduzido meus passos até mais uma vitória e ter colocado as pessoas certas no meu caminho.

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos por acreditar no projeto que originou minha tese de doutorado e por contribuir com valiosas sugestões. A sua larga experiência em pesquisa científica contribuiu para a tomada de decisões que influenciaram no desfecho da pesquisa. Agradeço por sua confiança, cumplicidade, paciência, apoio e responsabilidade direta na construção desta tese.

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa ao Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo por acreditar na linha de pesquisa que originou minha tese de doutorado, incentivando o meu egresso no programa de doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas e disponibilizando meios para que o projeto fosse executado. Agradeço a participação de seus alunos de graduação em medicina e o seu empenho para que várias etapas do experimento fossem realizadas no Centro Universitário Christus. Agradeço por sua confiança, cumplicidade e apoio.

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa a amiga Dra. Conceição da Silva Martins (Josy), por sua disponibilidade em me ajudar e pelos pertinentes conselhos dados sempre que a procurei. Obrigado pela paciência na escuta, pelas conversas e experiências compartilhadas, pelos incentivos e pelos momentos passados juntos. Uma pessoa de extrema importância em todas as etapas da análise das amostras coletadas no experimento proposto. Agradeço a Deus por colocá-la no meu caminho.

Meu agradecimento a Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte pelo apoio, disponibilidade e dedicação na análise das lâminas histológicas. Agradeço, também, pela parceria e valiosas sugestões.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca pelo desenvolvimento e controle de qualidade de uma ração para animais de laboratório enriquecida com Pterioestilbene. Agradeço a sua participação, dedicação, apoio e disponibilidade.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá pela participação, apoio e valiosas sugestões. A sua contribuição nas revisões do artigo foi importante para o sucesso da publicação.

Meu agradecimento a Profa. Dra. Ana Paula Bomfim Soares Campelo e ao Prof. Dr. Federico Vicente Pallardó pelo apoio e valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento da tese.

Meu agradecimento a aluna de Doutorado do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará Maria Lucianny Lima Barbosa, por sua participação nas análises de amostras que contribuíram para os resultados desta pesquisa. Agradeço sua amizade, competência e disponibilidade.

Meu agradecimento aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e brilhantes considerações que guiaram a confecção final deste trabalho.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha e Prof. Dr. Marcos Kubrusly pelo apoio da estrutura e funcionários do Centro Universitário Christus. Agradeço a confiança e por incentivar a pesquisa científica.

Meu agradecimento aos acadêmicos de medicina Ana Beatriz Aragão de Vasconcelos, Érica Uchoa Holanda, Raphaela Ribeiro Queiroz, Vitória Jannyne Guimarães de Sousa Araújo, Luiz Eduardo e Victor Hugo. Meu agradecimento ao acadêmico de Biomedicina Gabriel Maia Diniz. Os esforços destas pessoas foram fundamentais para que os meus objetivos fossem alcançados. Agradeço o apoio, dedicação e empenho durante a fase experimental da pesquisa.

Meu agradecimento aos funcionários do Biotério do Centro Universitário Christus pelo empenho, dedicação e apoio durante o período que ocorreu a parte experimental da pesquisa. Agradeço ao supervisor do biotério Emanuel Braz da Silva, ao auxiliar de biotério José Ailton Bráz dos Anjos, a Veterinária Larissa Leão Ferrer de Sousa e a Coordenadora Gabriela Fernandes Oliveira Marques.

Meu agradecimento aos funcionários e alunos do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará pelo apoio durante o período que ocorreram as análises desta pesquisa. Em especial aos técnicos Junior e Flavia que estavam sempre presentes e dispostos a ajudar quando requisitados.

Meu agradecimento aos meus pais, Gentil Barreira de Aguiar e Maria Izeuda Victor de Alencar Barreira, por todo apoio, amor e motivação.

Meu agradecimento a minha esposa, Nadia Fortaleza Chaves Pedrosa Barreira, por todo apoio, amor, paciência e motivação.

Aos meus filhos, Márcio Alencar Barreira Filho e Maria Fortaleza Barreira, minhas fontes de inspiração.

Finalmente, faço questão de agradecer de coração a todas as pessoas que torceram ou intercederam por mim, mesmo que de forma anônima ou discreta.

*Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa*

Albert Einstein

## RESUMO

BARREIRA, M. A. **Quimioprevenção de lesões precursoras do câncer colorretal após suplementação de pterostilbene e probiótico em modelo experimental de carcinogênese intestinal com 1,2-dimetil-hidrazina.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

**Introdução:** A alimentação é o fator ambiental mais relacionado com o desenvolvimento do Câncer Colorretal (CCR) não hereditário. A composição da microbiota intestinal, a inflamação intestinal prolongada e o estresse oxidativo são fatores relacionados ao surgimento do CCR. O Pterostilbene (PS) possui ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. A suplementação de Probiótico (PRO) com *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* é benéfica para a saúde intestinal. O papel da microbiota na metabolização do PS deve ser explorado e a combinação de substâncias pode potencializar a quimioprevenção do CCR. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação de PS e / ou PRO no desenvolvimento de lesões precursoras do CCR em ratos wistar após a indução do CCR com 1,2-DMH. **Método:** Sessenta ratos Wistar machos foram divididos, igualmente, em cinco grupos: Sham, 1,2-DMH, 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO. O PRO ( $5 \times 10^7$  / mL) foi oferecido na água e o PS (300 ppm) na dieta *ad libitum*. 1,2-DMH (20 mg /kg /semana) foi administrado por 15 semanas consecutivas. Na 25<sup>a</sup> semana foi realizada proctocolectomia total. Metade das amostras foram utilizadas para avaliação de focos aberrantes de criptas e expressão das proteínas Ki67,  $\beta$ -catenina, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Na outra metade foi avaliado o stress oxidativo (EO) por meio dos níveis de GSH e MDA. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunns. O nível de significância adotado foi de 0,05. **Resultados:** 1,2-DMH aumenta os focos aberrantes de criptas, expressão das proteínas e EO em relação ao SHAM ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO reduzem scores histopatológicos, expressão das proteínas (Ki67,  $\beta$ -catenina, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e EO (MDA) ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PS + PRO eleva, também, os níveis de GSH ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PS reduz a expressão das proteínas p53, Ki67, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), mas sem diminuir os focos de criptas aberrantes e melhorar o EO. **Conclusão:** A suplementação de PRO e PS + PRO são as melhores estratégias de intervenção para atenuar vários parâmetros da carcinogênese intestinal e lesões precursoras do CCR.

**Palavras-chave:** câncer colorretal; focos de criptas aberrantes; probióticos; microbiota intestinal; carcinogênese.

## ABSTRACT

BARREIRA, M. A. **Chemoprevention of colorectal cancer precursory lesions after pterostilbene and probiotics supplementation in an experimental model of intestinal carcinogenesis with 1,2-dimethyl-hydrazine.** 2023. Thesis (Doctor Degree of Medical-Surgical Sciences) - Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 2023.

**Introduction:** Introduction. Food is the environmental factor most related to the development of non-hereditary Colorectal Cancer (CRC). The composition of the intestinal microbiota, prolonged intestinal inflammation and oxidative stress are factors related to the appearance of CRC. Pterostilbene (PS) has antioxidant, anti-inflammatory and antitumor action. Probiotic (PRO) supplementation with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* is beneficial for intestinal health. The role of the microbiota in PS metabolism should be explored and the combination of substances can potentiate CRC chemoprevention. **Objective:** To evaluate the effect of PS and/or PRO supplementation on the development of CRC precursor lesions in wistar rats after CRC induction with 1,2-DMH. **Methods:** Sixty male Wistar rats were equally divided into five groups: Sham, 1,2-DMH, 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO. PRO ( $5 \times 10^7$  / mL) was offered in water and PS (300 ppm) in the ad libitum diet. 1,2-DMH (20 mg/kg/week) was administered for 15 consecutive weeks. At the 25th week, a proctocolectomy was performed. Half of the samples were used to evaluate histopathological scores (inflammation score, aberrant foci of crypts, macroscopic lesions) and expression of Ki67,  $\beta$ -catenin, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  proteins. In the other half, oxidative stress (OS) was evaluated through levels of GSH and MDA. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Parametric data were evaluated by One-Way ANOVA test of variance followed by Tukey's multiple comparisons test and non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunns' multiple comparisons test. The significance level adopted was 0.05. **Results:** 1,2-DMH increases histopathological scores, protein expression and OS relative to SHAM ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO reduce histopathological scores, protein expression (Ki67,  $\beta$ -catenin, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and OS (MDA) ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PS + PRO also increases GSH levels ( $p < 0.05$ ). 1,2-DMH + PS reduces p53, Ki67, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein expression ( $p < 0.05$ ), but without improvement in histopathological scores and OS. **Conclusions:** PRO and PS + PRO supplementation are the best intervention strategies to attenuate several parameters of intestinal carcinogenesis and CRC precursor lesions.

**Keywords:** colorectal cancer; aberrant crypt foci; probiotics; intestinal microbiota; carcinogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS/SÍMBOLOS

1,2-DMH	-	1,2 - Dimetil-hidrazina
AM	-	Azul de Metileno
AOM	-	Azoximetano
<i>B</i>	-	<i>Bifidobacterium</i>
CAC	-	Carcinogênese Associada à Colite
CCR	-	Câncer Colorretal
CI	-	Carcinogênese Intestinal
COX-2	-	Ciclo-oxigenase-2
DSS	-	Dextrano Sulfato de Sódio
EO	-	Estresse oxidativo
EPM	-	Erro padrão da média
FCA	-	Focos de criptas aberrantes
FOS	-	Frutooligossacarídeos
GSH	-	Glutathiona reduzida
H&E	-	Hematoxilina-eosina
IHQ	-	Imunohistoquímica
iNOS	-	<i>Induced Nitric Oxide Synthase</i>
<i>L</i>	-	<i>Lactobacillus</i>
LM	-	Lesões macroscópicas
MCC	-	Modelo de Carcinogênese Colorretal
MDA	-	Malondialdeído
MI	-	Microbiota Intestinal
ON	-	Oxido Nítrico
p.p.m	-	Partes por milhão
POL	-	Peroxidação Lipídica
PRO	-	Probiótico
PS	-	Pterostilbene
QP	-	Quimioprevenção
ROS	-	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TMA	-	Tissue Microarray
UFC	-	Unidade de Formação de colônias

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Complexo PRO suplementado no experimento .....	42
Figura 2 -	Apresentação farmacêutica do PS em capsulas.....	43
Figura 3 -	Processo de produção da ração com PS .....	44
Figura 4 -	Aplicação subcutânea do carcinogêno 1,2-DMH .....	45
Figura 5 -	Desenho experimental .....	46
Figura 6 -	Produto de proctocolectomia total e seções de cólon coradas com H&E e AM de ratos dos grupos SHAM e 1,2-DMH .....	51
Figura 7 -	Micrografia de seções de cólon coradas com H&E e AM .....	52
Figura 8 -	Histopatologia dos grupos experimentais .....	53
Figura 9 -	Aspecto e quantidade de lesões macroscópicas identificadas no cólon .....	54
Figura 10 -	Número de FCA por campo nos segmentos do cólon de ratos do grupo 1,2-DMH.....	56
Figura 11 -	Análise do dano oxidativo pela mensuração da concentração de MDA e GSH no segmento distal do cólon.....	57
Figura 12 -	Imunoexpressão das proteínas iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$ e IL1 $\beta$ no segmento distal do cólon .....	58
Figura 13 -	Imunoexpressão das proteínas Ki67, P53, $\beta$ -catenina e Wnt-3a no segmento distal do cólon .....	60
Figura 14 -	Relação entre a expressão de proteínas inflamatórias e tumorigênicas no cólon e o desenvolvimento de FCA.....	68
Figura 15 -	Resultado da suplementação de PRO e/ou PS em um modelo experimental de desenvolvimento de CRC com 1,2-DMH .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de tumorações macroscópicas encontradas no espécime cirúrgico .....	54
Tabela 2 - Número de FCA / campo nos segmentos do cólon .....	55
Tabela 3 - <i>Score</i> histopatológico de inflamação nos segmentos do cólon .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	MODELOS PARA INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO CCR	19
1.2	LESÕES HISTOPATOLÓGICAS PRECURSORAS DO CCR	25
1.3	PTEROSTILBENE (PS)	28
1.4	MICROBIOTA E O DESENVOLVIMENTO DO CCR	30
1.5	A MODULAÇÃO DA MI PELA SUPLEMENTAÇÃO DE PRO NO DESENVOLVIMENTO DO CCR	32
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>5</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>41</b>
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	41
5.2	AMBIENTE DA PESQUISA	41
5.3	PERÍODO DO ESTUDO	41
5.4	AMOSTRA	42
5.5	PREPARAÇÃO DA DIETA COM PRO E PS	42
5.6	DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO	45
5.7	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E PREPARO DE AMOSTRAS	46
5.8	VARIÁVEIS ANALISADAS	47
<b>5.8.1</b>	<b>Macroscopia</b>	<b>47</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Microscopia</b>	<b>47</b>
<b>5.8.3</b>	<b>Imunohistoquímica pela Técnica de Tissue Microarray (TMA)</b>	<b>48</b>
<b>5.8.4</b>	<b>Estresse oxidativo</b>	<b>49</b>
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO A - Protocolo da CEUA</b>	<b>117</b>
	<b>APÊNDICE A - Análise de pterostilbeno</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE B - Artigo publicado na Revista Cancers</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICE C - Artigo publicado na Revista Acta Cirúrgica Brasileira</b>	<b>137</b>
	<b>APÊNDICE D - Dados brutos</b>	<b>147</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, estima-se que 19,3 milhões novos casos de câncer e quase 10 milhões de mortes por câncer ocorreram em 2020. O câncer de mama se tornou a neoplasia mais diagnosticada (excluindo neoplasia de pele) com estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido pelo câncer de pulmão (2,2 milhões / 11,4%) e câncer colorretal (CCR) (1,9 milhões / 10,0%). O câncer de pulmão permaneceu a principal causa de morte por câncer, com uma estimativa de 1,8 milhão de mortes (18%), seguido por CCR (0,92 milhões / 9,4%), fígado (0,83 milhões / 8,3%), estômago (0,77 milhões / 7,7%) e mama (0,68 milhões / 6,9%) (SUNG *et al.*, 2021). Nos homens, o CCR representa a terceira neoplasia com maior incidência (atrás da neoplasia de pulmão e próstata) e a quarta neoplasia com maior mortalidade (atrás da neoplasia de pulmão, fígado e estômago). Nas mulheres, o CCR representa a segunda neoplasia com maior incidência (atrás da neoplasia de mama) e a terceira neoplasia com maior mortalidade (atrás de mama e pulmão) (BRAY *et al.*, 2018).

No ano de 2040, o mundo deverá ter 28,4 milhões de pessoas com câncer e um aumento de 47% em relação a 2020. Em geral, a incidência e mortalidade por câncer está crescendo rapidamente em todo o mundo. Existe uma variação de aproximadamente nove vezes nas taxas de incidência de CCR por regiões do mundo, com maior incidência na Europa, Austrália, Nova Zelândia e América do Norte (SUNG *et al.*, 2021). As neoplasias malignas serão a maior causa de morbimortalidade ultrapassando, inclusive, as doenças cardiovasculares. Embora a incidência do câncer ainda seja maior nos países mais ricos, a mortalidade é proporcionalmente maior naqueles menos desenvolvidos. No Brasil, praticamente todos os cânceres apresentam taxas de mortalidade crescentes, com exceção dos cânceres de estômago e de colo do útero que estão com taxas declinantes na maior parte do país, porém ainda elevadas em relação a outras nações (SOARES; MENDES; SAMPAIO, 2021).

Para o Brasil, são esperados 704 mil casos novos de câncer para o triênio 2023-2025. Excetuando o câncer de pele não melanoma, ocorrerão 483 mil casos novos. O câncer de mama feminina e o de próstata foram os mais incidentes com 73 mil e 71 mil casos novos, respectivamente. Em seguida, CCR (45 mil), pulmão (32 mil), estômago (21 mil) e o câncer do colo do útero (17 mil). A análise por gênero mostra que o câncer de próstata é o mais frequente entre os homens (30,0%), seguido do

CCR (9,2%), traqueia, brônquio e pulmão (7,5%), estômago (5,6%) e cavidade oral (4,6%). O câncer de mama feminina é o que mais acomete as mulheres (30,1%) e o CCR é o segundo mais frequente (9,7%) (SANTOS *et al.*, 2023).

A incidência de CCR em pessoas com menos de 50 anos aumentou acentuadamente nos Estados Unidos (CHERNYAVSKIY *et al.*, 2019; LOOMANS-KROPP; UMAR, 2019) e na Europa (VUIK *et al.*, 2019), sendo encontrado em 2% de todos os casos. Apesar de uma baixa porcentagem, representa a quarta causa mais comum de morte provocada por câncer em adultos jovens (TRICOLI *et al.*, 2016). A maioria dos casos ocorre em países desenvolvidos e tem uma relação com o estilo de vida e dieta ocidental (FERLAY *et al.*, 2015). A incidência de câncer aumenta significativamente devido à sobreposição de algumas vias moleculares entre o câncer e o envelhecimento, o qual pode ser modificado por hábitos alimentares. Alguns componentes nutricionais podem ser eficazes na prevenção do CCR (KOCABAS; SANLIER, 2021).

Estudos clínicos mostraram que a metade da população irá desenvolver pelo menos um pólip adenomatoso em sua vida e 2-3% deles vão evoluir para um CCR (LEOZ *et al.*, 2015). Pólipos adenomatosos ou adenomas são considerados os principais precursores para o CCR que ocorre através de uma série gradual de mudanças histológicas que é chamada sequência "adenoma-carcinoma". A mutação do gene supressor de tumor APC é um evento crítico relacionado ao início da sequência "adenoma-carcinoma" (BOSMAN; YAN, 2014; LIU *et al.*, 2013). Os adenocarcinomas espontâneos e associados à colite apresentam uma sequência de eventos moleculares diferente (ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011) que será detalhada adiante.

O CCR é a segunda neoplasia com maior número de mortes potencialmente evitáveis, perdendo para a neoplasia de pulmão. Nos Estados Unidos, cerca de 42,0% das neoplasias diagnosticadas e 45,1% das mortes relacionadas ao câncer foram devido a fatores modificáveis. Estes dados ressaltam o vasto potencial para reduzir a morbidade e mortalidade do câncer através da implementação de medidas preventivas (ISLAMI *et al.*, 2018). A valorização da prevenção primária destinada a reduzir os fatores de risco do CCR pode ser uma estratégia importante (HOSSAIN *et al.*, 2022). Todas as técnicas de triagem do CCR são custo-efetivas e devem ser adotadas (KHALILI *et al.*, 2020), sendo a colonoscopia uma das principais ferramentas na prevenção do CCR (CARR *et al.*, 2020). A colonoscopia tem papel no rastreo,

diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com suspeita ou confirmação de CCR. Embora a colonoscopia supere outros testes não invasivos na detecção do CCR, é um exame invasivo e de maior custo (HSU; CHIU, 2022). A longo prazo, reduções significativas na mortalidade por CCR podem ser alcançados se essas medidas forem implementadas de forma eficaz e com altas taxas de adesão (HOSSAIN *et al.*, 2022).

O rastreio deve iniciar aos 45 anos, pois a detecção precoce do CCR pode reduzir significativamente as taxas de mortalidade e melhorar a qualidade de vida. Infelizmente não há um rastreio desse tipo de câncer que seja oferecido pelo Sistema Único de Saúde e por isso o diagnóstico precoce não ocorre com a frequência esperada. É necessário que sejam desenvolvidas formas de rastreio deste câncer, assim como as realizadas no câncer de mama e de próstata, visto que o CCR pode ser agressivo e possuir altas taxas de mortalidade (MOTA *et al.*, 2021). A adesão ao rastreio é fator determinante de sucesso para atingir os objetivos de redução do número de mortes por CCR. É importante incentivar o diagnóstico precoce e o rastreio do CCR como formas de tratamento oportuno, prevenindo os estágios mais graves da doença. Os avanços tecnológicos e científicos contribuem para a construção de medidas preventivas e terapêuticas cada vez mais eficazes (FELISBERTO *et al.*, 2021; SCANDIUZZI; CAMARGO; ELIAS, 2019).

A progressão de uma lesão precursora para o CCR é um processo de várias etapas, acompanhado por alterações em vários genes supressores que resultam em anormalidades na regulação celular e tem uma história natural de 10 a 15 anos. O período de 10 a 15 anos desse processo oferece uma oportunidade para prevenção primária e secundária (WINAWER, 1999). Uma vantagem da prevenção primária sobre a atual estratégia de prevenção secundária de colonoscopia de rotina é o potencial de intervir precocemente na sequência carcinogênica para reduzir o risco de CCR, permitindo exames de vigilância menos frequentes e uma redução no número de cânceres invasivos.

Há um século, acreditava-se que a dieta não exercia influência primária sobre a ocorrência de câncer, pois pessoas com diferentes hábitos alimentares desenvolviam neoplasias (MORTON, 1917). No ano de 1968, um estudo epidemiológico mostrou associação entre a dieta ocidental e o desenvolvimento do CCR. Acreditava-se que a ingesta maior de gordura poderia alterar a microbiota intestinal (MI) e predispor ao desenvolvimento do CCR (WYNDER; SHIGEMATSU,

1967). Alguns anos após, foi reforçada a teoria que correlacionava a dieta e a flora bacteriana intestinal com o desenvolvimento do CCR (HILL, 1974). Atualmente, sabe-se que a inflamação crônica do intestino grosso relacionada a dieta eleva o risco de CCR (BYRD *et al.*, 2020). Assim, alimentos naturais com propriedades antitumorígenicas são utilizados na investigação de novas substâncias com potencial de prevenir o aparecimento do CCR (GANESAN; JAYACHANDRAN; XU, 2020).

A alimentação é o fator ambiental que apresenta maior relação com o desenvolvimento do CCR não hereditário (ARAUJO; GONÇALVES; MARTEL, 2011). É estimado que milhares de mortes por câncer podem ser prevenidas através de modificações dietéticas (TEIXEIRA *et al.*, 2014; VANO; RODRIGUES; SCHNEIDER, 2009) e até 75% dos casos de CCR estão associados com a alimentação (CHEN *et al.*, 2012). Logo, uma dieta saudável pode modificar alvos moleculares e influenciar na prevenção do CCR (CHEN *et al.*, 2012; RAJAMANICKAM; AGARWAL, 2008). Por isso, deve-se evitar uma alimentação com baixa ingestão de fibras, frutas, vegetais, minerais e vitaminas. A dieta não deve ter quantidades excessivas de calorias, lipídios e carne vermelha. A ingestão de álcool, hábito de fumar, sedentarismo e obesidade são outros fatores diretamente relacionados ao desenvolvimento do CCR (DERRY *et al.*, 2013).

Os fatores ambientais possuem uma grande relação com o risco de câncer e as mudanças no estilo de vida desempenham um papel muito importante na prevenção de vários tipos de câncer (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015). A prevenção do câncer pode ser mais efetiva e menos onerosa porque o câncer está intimamente associado aos fatores relacionados ao estilo de vida. Cerca de 30% a 40% das neoplasias poderiam ser prevenidas por uma dieta saudável, atividade física regular e mantendo peso corporal adequado. No geral, um consumo elevado de vegetais e frutas (> 400 g / dia) poderia prevenir pelo menos 20% de todos os casos de câncer (AMIN *et al.*, 2009). Evidências epidemiológicas indicam que dietas ricas em frutas e vegetais promovem a saúde e atenuam ou atrasam o aparecimento de muitas doenças (CROZIER; DEL RIO; CLIFF, 2010; CVOROVIC *et al.*, 2010). Sabe-se que a incorporação de 3 a 5 porções diárias de frutas ou vegetais com folhas verdes dentro da dieta podem ser considerados uma boa escolha para promover a saúde (KYSELOVA, 2011).

A nutrição é um componente ambiental de extrema importância no desenvolvimento de todos os organismos vivos, pois existe uma associação entre a

nutrição de uma pessoa e seus genes. De acordo com pesquisas *in vitro* e *in vivo*, os componentes bioativos da dieta têm uma influência substancial na prevenção e terapia do câncer. É vital explorar os efeitos positivos dos suplementos alimentares para a saúde. Ensaios clínicos e pesquisas têm evidenciado que a alternância dos hábitos alimentares é potencialmente uma das principais abordagens para reduzir o risco de câncer em um indivíduo (SRIVASTAVA *et al.*, 2022). Logo, a alimentação possui um papel essencial na prevenção do CCR e a introdução de nutrientes com conteúdo antioxidante pode reduzir o risco de CCR (DUSAK; ATASOY; DEMIR, 2022). Muitos estudos epidemiológicos têm mostrado a relação entre adesão à dieta mediterrânea e baixa incidência de CCR (MAHMUD *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços significativos nas medidas de prevenção do CCR através do rastreamento e vigilância baseados na detecção precoce e remoção de pólipos (ZAUBER *et al.*, 2012), existe uma necessidade de uma estratégia alternativa de prevenção do CCR. A quimioprevenção (QP) é uma opção que poderia minimizar a necessidade de investigações endoscópicas invasivas e a neoplasia de intervalo (WU; PATTERSON; HAWK, 2011). É uma abordagem importante para diminuir a morbidade e a mortalidade do CCR através do uso de substâncias naturais ou sintéticas que possam reverter os processos de iniciação, promoção e progressão do câncer (TANAKA, 2012b). Evidências clínicas mostraram que a utilização de fitoquímicos na QP é de baixo custo, aplicável, aceitável e uma abordagem acessível para o controle e manejo do câncer (HUANG; CAI; ZHANG, 2009; LUK *et al.*, 2007; PRATHEESHKUMAR *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de drogas contra o câncer é um processo caro e demorado que pode gerar medicações sem eficácia e com efeitos colaterais importantes. Os fitoquímicos podem fazer parte ou substituir drogas contra o câncer, com baixo custo e poucos efeitos colaterais. Os fitoquímicos, encontrados em alimentos, são capazes de reverter uma regulação epigenética adversa, equilibrar respostas dos tecidos a inflamação e modificar a MI. Diferentes fitoquímicos podem desempenhar um papel melhorador em diferentes ou múltiplos estágios durante o desenvolvimento do câncer. Assim, alguns fitoquímicos estão sendo utilizados sozinhos ou combinados como estratégias eficazes e inovadoras na prevenção do câncer. Contudo, o efeito dos fitoquímicos na progressão do câncer deve ser melhor definido, já que o desenvolvimento do câncer é um processo complicado e há vários fatores envolvidos (KOH; HO; PAN, 2020).

Os compostos fenólicos encontrados em frutas e verduras contribuem na prevenção do CCR. Assim, o estudo de dietas ricas em polifenóis na prevenção de neoplasias vem ganhando maior notoriedade. Os polifenóis podem modular a MI e os micróbios intestinais catabolizam polifenóis para liberar metabólitos que muitas vezes são mais ativos e melhor absorvidos do que os compostos fenólicos originais. No futuro, entenderemos melhor o papel imunomodulador de polifenóis dietéticos e seus metabólitos na prevenção do CCR. Além disso, expandiremos o conhecimento sobre o papel da microbiota intestinal no metabolismo dos polifenóis e seu impacto adicional na prevenção do CCR (CUEVA *et al.*, 2020).

Existe uma forte associação entre a dieta, micróbios intestinais e carcinogênese intestinal. Uma dieta pode causar o aumento da inflamação, estresse oxidativo (EO) e danos ao Ácido desoxirribonucléico. Essas alterações podem levar à disbiose e, conseqüentemente, o desenvolvimento do CCR. Assim, intervenção dietética e modulação da MI podem desempenhar um papel vital na redução do risco de CCR. Investigações sobre o efeito da disbiose microbiana no desenvolvimento do CCR é um assunto de extrema importância (LOKE *et al.*, 2020).

A MI é capaz de modular respostas imunes e inflamatórias relacionadas ao câncer. Estudos recentes mostraram a administração de diversas cepas de probióticos em múltiplas combinações, concentrações e posologia na modulação da MI e prevenção do câncer. Portanto, a manipulação da MI através da administração de probiótico (PRO) é uma abordagem válida e emergente na prevenção do CCR. Investigações sobre a utilização de PRO são, ainda, necessárias para definir protocolos e estabelecer abordagens inovadoras. Futuramente, a ingestão regular de PRO poderá aparecer como uma estratégia alternativa na prevenção do câncer (PANEBIANCO; LATIANO; PAZIENZA, 2020).

Evidências recentes sugerem que a dieta tem um impacto importante no risco de desenvolvimento de CCR. A ingestão de dietas ricas em polifenóis e PRO são mecanismos com grande potencial na redução do risco de desenvolvimento do CCR. Portanto, uma modulação personalizada do padrão do microbioma intestinal pela dieta pode ser uma abordagem promissora para prevenir o desenvolvimento do CCR (SÁNCHEZ-ALCOHOLADO *et al.*, 2020).

## 1.1 MODELOS PARA INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO CCR

Os modelos animais de indução da carcinogênese intestinal (CI) podem ser utilizados para testar estratégias de prevenção e tratamento. Outras formas de pesquisar e desenvolver hipóteses são através do uso do material oriundo de biópsias humanas, xenotransplante de tumores e modelos de cultura celular *in vitro*. Porém, essas abordagens têm várias limitações. Primeiro, os tumores de colón têm uma complexidade mutacional que limita o entendimento do impacto de mutações individuais. Em segundo lugar, as linhas celulares do CCR podem crescer na ausência de microambientes normais que são críticos para a homeostase do tecido colônico normal. Terceiros, os tumores humanos se desenvolvem após longos períodos e são geralmente identificados após a terceira década de vida. Assim, eventos biológicos que regulam inicialmente o câncer e promovem o crescimento tumoral são difíceis de estudar devido à incontrolável genética e diversidade de ambientes. Finalmente, as complicações éticas limitam as intervenções que podem ser aplicadas a populações de pacientes (JOHNSON; FLEET, 2013).

Animais são utilizados para avaliar biomarcadores, efeitos colaterais, posologia, vias de administração e eficácia de potenciais agentes quimiopreventivos para o CCR. Os dados obtidos podem ser utilizados para programar ensaios clínicos quando utilizado um modelo de carcinogênese animal validado, pois existe uma correlação com os resultados de pesquisas realizadas em humanos (STEELE; LUBET, 2010). Várias características são importantes para manter o potencial translacional dos estudos realizados em modelos animais. O câncer que se desenvolve no modelo animal deve ser limitado ao intestino grosso de modo que os investigadores possam estudar o desenvolvimento da doença sem os efeitos confundidores da doença em outros tecidos. O estudo histológico e as características moleculares das lesões colorretais devem ser semelhantes às observadas no tecido humano. Os modelos devem capturar as interações celulares complexas que são relevantes para o CCR em humanos (JOHNSON; FLEET, 2013). Finalmente, o modelo deve ser capaz de produzir uma carga tumoral consistente em mais de 60% dos animais que desenvolverão a neoplasia e um período inferior a 6 meses deve ser suficiente (STEELE; LUBET, 2010).

Os modelos de carcinogênese utilizando roedores são rápidos, reprodutíveis e exibem uma sequência de adenoma para carcinoma semelhante à encontrada em seres humanos (MACHADO *et al.*, 2016). Os modelos animais que podem induzir o CCR se enquadram em três grandes categorias: câncer intestinal espontâneo em

várias espécies de animais, cânceres induzidos quimicamente ou pelo ambiente em roedores e os induzidos por manipulação genética de ratos (JOHNSON; FLEET, 2013).

Nos últimos 40 anos, cientistas estudaram a CI induzida experimentalmente em roedores, a fim de elucidar a etiologia e os mecanismos envolvidos. A Histopatologia comparativa revelou muitas semelhanças entre o CCR em roedores e humanos. A patologia molecular comparativa também mostrou semelhanças genéticas. Recentemente, modelos experimentais utilizando ratos geneticamente modificados e indução de processos inflamatórios no colón são utilizados para investigar medicações com efeito na QP do CCR (WARD; TREUTING, 2014).

A mutação no gene APC é um passo inicial na maioria das neoplasias de colón. Os modelos de carcinogênese utilizando roedores com mutações APC foram utilizados pela primeira vez há mais de 2 décadas. Um estudo com mais de 45 tipos de roedores com esta mutação permitiu uma maior compreensão do papel do gene APC no desenvolvimento, diferenciação e homeostase de células epiteliais intestinais (ZEINELDIN; NEUFELD, 2013). Assim, os modelos de carcinogênese colorretal (MCC) em roedores com presença de mutações no APC foram desenvolvidos e amplamente utilizados. No entanto, diferentemente dos humanos a maioria dos ratinhos desenvolve tumores, predominantemente, no intestino delgado e com uma menor frequência no colón (LI *et al.*, 2022; WASHINGTON *et al.*, 2013; ZEINELDIN; NEUFELD, 2013). A tumorigênese no intestino delgado humano é rara. Por isso, é importante desenvolver animais transgênicos com tumorigênese específica do colón. Isso permitiria um entendimento mais preciso da tumorigênese do cólon em humanos, facilitando ainda mais a avaliação do impacto de medicamentos e outros tratamentos em pacientes com CCR (LI *et al.*, 2022).

Na fase tardia do CCR humano ocorrem frequentemente metástases que levam a alta mortalidade e recorrência. Torna-se, portanto, urgente compreender o mecanismo da metástase, desenvolvendo assim tratamentos contra metástases para benefícios clínicos. Atualmente, o modelo animal mais comum que reproduz metástase de CCR ocorre por transplante ou injeção ortotópica de células do CCR. Embora as metástases sejam desenvolvidas nestes modelos, não é possível representar com precisão a metástase real que ocorre em humanos devido à falta de múltiplos componentes como as células imunes do microambiente tumoral. Usando

modelos de camundongos avanços científicos foram feitos na compreensão da patogênese dessa doença complexa (LI *et al.*, 2022).

O rato PIRC, com genes APC mutados, desenvolvem tumores do cólon espontaneamente, imitando a polipose adenomatosa familiar e o CCR esporádico (FEMIA *et al.*, 2015). Os ratos Min / + tem uma mutação no codon 850 do gene supressor tumoral APC. Esta mutação é observada, também, no gene APC humano e leva a formação de várias lesões neoplásicas espontâneas no intestino dos ratos (FODDE; SMITS, 2001; VAN ES; GILES; CLEVERS, 2001). O rato Min / + convencional, criado com um fundo genético C57BL / 6J, é amplamente utilizado devido a predisposição dos mesmos a polipose adenomatosa familiar. No entanto, é um modelo questionável devido a grande maioria dos tumores surgirem no intestino delgado e, apenas, uma pequena fração dos tumores evoluírem para carcinomas invasivos (TAKETO; EDELMANN, 2009). Os ratinhos A / J Min / + são tipicamente mais susceptíveis ao CCR induzido por carcinógeno do que os ratinhos Min / + C57BL / 6J. Eles não mostram aumento nas lesões do intestino delgado, apresentam o desenvolvimento de lesões colônicas benignas que progridem para carcinoma ao longo do tempo e mostraram ativação da via de sinalização Wnt. Assim, o ratinho A / J Min / + pode ser um modelo relevante para a iniciação, promoção e progressão do CCR (MENGHINI *et al.*, 2017; SØDRING; GUNNES; PAULSEN, 2016). Os ratos SAMP1 / YitFc (SAMP), também, apresentam um aumento na tumorigênese colônica (MENGHINI *et al.*, 2017). O uso de ratos Wistar não geneticamente modificados, também, podem ser utilizados no estudo na CI (BURLAMAQUI *et al.*, 2012; JUCÁ *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2002) e por não possuírem uma predisposição a formação de neoplasia de colón necessitam de um maior tempo de exposição ao carcinógeno.

A doença inflamatória intestinal é um importante fator na progressão da carcinogênese associada à colite (CAC). O dextrano sulfato de sódio (DSS) é um agente com efeitos tóxicos diretos sobre o epitélio intestinal, podendo ser administrado na água potável de ratos em vários ciclos para criar um estado inflamatório crônico. O desenvolvimento tumoral é acelerado se administrado num ambiente pró-carcinogênico. Estes incluem ratos com mutações genéticas nas vias de tumorigênese, bem como ratinhos pré-tratados com agentes genotóxicos azoximetano (AOM) e 1,2-dimetil-hidrazina (1.2-DMH) (THAKER *et al.*, 2012). O composto DMH e o seu metabólito AOM, são os dois carcinógenos mais comumente

usados para induzir e promover o CCR em ratos e camundongos (BISSAHOYO *et al.*, 2005). Embora o modelo de carcinogênese que utiliza os agentes 1,2-DMH ou AOM não represente a complexidade da doença humana e não substitua os estudos com o material humano, pode ser utilizado para estudar eventos moleculares do CCR e para desenvolver e avaliar uma variedade de novos agentes quimiopreventivos para o câncer ou estratégias terapêuticas emergentes que são difíceis de abordar em humanos. Deve-se reconhecer que os modelos animais refletem apenas certos elementos da fisiopatologia e que a qualidade da resposta depende fortemente da qualidade e especificidade da questão experimental (PERSE; CERAR, 2011).

A combinação de DSS com AOM como um modelo para câncer associado à colite ganhou popularidade por sua reprodutibilidade, potência e usabilidade. Embora eles tenham um mecanismo compartilhado, o carcinógeno AOM é mais potente e estável em solução do que DMH (WARD; TREUTING, 2014). Enquanto, o desenvolvimento tumoral em outros modelos requer vários meses, os ratos que receberam uma única injeção via intraperitoneal de AOM (10 mg / kg de peso corporal) e subsequentemente foram tratados com DSS, na água potável, desenvolvem tumores em aproximadamente 7 a 10 semanas (NEUFERT; BECKER; NEURATH, 2007; TANAKA, 2012a). O DSS (2 a 5%) é utilizado para induzir colite em ratos devido à sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e capacidade de causar alterações semelhantes às observadas no colón de humanos (CHASSAING *et al.*, 2014).

Um experimento mostrou que uma única injeção intraperitoneal de AOM (10 mg / kg), seguida pela exposição oral durante 1 semana de DSS na água potável (2%) teve um importante efeito na carcinogênese do cólon de ratos. Este modelo de CAC mostrou após 20 semanas uma alta incidência de adenocarcinomas no colón (100%) e adenomas (32%), além de alto número de neoplasias múltiplas em um mesmo animal. A investigação por imunohistoquímica (IHQ) das neoplasias e displasias mostrou que todas as lesões foram positivas para  $\beta$ -catenina, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e *induced Nitric Oxide Synthase* (iNOS) (TANAKA *et al.*, 2003).

O AOM dissolvido em NaCl a 0,9% pode ser aplicado por via subcutânea durante duas semanas consecutivas a uma dose de 15 mg / kg / semana como opção na indução da CAC em ratos da linhagem Wistar não modificados geneticamente. O aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) está relacionado ao maior tempo de acompanhamento entre a exposição ao carcinógeno e a eutanásia. Um estudo acompanhou dois grupos de ratos Wistar machos com 10 semanas de idade e peso

aproximado de 200 gramas após a indução da CI com 2 aplicações consecutivas de AOM. Um grupo sofreu eutanásia com 15 semanas e o outro com 35 semanas. As lesões colonicas pré-neoplásicas e cancerosas foram identificadas em ambos os grupos, porém o número de lesões foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) no grupo que foi acompanhado por mais tempo (REFAAT *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que a indução da CAC em ratos machos (16 semanas de idade), da linhagem Wistar, foi efetiva para a formação de múltiplos FCA após duas aplicações intraperitoneais consecutivas de AOM a uma dose de 15 mg / kg / semana e eutanásia após 15 semanas da primeira aplicação do carcinógeno (BURLAMAQUI *et al.*, 2010, 2012).

Uma limitação do uso dos principais agentes genotóxicos (DMH / AOM) é que existe a necessidade de uma ativação metabólica para se tornarem um carcinógeno ativo. Este processo ocorre no fígado com a participação de várias enzimas. Caso o agente quimiopreventivo interfira com o metabolismo do DMH / AOM pode modificar a carcinogênese e afetar os resultados. Já foi demonstrado que o dissulfiram afeta significativamente a carcinogênese do cólon, porque bloqueia o metabolismo da AOM devido à sua atividade inibitória sobre a CYP2E1. Verificou-se, também, que a administração simultânea de DMH / AOM e álcool inibe a carcinogênese do cólon, provavelmente devido à supressão da ativação do DMH / AOM no fígado. Em contraste com os humanos, as metastases para o fígado e pulmão são muito raras nos ratos com protocolo de indução da CI que utilizam DMH / AOM. Os tumores que são capazes de metástase são quase exclusivamente mucinosos e carcinomas de células de anel de sinete do cólon proximal (PERSE; CERAR, 2011). Um estudo avaliou alterações hepáticas após a indução da carcinogênese colorretal de ratos da linhagem Wistar com AOM e observou-se que lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas aparecem e evoluem na proporção do tempo e dose de exposição ao AOM (BURLAMAQUI *et al.*, 2013). Uma limitação da DMH é a falta de especificidade para a indução de neoplasias no colón, já que pode induzir tumores hepáticos (MACHADO *et al.*, 2016).

A DMH é o carcinógeno mais antigo e mais usado para induzir tumores em ratos (GOIS JÚNIOR *et al.*, 2012). Ele induz mutações no DNA que estão relacionadas ao desenvolvimento do CCR (NEWELL; HEDDLE, 2004). A captação de DMH é três vezes maior no colón comparadas com o intestino delgado. O efeito carcinogênico pode ser obtido após uma única injeção ou através de múltiplas injeções com intervalos semanais (GOIS JÚNIOR *et al.*, 2012). A maioria dos estudos, com ratos

não modificados geneticamente, preconiza aplicações de DMH com doses semanais que variam de 15-25 mg/ kg por um período de 15 a 20 semanas. No entanto, existem estudos com uma única aplicação e uso de doses que variam de 7,5 mg/ kg até 40 mg/ kg (PERSE; CERAR, 2005). Um dos modelos mais utilizados induzem a CI em ratos machos da linhagem Wistar através de aplicações subcutâneas de 1,2-DMH (20 mg / kg / semana) durante 15 semanas consecutivas (ARUL *et al.*, 2012; EL-KHADRAGY *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH; SINHA, 2010; PATYAR *et al.*, 2017; SMERDU; PERSE, 2017). Um modelo experimental com ratos wistar machos pesando de 200 a 250 gramas, utilizou a aplicação IM de 1,2-DMH na dose de 40 mg/kg/semana por sete semanas consecutivas e observou o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e remodelação da microbiota intestinal (SILVA-REIS *et al.*, 2022). As aplicações são mais comumente realizadas por via subcutânea, mas pode ser utilizada a via intraperitoneal (PERSE; CERAR, 2005).

Ocorre o aparecimento de FCA após a indução do CCR com duas injeções intraperitoneais de DMH (40mg / kg / semana) em ratos Wistar, sendo observado as criptas aberrantes com 6 e 12 semanas da primeira injeção (GOIS JÚNIOR *et al.*, 2012). Um estudo induziu o CCR com duas injeções subcutâneas de DMH (40mg / kg / semana) em vinte ratos Wistar machos com 6 semanas de idade que foram divididos em dois grupos e sacrificados após 4 semanas (Grupo A) e 30 semanas (Grupo B). No Grupo A, 91,5% dos FCA eram formados por 1 a 2 criptas e 8,5% tinham 3 ou mais criptas. No Grupo B, 46,9% tinham 3 ou mais criptas. Assim, o número de criptas aberrantes por foco aumentou no grupo acompanhado por maior tempo (30 semanas). Observou-se, ainda, um aumento no número de FCA e neoplasias bem diferenciadas (n=9) no Grupo B. Logo, os FCAs tiveram correlação com o desenvolvimento de neoplasias a médio prazo (30 semanas) (RODRIGUES *et al.*, 2002). Os adenocarcinomas tubulares bem diferenciados são mais comuns e costumam apresentar um crescimento polipoide (NAKAGAMA; NAKANISHI; OCHIAI, 2005).

Logo, um protocolo para se estudar a carcinogênese química do cólon depende de diversas variáveis, tais como: animal (espécie, linhagem, sexo e idade), carcinógeno (tipo, dose, e via de administração) e duração do experimento. Levando em consideração os custos, optou-se pela utilização de um protocolo de indução da CI com 1,2-DMH.

## 1.2 LESÕES HISTOPATOLÓGICAS PRECURSORAS DO CCR

O conceito de prevenção do câncer é retardar, regredir ou eliminar lesões pré-cancerosas. Para estudar a prevenção de neoplasias do cólon por alimentos é necessário entender as alterações histopatológicas do cólon causadas por um agente cancerígeno. O estudo dos estágios pré-cancerígenos no cólon é possível por identificação e quantificação de FCA. Os FCAs são usados extensivamente para identificar moduladores da carcinogênese do cólon. Essas informações fornecem uma melhor compreensão da patogênese do CCR e contribuem para o desenvolvimento de diferentes estratégias preventivas para o CCR em indivíduos com alto risco e para a população em geral. As características e o número de FCA quantificam o risco de desenvolver o CCR. Portanto, o estudo dos FCA pode fornecer uma avaliação quantitativa do desenvolvimento gradual do CCR (BIRD; GOOD, 2000).

Bird foi o primeiro a identificar e descrever os FCA na mucosa colorretal de roedores expostos à ação de substâncias carcinogênicas, além de reconhecê-los como lesão precoce e precursora do CCR (BIRD, 1987). Posteriormente, o FCA foi reconhecido e identificado em humanos (PRETLOW *et al.*, 1991) e desde então, muitos estudos, mostram o seu potencial como biomarcador biológico confiável de lesões pré-neoplásicas e cancerosas no intestino grosso (MORI *et al.*, 2004; WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010). Kinzler e Vogelstein (1996) colocam o FCA como a mudança morfológica mais antiga no caminho para o CCR. Os FCA são induzidos por carcinógenos específicos do cólon (MCLELLAN; BIRD, 1988; MCLELLAN; MEDLINE; BIRD, 1991), que representam uma relação dose-dependente (MCLELLAN; MEDLINE; BIRD, 1991) e não se desenvolvem após o tratamento com substâncias cancerígenas que não induzem tumores no cólon (MCLELLAN; BIRD, 1988).

Estas lesões demonstram semelhanças histológicas aos adenomas e adenocarcinomas do cólon. Compartilham defeitos moleculares fundamentais com pelo menos alguns tumores do cólon (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010). Evidências mostram que alterações genéticas e epigenéticas podem ser encontradas nos FCA e no CCR, contribuindo para o progresso no conhecimento de caminhos moleculares relacionados a CI. A associação de FCA com CCR em estudos da esfera molecular é muito mais homogênea do que em estudos morfológicos (LOPEZ-CERON; PELLISE, 2011).

Os FCA são histologicamente heterogêneos e englobam um espectro de lesões das quais apenas um subconjunto está associado com displasia (BOUZOURENE *et*

*al.*, 1999). O número de FCA, também, pode ser utilizado como um preditor da probabilidade de recorrência de adenoma colorretal após polipectomia (UCHIYAMA *et al.*, 2012). Em comparação com as criptas normais, os FCA são caracterizados por sua coloração mais escura (devido ao aumento nuclear e depleção de mucina), maior tamanho, formato elíptico, revestimento epitelial mais espesso e maior zona percriptômica (BIRD; GOOD, 2000). A displasia nestes focos pode ser caracterizada por células hipercromáticas, núcleos alongados, estratificação nuclear e depleção de mucina (OGATA *et al.*, 2010).

São fatores de risco para a multiplicidade de FCA são: sexo masculino, envelhecimento (NORLIDA; PHANG, 2010; STEVENS; SWEDE; ROSENBERG, 2007), história familiar de CCR (STEVENS; SWEDE; ROSENBERG, 2007) hábito de fumar e uso de álcool (SAKAI *et al.*, 2011). São indicadores de FCA de alto risco a presença de multiplicidade de criptas aberrantes, alto número de FCA, alta densidade de FCA, a identificação de focos com depleção de mucina e a localização no colón distal (GUPTA *et al.*, 2016).

Alguns autores sugerem que a tradicional sequência adenoma-carcinoma na progressão tumoral do intestino grosso pode ser estendida para a sequência FCA-adenoma-carcinoma (HURLSTONE; CROSS, 2005). Os Adenomas podem ser precursores do CCR. Embora todos os adenomas tenham capacidade para evoluir para uma doença maligna, a maioria permanece como uma lesão não invasiva. A cancerização dos adenomas colorretais requer a invasão neoplásica da submucosa (RISIO, 2010). Os adenomas clássicos são divididos em tubulares, vilosos e tubulovilosos. Outras lesões precursoras colorretais são o pólipó hiperplásico, adenoma serrilhado séssil e adenoma serrilhado tradicional (HAUMAIER; STERLACCI; VIETH, 2017).

Na avaliação histológica, a mucosa colônica e retal possui uma lâmina própria com glândulas tubulares revestidas por epitélio cilíndrico (do tipo absorvente) e células caliciformes. A arquitetura glandular varia nas diferentes partes do cólon (LINDSTROM; ROSENGREN; FORK, 1979). As alterações histológicas antecedem os tumores macroscópicos nas placas linfóides de ratos tratados com DMH. As glândulas atípicas são caracterizadas pela ausência de muco citoplasmático, núcleos de células hipercromáticas, estratificação celular e aumento do número de figuras mitóticas. Os ratos que recebem uma única dose de DMH costumam ter agregados linfóides mais espessos do que os animais presentes nos grupos controle. O

adenocarcinoma microinvasivo do cólon parece ser um achado comum em ratos tratados com dose única de DMH. No entanto, essas lesões permanecem não detectadas no exame macroscópico. Assim, o exame macroscópico do cólon de ratos tratados com DMH é um método não confiável para determinar o número de adenocarcinomas, pois estas lesões podem ocorrer na ausência de tumores macroscopicamente detectáveis (RUBIO *et al.*, 1986).

### 1.3 PTEROSTILBENE (PS)

Stilbenes são fitoquímicos presentes em uvas, bagas amendoim e vinho tinto (RIMANDO *et al.*, 2004). O PS (trans-3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno) e o resveratrol fazem parte dos stilbenes. A diferença estrutural entre os dois é que o PS contém um grupo hidroxila e dois grupos metoxi, enquanto o resveratrol possui três grupos hidroxila. A presença de grupos metoxi no PS aumenta a sua absorção oral, melhora a estabilidade metabólica, leva a uma maior lipofilicidade e maior potencial de absorção celular (ESTRELA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2020). A diferença na estrutura molecular é responsável pelo PS ter uma maior biodisponibilidade que o resveratrol, pois apresenta um metabolismo e excreção mais lentos (CHAO *et al.*, 2010). O PS administrado por via oral mostra biodisponibilidade de 95%, enquanto o resveratrol tem apenas 20% de biodisponibilidade (ESTRELA *et al.*, 2013). A meia-vida de PS é sete vezes maior do que a do resveratrol, 105 min versus 14 min (REMSBERG *et al.*, 2008). Logo, o PS tem uma melhor farmacocinética do que o resveratrol (OH; GAO; SHAHIDI, 2021). Nem todos os efeitos benéficos do PS são encontrados com o resveratrol, e aqueles que são encontrados em comum são geralmente maiores com o PS (DUKE, 2022). O PS é uma substância que pode ser rapidamente absorvida e amplamente distribuída nos tecidos. Tornou-se popular devido a sua função antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória (LIU *et al.*, 2020).

Embora o PS tenha o potencial de melhorar a saúde humana, a maioria dos estudos mostra efeitos benéficos com doses que excedem em muito os níveis que podem ser esperados em uma dieta. Uma dieta equilibrada com PS (amendoins, uvas e mirtilos) não é capaz de fornecer altos níveis deste composto, mas a engenharia genética é capaz de produzir compostos sintéticos com altos níveis de PS para suplementar à dieta (DUKE, 2022). Ruiz *et al.* (2009), publicaram um estudo no qual avaliaram a toxicidade do PS em camundongos saudáveis após a ingestão de doses

elevadas (30, 300 e 3000 mg / kg / dia) durante 28 dias. Essas doses não causaram mortalidade durante o período experimental e o exame histopatológico e avaliação bioquímica não mostraram alterações clinicamente importantes. Outro estudo avaliou a segurança da administração oral do PS em humanos durante 6 a 8 semanas e constatou a segurança desta substância na dosagem até 250 mg / dia (RICHE *et al.*, 2013). A suplementação a longo prazo (90 mg/Kg/dia durante 30 semanas) com PS não apresenta toxicidade em estudos experimentais (PARRASIA *et al.*, 2022). O PS em grandes doses é farmacologicamente seguro (não induz danos ao fígado e rim) (OBRADOR *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). A dose de consumo diário de PS de 10 a 30 mg / kg apresenta efeito antioxidante e anti-inflamatório (GAO, 2018) sem toxicidade orgânica ou sistêmica (PRIEGO *et al.*, 2008).

A administração do PS pode ser por via oral, intravenosa ou tópica. O importante é atingir concentrações efetivas em tumores por longos períodos para tentar aumentar a sua eficácia contra o câncer (OBRADOR *et al.*, 2021). Pensando no uso prolongado, a ingestão oral é a via preferida para a autoaplicação do consumidor. A administração oral é indolor, econômica, reduz o risco de transmissão de doenças e permite um cronograma flexível. A bioeficácia do PS é atenuada quando consumido por via oral devido à sua fraca solubilidade aquosa (PENG, 2018). Logo, a solubilidade aquosa foi identificada como uma barreira à sua biodisponibilidade oral (BETHUNE; SCHULTHEISS; HENCK, 2011; YEO; HO; LIN, 2013), sendo a manipulação da dose uma estratégia prática para melhorar a biodisponibilidade e exposição sistêmica do PS. Em doses baixas a eliminação do PS é mais rápida, porém quando a dose aumenta parece ocorrer uma saturação parcial ou total das enzimas relacionadas com o metabolismo e, conseqüentemente, uma redução na capacidade de eliminação do PS do organismo. Isto foi observado quando a dose de PS passou de 2,5 mg / kg para 25 mg / kg por injeção intravenosa (YEO; HO; LIN, 2013). O PS possui uma maior absorção quando aplicado (22,5 mg / kg) em ratos Wistar por via venosa do que por via oral (menos 35% de biodisponibilidade). A administração prolongada de níveis baixos de PS por via oral pode imitar a ingestão obtida através da dieta (AZZOLINI *et al.*, 2014). A sua mensuração é 2 a 25 vezes maior nos tecidos do que no sangue, com maiores concentrações no fígado e menores concentrações no músculo esquelético e testículo. A concentração no colón não foi aferida pelo estudo. A alta concentração do PS nos tecidos pode ter relação com a sua alta

lipoficidade e explicar efeitos relacionados a regulação de processos epigenéticos (AZZOLINI *et al.*, 2014).

A atividade antioxidante do PS está relacionada a uma atividade anticancerígena para neoplasias de mama, cólon, próstata (MCCORMACK; MCFADDEN, 2012; TSAI; HO; CHEN, 2017), esôfago, estômago, fígado (MCCORMACK; MCFADDEN, 2012) e pâncreas (MANNAL, 2010; MCCORMACK; MCFADDEN, 2012). O PS é um regulador epigenético potente que pode causar potenciais benefícios que incluem mudanças na metilação do DNA, modificações de histonas (acetilação, metilação e fosforilação) e na expressão de microRNAs (LEE *et al.*, 2018). O PS tem grande potencial como medicamento antitumoral para o tratamento do CCR (ZHANG *et al.*, 2021). Embora existam alguns estudos detalhando o efeito quimiopreventivo do resveratrol, muito pouco se sabe sobre o mecanismo de ação do PS. Os dados existentes indicam que o PS é uma grande promessa no campo da QP para o CCR através da ingestão de agentes dietéticos.

#### 1.4 MICROBIOTA E O DESENVOLVIMENTO DO CCR

O intestino tem uma diversa microbiota composta por milhares de bactérias provenientes de até 15.000 espécies diferentes (FRANK *et al.*, 2007). Embora a microbiota possa variar entre o ceco e cólon distal, as amostras fecais de todo o intestino grosso compartilham uma microbiota comum (GU *et al.*, 2013). A MI é um “órgão microbiano”, sensível a fatores ambientais, dietéticos e do hospedeiro. A MI está ligada a fisiopatologia do câncer (SALEHI *et al.*, 2020). Cerca de 16% das neoplasias parecem ter como um dos fatores causais a presença de micróbios e as neoplasias do trato gastrointestinal são claramente relacionados a presença de algum tipo de micróbio (MARTEL *et al.*, 2012).

O microbioma pode iniciar e / ou promover o CCR em todos os estádios da tumorigênese atuando como um indutor de danos ao DNA e causando instabilidade cromossômica, regulando o crescimento e a morte celular, gerando alterações epigenéticas e modulando as respostas imunes do hospedeiro (WANG; YANG; HUYCKE, 2017). O microbioma pode alterar a sua homeostase pela resposta imune e metabólitos tóxicos das bactérias intestinais (SI *et al.*, 2021). Outras investigações mostraram que as transformações que ocorrem na fase aguda da doença inflamatória

intestinal podem levar ao CCR e serem consequência de uma MI desequilibrada (ABREU; PEEK JÚNIOR, 2014).

O perfil microbiano encontrado em uma pessoa com um intestino saudável é importante para a manutenção da saúde, metabolismo dos nutrientes, metabolismo de drogas e regulação adequada do sistema imunológico (DUTTON; TURNBAUGH, 2012; XU *et al.*, 2013). Alguns micróbios benéficos influenciam positivamente a comunicação entre o sistema imunológico e a microbiota, podendo influenciar na prevenção da inflamação e no aparecimento do CCR (AMBALAM *et al.*, 2016). A grande maioria das bactérias do intestino grosso é benéfica e não está relacionada ao maior risco de CCR, pois exclui potenciais patógenos e ajuda a promover a saúde (THAISS *et al.*, 2016). A redução de bactérias protetoras é uma das formas possíveis pelas quais a CI pode ser facilitada (SOBHANI *et al.*, 2013).

A MI é complexa, sendo as maiores frações compostas por bactérias Gram-positivas do filo Firmicutes e bactérias Gram-negativas do filo Bacteroidetes. Outros filos importantes são a Proteobacteria (Gram-negativas) e Actinobactérias (Gram-positivas) (HANSEN, 2015). A análise da MI nos pacientes com CCR indica uma mudança notável nas concentrações e cepas de bactérias encontradas no colón. Algumas cepas de bactérias foram associadas com a patogênese do câncer, como *Streptococcus bovis*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Helicobacter pylori* e algumas cepas que incluem *Lactobacillus (L) acidophilus* e *Bifidobacterium (B) longum* inibiram o desenvolvimento do CCR induzido por carcinogênio (ZHU *et al.*, 2013).

A MI de ratos e camundongos varia de acordo com o ambiente que vivem, estado de saúde, alimentação, uso de medicações e raça (TOMAS; LANGELLA; CHERBUY, 2012). Entre os fatores ambientais, a dieta parece ter o maior impacto na formação da microbiota. Os animais reúnem e mantêm uma comunidade microbiana intestinal diversa, porém específica do hospedeiro. O ceco e o cólon cultivam as comunidades mais densas e diversas de todos os habitats do corpo (DONALDSOM; LEE; MAZMANIAN, 2016). Kasai *et al.* (2016) mostraram que a MI de pacientes saudáveis e com câncer são diferentes e influenciadas pela dieta e o ambiente. A dieta exerce uma grande influência sobre a MI através de alterações na sua composição e funcionalidade (SEIDEL, 2017; SONNENBURG; BÄCKHED, 2016) que apresenta, evidente, relação com a proteção ou predisposição ao CCR (SCHWABE; JOBIN, 2013; SEIDEL, 2017). A composição da MI de ratos Wistar submetidos a IC com 1,2-DMH é diferente da microbiota de ratos sem CI induzida. Os *Bacteroidetes* são o filo

predominante na MI de ambos os grupos, seguido pelos *Firmicutes*. Existe uma maior abundância relativa de *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobactérias* no lúmen intestinal de ratos com CCR, com menos *Bacteroidetes* e *Lactobacillus* (ZHU *et al.*, 2014).

A MI está envolvida nas transformações metabólicas dos componentes da dieta em oncometabólitos e metabólitos supressores de tumor que, por sua vez, afetam o desenvolvimento do CCR. O CCR possui uma maior relação com as bactérias *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *Streptococcus gallolyticus* (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2021). Pacientes com CCR parecem ter uma porcentagem maior de gênero *Prevotella* e uma proporção menor de *Megamonas* e *Ruminococcus* (BERBERT *et al.*, 2022). Assim, intervenções dietéticas podem ser adequadas para modular o crescimento da microbiota benéfica no intestino (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2021).

As bactérias comensais do intestino tem um papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal. A desregulação da homeostase intestinal ou disbiose leva à perda da diversidade microbiana, crescimento excessivo de patobiontes e translocação de bactérias (SILVA *et al.*, 2015). As bactérias intestinais têm a capacidade de metabolizar alimentos em metabólitos mais ativos e melhor absorvidos (DEL RIO *et al.*, 2013; ESPÍN; GONZÁLEZ-SARRÍAS; TOMÁS-BARBERÁN, 2017). Evidências sugerem que frutas e seus derivados são capazes de aumentar o crescimento de bactérias benéficas ao colón, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (BIALONSKA *et al.*, 2009; NEYRINCK *et al.*, 2013; VENDRAME *et al.*, 2011). Um estudo experimental com indução de colite em animais mostrou que o aumento de lesões colônicas eram inversamente associadas a presença de *Lactobacillus* (RITCHIE *et al.*, 2015).

## 1.5 A MODULAÇÃO DA MI PELA SUPLEMENTAÇÃO DE PRO NO DESENVOLVIMENTO DO CCR

Uma alimentação saudável e o uso de PRO para regular a microflora pode reduzir o risco de CCR (SI *et al.*, 2021). Vários eventos (por exemplo, dieta e inflamação) podem afetar a composição da MI, levando à formação de uma microbiota disbiótica que pode impactar na saúde do hospedeiro. O CCR tem sido associada com o estabelecimento de uma microbiota disbiótica. Consequentemente, existe um

interesse crescente em aproveitar o poder da modulação da composição da MI através do uso de PRO para a prevenção e tratamento do CCR (ZHU *et al.*, 2011). Os PROs são compostos por microrganismos vivos que podem apresentar potenciais efeitos anticancerígenos através da alteração da microbiota nativa do intestino (GAYATHRI; ASHA; DEVARAJA, 2011). Eles têm um efeito benéfico sobre a saúde, exibindo efeitos quantitativos e qualitativos na microflora e modificação do sistema imunológico (HOFFMANN; KLENIEWSKA; PAWLICZAK, 2021). Estudos demonstraram que o consumo regular de PRO pode impedir o desenvolvimento do CCR (REIS *et al.*, 2017) e fornecer sinalização para ativar respostas imunes adequadas (SILVA, 2015).

Existem pelo menos duas desvantagens no uso terapêutico de PROs: biodisponibilidade e biossegurança (BAKSHI *et al.*, 2021). Existem poucos relatórios demonstrando efeitos adversos da suplementação oral de PRO (REIS *et al.*, 2017). Os PROs com *lactobacilos* e *bifidobactérias* têm um longo histórico de segurança. Existem relatos de baixas taxas de eventos adversos que estão relacionados, principalmente, a PROs com outras cepas bacterianas (SHANAHAN, 2012). Casos bem documentados de sepse presumida ou comprovada relacionada com lactobacilos e bifidobactérias foram relatados (CONEM *et al.*, 2009; OHISHI *et al.*, 2010). Embora tenha sido manifestada preocupação com o risco de suplementação probiótica em grupos vulneráveis, como os imunossuprimidos ou aqueles com uma barreira mucosa anormal, o registro até o momento é encorajador (SANDERS *et al.*, 2010; WAGNER; BALISH, 1998; HEDIN; WHELAN; LINDSAY, 2007). De acordo com Gianotti *et al.* (1993), os principais fatores que determinam a ocorrência e a gravidade das infecções associadas à translocação microbiana são a carga bacteriana e a capacidade das defesas do hospedeiro para matar os organismos invasores.

As bactérias podem ser usadas como agentes anticancerígenos, mas os esforços para utilizar bactérias patogênicas atenuadas leva ao risco de toxicidade ou infecção. As bactérias produtoras do ácido lático são seguras e muitas vezes conferem benefícios à saúde, podendo ser utilizadas juntamente com drogas anticancerígenas (CHUNG *et al.*, 2021). As bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* parecem melhorar a ação dos medicamentos quimioterápicos através da redução da proliferação de células cancerosas, indução de apoptose e diminuição das *Fusobacterias*. Além disso, reduzem os efeitos

colaterais (mucosite e diarreia) da quimioterapia, imunoterapia e radioterapia pela inibição de citocinas pró-inflamatórias (BADGELEY *et al.*, 2021).

A suplementação de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no microbioma intestinal de camundongos saudáveis leva ao aumento no número de *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*, todas com potencial efeito positivo na saúde. No grupo de camundongos que foi alimentado com bactérias lácticas houve uma redução na concentração de *Nocardioides*, *Helicobacter* e *Mucispirillum*, que estão envolvidos em processos inflamatórios. Para o grupo de camundongos que foi alimentado com bifidobactérias, observou-se uma diminuição no número de membros do gênero *Tyzzarella* e *Akkermansia*. Foi demonstrado que os PROs que são baseados em membros de da família Lactobacillaceae têm um efeito mais positivo na MI do que os PROs que são à base de bifidobactérias (GRYAZNOVA *et al.*, 2022). O *L. acidophilus* possui maior estabilidade que o *B. bifidum* na microflora intestinal de camundongos a longo prazo (5 meses) (KHAVARI-DANESHVAR, 2017).

Os PROs demonstraram eficácia contra vários tipos de câncer (a depender da cepa, dosagem e duração do tratamento) devido aos seus papéis na antioxidação, imunomodulação, indução de apoptose, antimutagenicidade, controle da expressão de oncogenes, indução de autofagia, inibição de quinase, reativação de supressor tumoral e prevenção de metástases (SANKARAPANDIAN *et al.*, 2022). Existe uma ampla variedade de mecanismos possíveis pelos quais os PROs podem desempenhar um papel na prevenção do CCR. A ação anticancerígena dos PROs no colón envolve efeitos diretos sobre a mucosa intestinal, intraluminais e sistêmicos. Os efeitos intraluminais incluem a exclusão competitiva da flora intestinal patogênica, alteração da atividade enzimática da microflora intestinal, redução da carcinogênese secundária a ácidos biliares, ligação de agentes cancerígenos e mutagênicos e aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta. A redução do dano ao DNA, melhora das funções da barreira colônica e supressão da formação de FCA são efeitos diretos na mucosa intestinal para a prevenção do CCR. As evidências existentes, também, mostram um efeito imunomodulador dos PROs na prevenção do CCR, particularmente na capacidade de modular a inflamação intestinal (CHONG, 2014).

A suplementação com PROs é capaz de elevar a produção de mucina (eleva o nível de MUC-2), de melhorar a permeabilidade intestinal (redução do pH e aumento dos ácidos graxos de cadeia curta e ácidos orgânicos), de causar a degradação de carcinógenos, de alterar a atividade de enzimas ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,

nitrito redutase, azoredutase e 7- $\alpha$ -desidroxilase), de estimular a produção de compostos anticarcinogênicos (ácidos graxos de cadeia curta e ácidos linolêicos conjugados), aumentar a defesa antimicrobiana, ocasionar uma modulação imunológica ( $\downarrow$  IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-1 $\beta$  e COX-2). Também melhora a capacidade antioxidante, reduz o índice mitótico de colonócitos, aumenta o nível de butirato, reduz a expressão de bcl-2 e aumenta os níveis de TNF- $\alpha$  e caspase-3. O impacto benéfico da suplementação de PROs depende da cepa utilizada, dosagem, duração da intervenção, fisiologia do hospedeiro e associação com outros suplementos alimentares (SIVAMARUTHI; KESIKA; CHAIYASUT, 2020). Existem uma ampla variabilidade nas respostas de doenças intestinais aos PROs que podem estar associadas com a genética do hospedeiro e fatores ambientais (YAN; POLK, 2020). Logo, nem todos os PROs tem ação na proteção contra o desenvolvimento do CCR (SIVAMARUTHI; KESIKA; CHAIYASUT, 2020).

Segundo Faghfoori *et al.* (2015), os PRO tem ação através de alguns mecanismos celulares e moleculares, tais como, influenciar na composição e homeostase da MI, competir com bactérias patogênicas, produção de compostos ativos contra células cancerosas do cólon humano como ácidos graxos de cadeia curta, inativação de compostos cancerígenos, melhora da função barreira intestinal, ligação as substâncias mutagênicas para a sua eliminação do corpo, redução dos efeitos nocivos dos ácidos biliares, modulação das respostas imunes, função antioxidante, apoptose e efeitos anti-proliferativos. Porém, cada grupo de bactérias exercem seus efeitos de forma individualizada. Para Fong, Li e Yu (2020), a contribuição dos PROs na prevenção do CCR é atribuída a capacidade de inibir a colonização por bactérias patogênicas, modulação da imunidade intestinal e fortalecimento da barreira intestinal. Recentemente, três vias celulares foram postuladas para a compreensão dos efeitos dos PROs na saúde intestinal. Os PROs inibem primeiramente os efeitos bacterianos patogênicos, gerando produtos químicos bactericidas e competindo pela adesão epitelial intestinal com patógenos e toxinas. Em segundo lugar, os PROs modulam as respostas imunes aumentando a imunidade inata e regulação das vias de inflamação causadas pelo patógeno. Finalmente, regulam homeostase epitelial intestinal através de múltiplas vias de sinalização, estimulando sobrevivência das células epiteliais intestinais, função de barreira e proteção (LAND *et al.*, 2005).

Os PRO podem apresentar atividade antioxidante e reduzir os danos causados pela oxidação. Contudo, os mecanismos pelos quais os PROs apresentam uma ação antioxidante precisa ser mais bem esclarecido. Alguns PROs podem agir produzindo metabolitos antioxidantes, aumentando os níveis de metabolitos antioxidantes, modulando a MI e regulando vias de sinalização e atividades de algumas enzimas produtoras de *Reactive Oxygen Species* (ROS) (WANG *et al.*, 2017). Evidências mostram que PROs específicos são valiosos na prevenção e tratamento do câncer através do aumento da produção de citocinas (IL-2 e IL-12), antioxidantes e fatores anti-angiogênicos. Além disso, diminuem o dano do DNA, inflamação, tamanho do tumor, proteínas relacionadas ao câncer e enzimas pró-cancerígenas (DASARI *et al.*, 2017).

Os PROs mais estudados na prevenção do CCR possuem em sua composição cepas dos gêneros *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* (CHONG, 2014). As bactérias probióticas, geralmente, compreendem bactérias produtoras de ácido láctico dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e estão amplamente disponíveis, por exemplo, em iogurtes e outros alimentos funcionais, como queijos, leites fermentados e não fermentados (UCCELLO *et al.*, 2012). Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum* e *B. lactis*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destaca-se o *L. acidophilus* (SAARELA *et al.*, 2000). *Lactobacillus* é uma das cepas mais utilizadas devido às suas promissoras aplicações, embora ocupe uma proporção pequena da MI. Fatores que influenciam na concentração de *Lactobacillus* são a genética, sexo, idade, doença (menor concentração no CCR), peso, dieta, medicamentos, stress e hipóxia (HUANG *et al.*, 2022).

A terapia probiótica com *B. animalis subsp. lactis BB-12®* é descrita em mais de 300 publicações científicas, sendo considerada a cepa das *Bifidobactérias* mais documentada. Possui excelente tolerância a acidez gástrica e à bile, fortes propriedades de aderência à mucosa intestinal, capacidade de inibir patógenos, aumentar a função de barreira e possui interações imunológicas importantes (JUNGERSEN, 2014). A *B. animalis ssp. lactis* é uma cepa intestinal com alta resiliência ao stress, tornando-a atraente para a utilização pela indústria de alimentos (CELIK; SULLIVAN, 2013). A sua presença é relacionada a uma MI saudável (JUNGERSEN, 2014).

Para que os PROs exerçam seu melhor efeito, a sua viabilidade deve ser mantida durante a fabricação, armazenamento e passagem através dos ambientes gastrointestinais adversos encontrados no estômago e intestino delgado (YING *et al.*, 2010). Uma das formas de armazenamento e conservação dos PROs é através do encapsulamento (SAARELA *et al.*, 2000). A ação sinérgica dos PROs e substâncias prebióticas estabelecem uma interação que pode ser favorecida por uma adaptação do PRO ao substrato prebiótico (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Um prebiótico é um ingrediente fermentado seletivo encontrado na dieta que resulta em alterações específicas na composição e / ou atividade da MI conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2010). Prebióticos, que são nutrientes que podem ajudar a manter a homeostase da MI e mitigar a disbiose, podem ser benéficos na prevenção da inflamação e CCR. Esses nutrientes podem dificultar os efeitos da disbiose, incentivando o crescimento de bactérias benéficas, imunidade anti-inflamatória, manutenção da barreira epitelial intestinal, mecanismos pró-apoptóticos e outros mecanismos celulares (MAHDAVI; LAFOREST-LAPOINTE; MASSÉ, 2021). Dentre os prebióticos, têm-se os frutooligosacarídeos (FOS) que são carboidratos complexos resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal. O FOS é formado a partir da hidrólise da inulina e contribui para o aumento da concentração das bífidobactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Desta forma, estudos *in vivo* podem contribuir para a incorporação de suplementação dietética com capacidade de reduzir a incidência do CCR. A combinação de substâncias deve ser estimulada visando uma potencialização do efeito esperado através da ação em diferentes alvos. Não existem relatos de pesquisas realizadas com intuito de avaliar o efeito da associação de altas doses de PS e PRO com *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* na QP do CCR induzido experimentalmente com 1,2-DMH.

## **2 HIPÓTESE**

H0: A suplementação de PS e / ou PRO em um modelo experimental de indução da carcinogênese intestinal não reduz o desenvolvimento de lesões precursoras do CCR.

H1: A suplementação de PS e / ou PRO em um modelo experimental de indução da carcinogênese intestinal reduz o desenvolvimento de lesões precursoras do CCR.

### **3 JUSTIFICATIVA**

A composição da MI e a inflamação crônica são dois fatores relacionados ao aparecimento do CCR que podem ser modificados através da dieta. Estudos prévios mostraram atividade anti-inflamatória, antioxidante e segurança do PS e de PROs selecionados. No entanto, as evidências disponíveis são insuficientes para justificar a suplementação crônica e simultânea destas substâncias para uma população com alto risco de CCR.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de PS e / ou PRO no desenvolvimento de lesões precursoras do CCR em ratos wistar após a indução do CCR com 1,2-DMH.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Mostrar a efetividade do modelo de indução do CCR com quinze aplicações subcutâneas de 1,2-DMH (20mg/kg/semana).
- ✓ Analisar as alterações histopatológicas (score histológico de inflamação, formação de FCA e presença de lesões macroscópicas) encontradas no colón após protocolo de indução do CCR com 1,2-DMH e suplementação de PS e / ou PRO na dieta.
- ✓ Verificar a expressão das proteínas relacionadas a inflamação (NF-kB, iNOS, IL-1 e TNF-alfa) e ao desenvolvimento do CCR (Wnt3a, B-catenina, Ki-67 e P53) no segmento distal do colón de ratos suplementados com PS e / ou PRO que tiveram o CCR induzido com 1,2-DMH.
- ✓ Quantificar o EO no segmento distal do colón de ratos suplementados com PS e / ou PRO através da aferição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDH) no tecido congelado.

## 5 MÉTODO

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi de caráter experimental, interinstitucional e com o uso de animais vivos. A pesquisa foi realizada após avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais do Centro Universitário Christus sob o número de protocolo 031 / 2018 (Anexo A) e de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Animais (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciências Médicas, 1990). A Lei Federal nº. 6.638 que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais, de 8 de maio de 1979 foi respeitada.

As condições do alojamento até o bem-estar geral dos animais, foram controladas pela direção do biotério e os procedimentos foram baseados nos princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*). Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

### 5.2 AMBIENTE DA PESQUISA

Os experimentos ocorreram no Biotério do Centro Universitário Christus e as amostras coletadas foram analisadas no Núcleo de Estudos em Microscopia e processamento de imagem da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em grupos de quatro por gaiola de polipropileno com tampa de arame galvanizado com zinco, forradas com maravalhas. Permaneceram alojados em condições adequadas de temperatura (média de 25° C), ventilação e iluminação, umidade do ar em torno de 50 % e a claridade e escuridão alternando a cada 12 horas. Receberam água e ração *ad libitum*.

### 5.3 PERÍODO DO ESTUDO

A parte experimental da pesquisa foi realizada no período de março de 2019 a março de 2020.

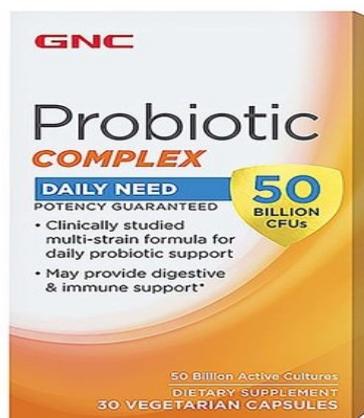
#### 5.4 AMOSTRA

A amostra foi formada por sessenta ratos machos da linhagem Wistar (Rattus norvegicus albinus, Rodentia, Mammalia) provenientes do Biotério Central do Centro Universitário Christus. Peso corporal médio dos animais em cada grupo foi de  $80 \pm 10$  gramas e a idade variando entre 3 e 5 semanas. Os animais que apresentaram qualquer sinal de doença ou morreram foram excluídos do estudo e substituídos.

#### 5.5 PREPARAÇÃO DA DIETA COM PRO E PS

Uma capsula de um complexo PRO (GNC, EUA) contém 50 bilhões de unidade de formação de colônias (UFC) acrescido de 150mg de FOS (Figura 1). Na sua composição possui as seguintes bactérias: *L. acidophilus* (CUL 60), *L. acidophilus* (CUL 21), *B. bifidum* (CUL 20) e *B. animalis subsp. Lactis* (CUL 34). Uma capsula de PRO foi diluída em água potável com intuito de alcançar uma solução com concentração de  $5 \times 10^7$  UFC / ml. Um rato adulto ingere aproximadamente 20 ml ( $1 \times 10^9$  UFC) de água diariamente. A solução foi oferecida *ad libitum* e trocada 3 vezes por semana.

Figura 1 - Complexo PRO suplementado no experimento



Fonte: Autoria própria.

Cápsulas de 150 mg de PS (Mental Refreshment; EUA) (Figura 2) foram utilizadas para produzir uma dieta com 300 partes por milhão (p.p.m) de PS ou 3 mg de PS / 10g de dieta. O peso molecular do PS foi de 256,3 g/mol e a concentração na

dieta é de 1,17 mmol/kg. Um rato de 200g consome em média 10 a 20 g da dieta com 3 a 6 mg de PS / dia ou 15 a 30 mg de PS / Kg/ dia. Foram realizados testes para verificar a presença de PS na dieta e no fígado dos ratos que ingeriram a substância na ração durante 25 semanas. Essa análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Apêndice A).

Figura 2 - Apresentação farmacêutica do PS em capsulas



Fonte: Autoria própria.

A ração padrão utilizada para adição de PS foi a NUVILAB CR-1 irradiada (QUINTIA; BRA) e a produção da ração ocorreu no laboratório de Farmacotécnica da UFC sob a responsabilidade do Prof Said Gonçalves da Cruz Fonseca. Para a produção de 4000 gramas de ração com 300 p.p.m de PS foi seguido o processo descrito a seguir. Inicialmente, foram separadas 4000 gramas de ração e 08 cápsulas de PS. As cápsulas foram individualmente pesadas cheias e vazias em balança analítica de alta precisão (Precisa 205 A SCS) (Figura 3A) e os dados obtidos utilizados para o cálculo do peso médio do conteúdo das cápsulas e respectivo desvio padrão. A ração empregada na nutrição animal foi reduzida a fragmentos grosseiros no moinho de cereais e depois triturada a pó fino através de moinho de rotor tipo ciclone (TE-651\2 TECNAL; BRA) a 1450 rpm com uso de malha circular de 0,5 mm de diâmetro (Figura 3B), obtendo o pó fino da ração (Figura 3C). Foi preparado um concentrado de ração pulverizada contendo PS a partir da mistura de 26 g de pó proveniente das cápsulas contendo PS com 974 g do pó oriundo da ração, de modo que para cada 4000 g de ração produzida foram utilizados 200 g dessa mistura concentrada. Foi preparada uma mistura líquida aquosa com função aglutinante, através da dispersão de 20 g de carmelose sódica em água destilada em quantidade suficiente para se obter 1 litro (Figura 3D). Para o preparo da ração contendo PS, 3800 g da ração pulverizada foram misturadas com 200 g do concentrado anteriormente

preparado e à mistura foi acrescentada, sob ação da batedeira planetária, quantidade suficiente da solução aglutinante de carmelose sódica a 2% (Figura 3E). Atingida a consistência adequada para a extrusão, a massa foi submetida à passagem pelo equipamento de extrusão (Figura 3F e 3G), sendo os pellets obtidos cortados em pedaços, distribuídos em bandejas (Figura 3H) e submetidos a secagem em estufa com circulação de ar a 50°C (Figura 3I).

Figura 3 - Processo de produção da ração com PS



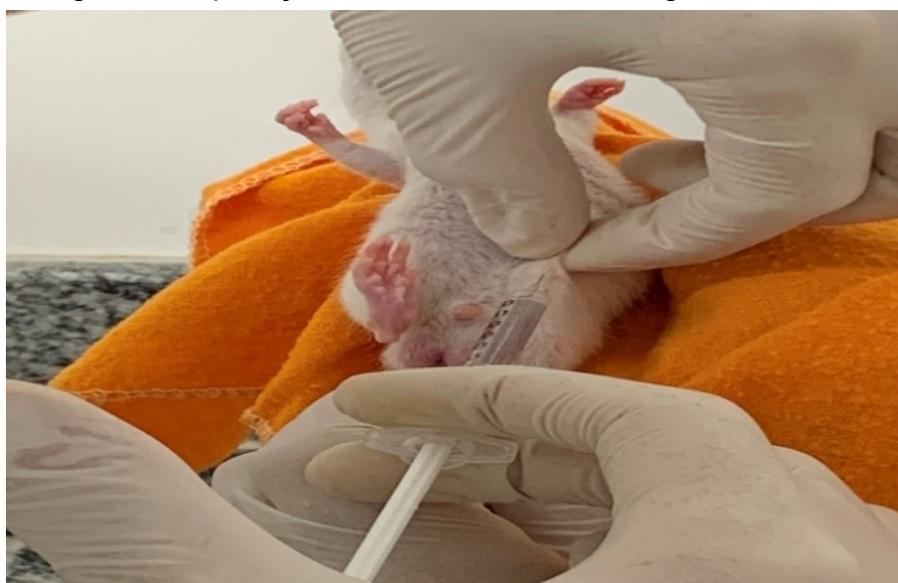
Fonte: Autoria própria.

## 5.6 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Os animais foram identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos de 12 ratos que foram separados em grupos de quatro por gaiola. O grupo Sham não teve a carcinogênese colorretal induzida, enquanto os grupos 1,2-DMH, 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO tiveram a carcinogênese induzida.

O carcinógeno 1,2-DMH (D161802; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em NaCl 0,9% (Ph 6,5) para obter uma dose de 20 mg/kg de peso corporal do animal. O grupo controle recebeu a dose equivalente de NaCl 0,9% sem adicionar o carcinógeno. O carcinógeno foi administrado por via subcutânea (Figura 4), uma vez por semana, pelo período de 15 semanas consecutivas (EL-KHADRAGY *et al.*, 2018; PATYAR *et al.*, 2017; SMERDU; PERSE, 2017). A aplicação ocorreu nos flancos, modificando os locais de aplicação para evitar lesões cutâneas.

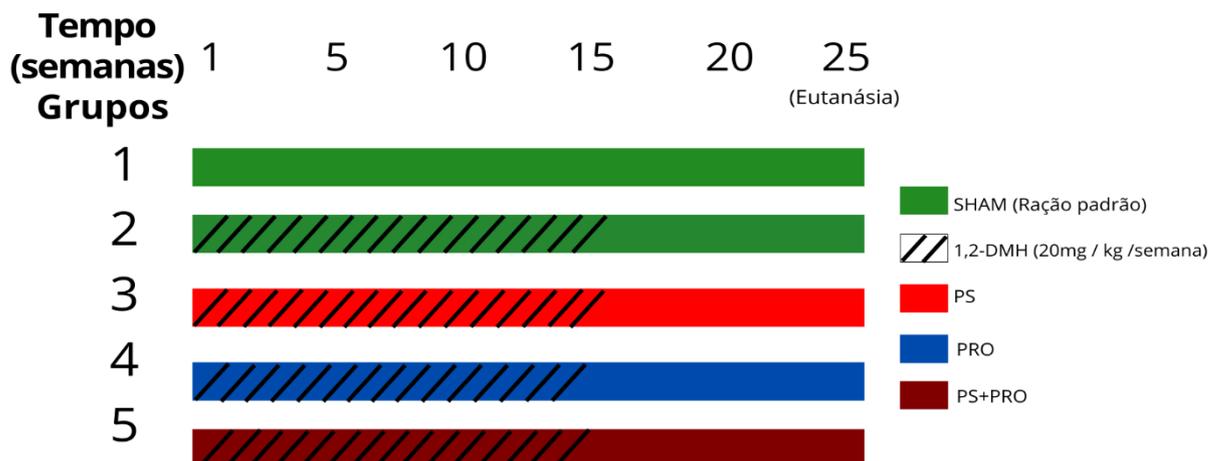
Figura 4 - Aplicação subcutânea do carcinógeno 1,2-DMH



Fonte: Autoria própria.

Seguindo a divisão dos grupos, as soluções com PRO (na água) e / ou PS (na dieta) foram administrados *ad libitum* a partir do primeiro dia da pesquisa até a eutanásia que ocorreu no final da 25ª semana do experimento. Na Figura 5 observa-se o desenho experimental da pesquisa.

Figura 5 - Desenho experimental



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

## 5.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E PREPARO DE AMOSTRAS

Os animais permaneceram recebendo ração e água *Ad libitum* até o início do ato operatório. Foram anestesiados, pela via intraperitoneal, com Cloridrato de cetamina a 10% (80mg/kg/peso) para indução e manutenção da anestesia geral e Cloridrato de Xilazina a 2% (10mg/kg/peso) para relaxamento muscular e analgesia. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre prancha de madeira e imobilizados pela fixação dos membros anteriores e caudais. Quando necessário uma maior sedação e relaxamento do animal,  $\frac{1}{4}$  da dose anestésica inicial foi aplicada. Após os animais serem considerados anestesiados e apresentarem ausência de sensibilidade dolorosa, foram submetidos à laparotomia xifo-pubiana para exposição da cavidade peritoneal. Posteriormente, foi realizada a proctocolectomia total e hepatectomia não anatômica do lobo direito do fígado. O colón ressecado teve 1 cm distal descartado. Posteriormente, os animais sobreviventes foram sacrificados por choque hipovolêmico após secção da aorta abdominal. A confirmação da eutanásia aconteceu pela verificação de ausência de movimentos respiratórios (apneia) e batimentos cardíacos (assistolia). A carcaça foi descartada em local apropriado.

O produto das proctocolectomias foi aberto longitudinalmente na borda antimesentérica para lavagem intestinal e estendido com a mucosa para cima. Após identificação de lesões macroscópicas e divisão do colón em três segmentos iguais (porção proximal, média e distal), os espécimes foram armazenados aleatoriamente

em solução de formalina tamponada a 10% (n =30) e em freezer a -80°C (n = 30). As amostras separadas para análise histológicas foram submetidas as etapas de fixação, desidratação, clareamento, inclusão na parafina e posteriormente à coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Em seguida, foram confeccionadas, também, lâminas histológicas coradas com azul de metileno (AM) na concentração de 0,1% (BIRD, 1987). Nas amostras congeladas, os segmentos distais do cólon foram usados para medir o EO.

## 5.8 VARIÁVEIS ANALISADAS

### 5.8.1 Macroscopia

A presença de lesões macroscópicas (LM) na mucosa do colón foi identificada e os resultados foram apresentados como número absoluto por grupo. As características das lesões não foram levadas em consideração e lesões polipoides receberam a mesma pontuação que lesões ulceradas e/ou infiltrativas.

### 5.8.2 Microscopia

O intestino foi dividido em três partes iguais (distal, médio e proximal). A mucosa cólica foi avaliada com microscópio óptico com ampliação na objetiva de 20x e 40X. Para avaliar as lâminas coradas com H&E foram analisados todos os segmentos do intestino utilizando os critérios de MacPherson e Pfeiffer (1978):

0, achados histológicos normais;

1, encurtamento das vilosidades, perda da arquitetura das criptas, infiltração esparsa de células inflamatórias, vacuolização e edema (<25%);

2, encurtamento das vilosidades, necrose de cripta, extensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema (25% a 50%);

3, encurtamento das vilosidades, necrose de cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema (>50%).

Para avaliar as lâminas coradas com AM foram fotografadas, aleatoriamente, 10 campos por segmento de intestino (distal, médio e proximal) no aumento de 400x. As criptas foram analisadas no corte transversal e os fatores analisados foram: o número de FCA e a localização no colón (distal, médio e proximal) (BRAGA *et al.*,

2019). Foram considerados FCA quando as criptas apresentavam pelo menos dois critérios: um tamanho de cripta aumentado, uma camada epitelial mais espessa, coloração mais intensa (devido ao aumento nuclear e depleção de mucina) (BIRD, 1987), aumento da zona pericripta, formato elíptico (BIRD; GOOD, 2000) e redução de células caliciformes maior que 50% (representa uma mudança epitelial importante da cripta) (ERBEN *et al.*, 2014). As FCA não foram classificadas como hiperplásicas e displásicas.

### 5.8.3 Imunohistoquímica pela Técnica de Tissue Microarray (TMA)

Seis fragmentos cilíndricos do cólon distal foram coletados de cada rato a partir de blocos de parafina. O material foi coletado com agulha de 2 mm de diâmetro (Quick-Ray UNITMA®, Seongnam-si, República da Coreia) para oferecer boa amostragem, facilitar a construção do bloco receptor e evitar danos ao bloco doador. Em seguida, o material foi incluso em três blocos de parafina com 70 poços. Nos mesmos blocos, foram incluídos tecidos de colón com câncer ou não para servir como controle positivo para reações de IHQ. Seções sequenciais de 3 µm de espessura do bloco de Tissue microarray foram depositadas em lâminas de vidro silanizadas para coloração convencional de H&E e reações de IHQ.

As IHQ para as proteínas Ki67, β-catenina, Wnt3a, p53, NF-kB, iNOS, IL1-β e TNF-α foram realizadas utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981; HSU; RAINE; FANGER, 1981). Nesta técnica as lâminas foram desparafinizadas, hidratados em xilol e álcool e imersas em tampão retrieval solution de pH ácido ou básico. Em seguida, a recuperação antigênica ocorreu por 30 minutos a 95°C em meio automatizado (PT-LINK). Após o resfriamento, foram feitas lavagens com solução *wash buffer* (DAKO), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (20 minutos). Os cortes foram incubados por 1h com anticorpo primário de cabra anti-KI67 ab15580 (Abcam, 1:200), anti-beta-catenina ab32572 (Abcam, 1:200), Wnt3a PAS37320 (Invitrogen, 1:500), P53 IS616 (Flex, Dako), anti-NFKB p65 ab16502 (Abcam, 1:200), anti-iNOS ab283655 (Abcam, 1:200), anti-IL1-β ab283818 (Abcam, 1:100) e TNF-α ab307164 (Abcam, 1:100) diluído em diluente de anticorpo. Após a lavagem em solução *wash buffer*, a incubação com polímero HRP (DAKO) por 30 minutos. Novamente os cortes foram lavados com *wash buffer* e seguiu-se a coloração com o

cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (SCOPSI; LARSSON, 1986) e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima e incubados apenas com soro diluente.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (Leica DM1000, Wetzlar, Alemanha). Foram fotografados 10 campos por corte histológico (objetiva de 40x), procurando selecionar as áreas com maior marcação em cada animal (áreas quentes). Para a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 a fim de obter a área total do tecido e área imunomarcada. Foram consideradas células positivas marcadas com coloração marrom no citoplasma para iNOS, NF-kB, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e Wnt3a e dentro do núcleo para Ki67 e ambos para P53 e  $\beta$ -catenina. Foi considerada a marcação mais evidente da proteína, evitando o *background*. Em seguida para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo: Área marcada (%) = Área imunomarcada (pixels) x 100 / Área total (pixels) (BREY *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2019).

#### 5.8.4 Estresse oxidativo

Amostras do segmento distal do intestino grosso foram descongeladas e homogeneizadas em EDTA (0,02 M) frio ou KCL (0,15 M) para preparar uma suspensão homogeneizada a 10% e estimar os níveis de GSH e MDA (produtos do EO). Os níveis de GSH no tecido foram estimados pelo método de Sedlak (SEDLAK; LINDSAY, 1968), com pequenas modificações. Alíquotas de 100  $\mu$ L de tecido homogeneizado foram misturados com 80  $\mu$ L de água destilada e 20  $\mu$ L de ácido tricloroacético (50%, p/v) e centrifugado por 4500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (100  $\mu$ L) foi misturado com 200  $\mu$ L de tampão TRIS (0,4 M, Ph 8,9) e 10  $\mu$ L de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA). A absorvância de GSH foi lida em 412 nm, utilizando um reagente de controle (sem o homogenato). A concentração foi expressa em mg /g de tecido (RAMOS *et al.*, 2020).

Para determinar o nível de MDA nos tecidos foi utilizado o ensaio do ácido 2-tiobarbitúrico que monitora o nível de POL em amostras biológicas (DOMIJAN *et al.*, 2015; OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Alíquotas de 125  $\mu$ L de tecido homogeneizado

foram misturados com 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 1% e 250  $\mu\text{L}$  de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,6% e incubado por 1 hora em banho a  $100^\circ\text{C}$ . Em seguida, a solução foi resfriada em gelo por 20 minutos e foi adicionado 1 ml de n-butanol. A mistura foi centrifugada (2000 rpm, 15 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante em placas de 96 poços para leitura da absorbância a 535 nm, utilizando um reagente de controle (sem o homogenato). A concentração de MDA foi expressa em nmol/mg de tecido.

## 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

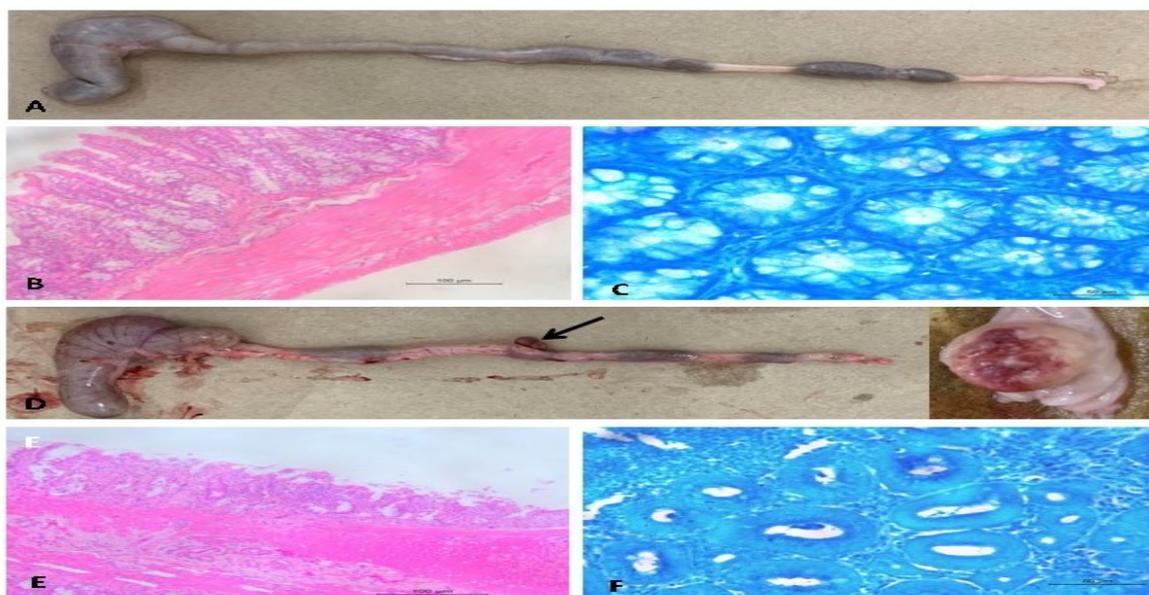
A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 6.0. Para a avaliação da normalidade utilizou-se o teste Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste de análise de variância ANOVA One-Way seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunns. O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes. Todos os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto os dados dos scores histopatológicos e o número de FCA foram apresentados como mediana, mínimo e máximo.

## 6 RESULTADOS

Foram estudados 60 ratos wistar e analisados os seguintes parâmetros: LM, escore de inflamação histopatológica, número e localização dos FCAs, EO e expressão de proteínas relacionadas a inflamação e ao desenvolvimento do CCR.

Na Figura 6, observam-se imagens representativas do intestino grosso (Figura 6A e 6D) e secções de colón coradas com H&E (Figura 6B e 6E) e AM (Figura 6C e 6F). Observa-se imagens do grupo SHAM (Figura 6A-6C) e imagens do grupo 1,2-DMH (Figura 6D-6F). Na figura 6A, o intestino grosso está repleto de fezes e sem tumorações visíveis na análise macroscópica, enquanto a figura 6D mostra uma tumoração no 1/3 médio do intestino grosso e na ampliação da lesão observa-se uma tumoração que possui sinais de ulceração na mucosa. O grupo SHAM apresenta o colón com criptas sem alterações morfológicas, células caliciformes e enterócitos preservados. O grupo 1,2-DMH apresenta nas imagens do colón a presença de multiplicidade de FCA com coloração mais intensa devido à depleção de mucina, infiltrado de células inflamatórias e marcante redução das células caliciformes.

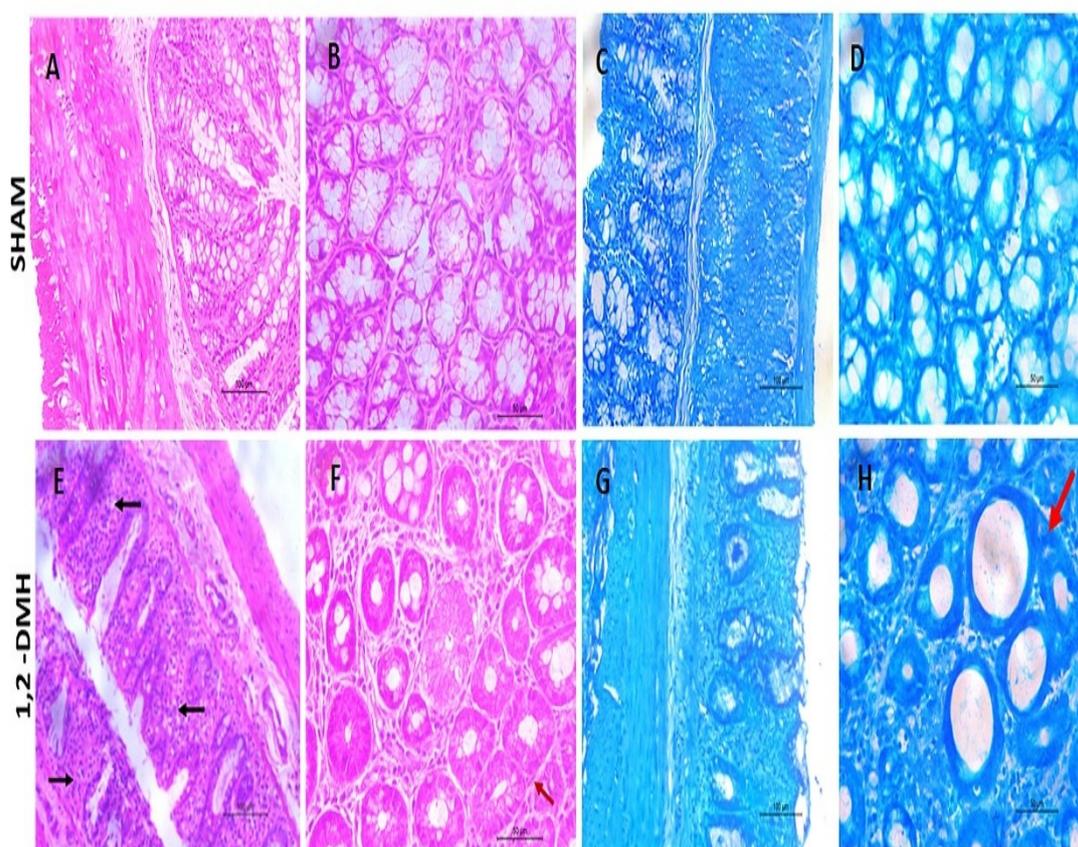
Figura 6 - Produto de proctocolectomia total e secções de cólon coradas com H&E e AM de ratos dos grupos SHAM e 1,2-DMH



As figuras 6B e 6E foram ampliadas com objetiva de 20× (barra de escala 100 µm) e corte longitudinal. As figuras 6C e 6F estavam com ampliação da objetiva de 40× (barra de escala 50 µm) e corte transversal. Seta preta — LM com aparência de tumoração ulcerada.

A Figura 7 mostra as imagens representativas das secções do cólon coradas com H&E e AM. No grupo Sham (Figuras 7A-7D) foram observadas criptas normais, mostrando células caliciformes e enterócitos preservados e ausência de infiltrado inflamatório patológico e edema na mucosa, submucosa e camada muscular. No grupo 1,2-DMH (Figuras 7E-7H), observa-se uma perda acentuada da arquitetura tecidual, redução das células caliciformes, aumento da infiltração de células inflamatórias, alargamento da zona pericripta e criptas altamente coradas.

Figura 7 - Micrografia de secções de cólon coradas com H&E e AM



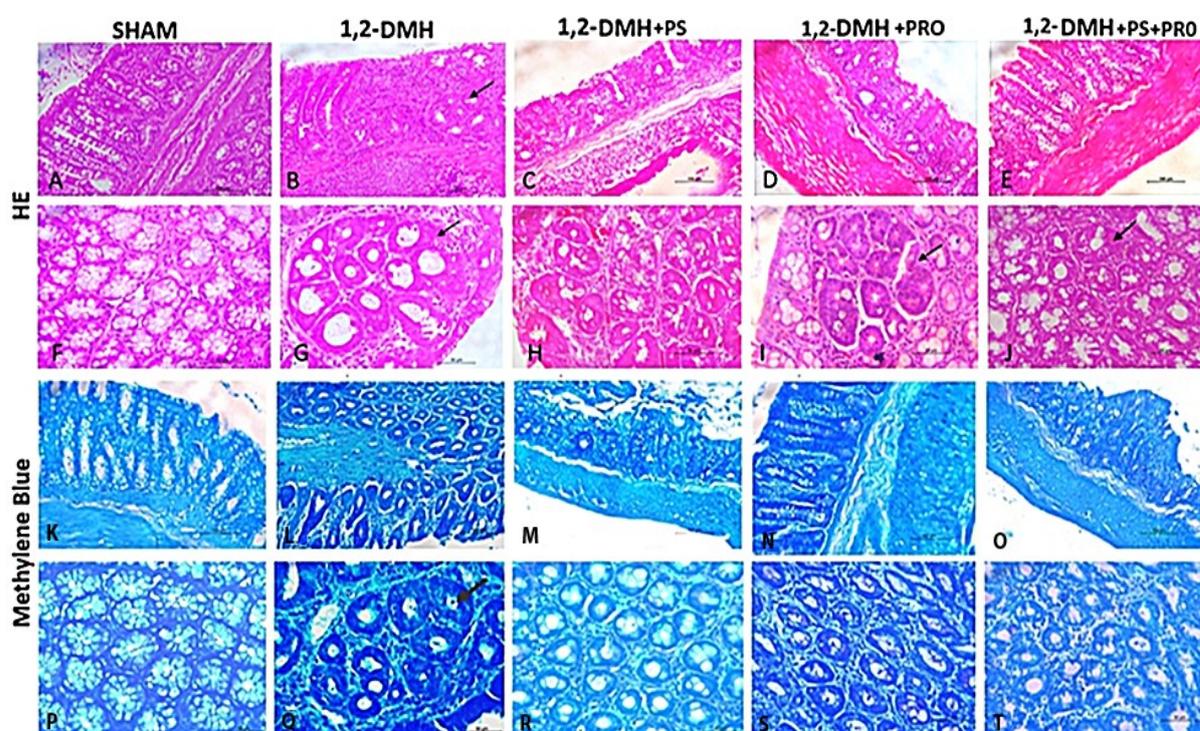
As figuras 7A, 7C, 7E e 7G foram ampliadas com a objetiva de 20× (barra de escala 100 µm) e corte longitudinal. As figuras 7B, 7D, 7F e 7H estavam com ampliação da objetiva de 40× (barra de escala 50 µm) e corte transversal. Seta preta — presença de infiltrado de células inflamatórias. Seta vermelha — presença de multiplicidade de FCA.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A Figura 8 mostra as imagens representativas das secções do cólon de todos os grupos do experimento nas colorações de H&E e AM. Observa-se por microscopia a histopatologia normal do colón e alterações observadas após a indução da CI com 1,2-DMH. No grupo 1,2-DMH, visualiza-se uma perda acentuada da arquitetura

tecidual e redução das células caliciformes. Além disso, nota-se um aumento da infiltração de células inflamatórias, alargamento da zona pericriptosa e criptas altamente coradas. O grupo 1,2-DMH + PS não apresenta melhorias significativas nos escores histopatológicos. Os grupos PRO (1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO) apresentaram células caliciformes mais preservadas e redução de células inflamatórias. No entanto, FCAs também são observados nos grupos suplementados com PRO.

Figura 8 - Histopatologia dos grupos experimentais



As figuras 8A–8E e 8K–8O são ampliadas com a objetiva de 20× (barra de escala 100 µm) e corte longitudinal. As figuras 8F–8J e 8P–8T estão com ampliação da objetiva de 40× (barra de escala 50 µm) e corte transversal. Seta preta — a presença de um agregado de ACF com coloração mais intensa devido ao alargamento nuclear e depleção de mucina.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Na Tabela 1, podemos visualizar o número de lesões ou tumorações visualizadas no espécime cirúrgico. O Grupo 1,2-DMH apresenta aumento de lesões macroscópicas em relação ao grupo SHAM, mas os grupos que fizeram suplementação de PS e/ou PRO não mostram uma redução significativa nas LM.

Tabela 1 - Número de tumorações macroscópicas encontradas no espécime cirúrgico

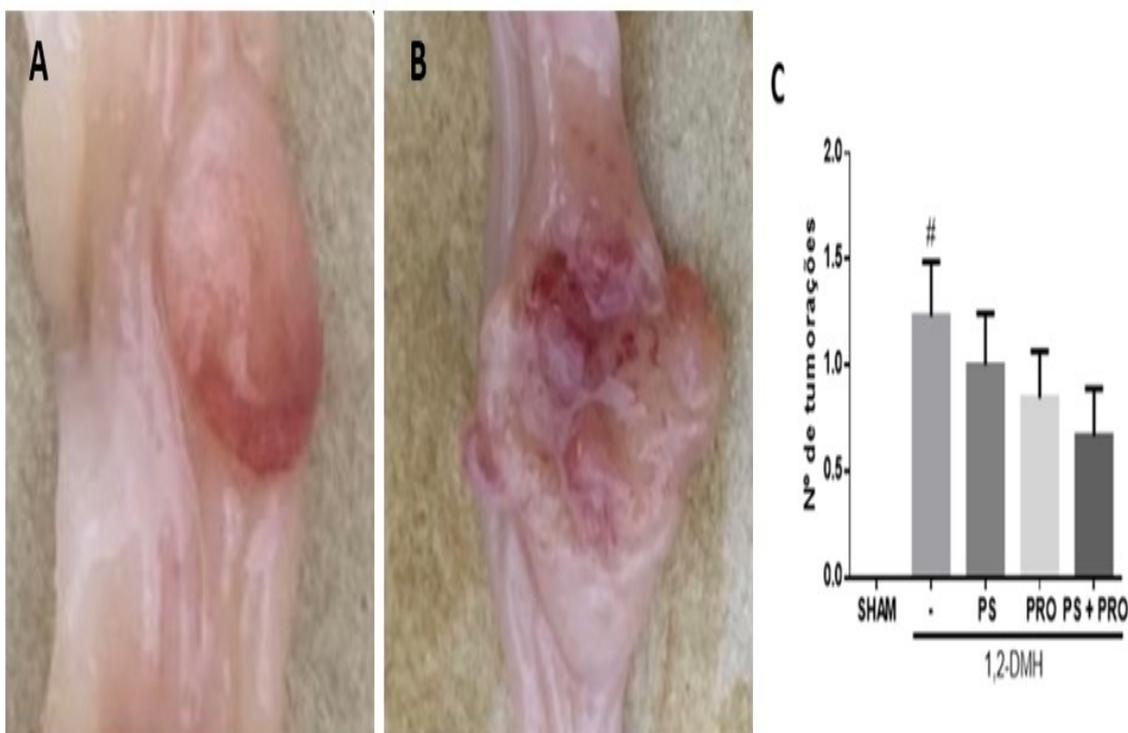
	Grupos Experimentais				
	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO
Número de tumorações no cólon	0,0 (0-0)	2,0 (0-2)#	1 (0-2)	1 (0-2)	0,5 (0-2)

Os valores foram expressos em como mediana, mínimo e máximo, onde #  $p < 0,05$  vs Sham. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Duuns.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Observa-se o aspecto de lesões macroscópicas identificadas após a proctocolectomia total (Figuras 9A e 9B). O Grupo 1,2-DMH apresenta aumento de lesões macroscópicas em relação ao grupo SHAM e os grupos que fizeram suplementação de PS e/ou PRO não mostram redução nas lesões macroscópicas (Figura 9C).

Figura 9 - Aspecto e quantidade de lesões macroscópicas identificadas no cólon



A figura 9A mostra uma LM com aparência polipoide e a figura 9B uma LM com aparência ulcerada. Na figura 9C observa-se o número de LM identificadas no espécime cirúrgico. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Duuns, onde #  $p < 0,05$  vs SHAM.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A Tabela 2 mostra a média de FCA identificados por campo nos três segmentos do intestino grosso. Nos segmentos médio e distal do intestino grosso, o grupo 1,2-DMH mostrou uma elevada média de FCA por campo em relação ao grupo SHAM. No segmento distal do cólon, foi observada uma redução no número de FCA por campo no grupo 1,2-DMH + PRO, enquanto no segmento medial do cólon a redução dos FCA por campo foi observada nos grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO. O grupo 1,2-DMH + PS não foi capaz de reduzir número de FCA por campo em relação ao grupo 1,2-DMH. As substâncias utilizadas não apresentam capacidade de reduzir o número de FCA por campo no segmento proximal do cólon.

Tabela 2 - Número de FCA / campo nos segmentos do cólon

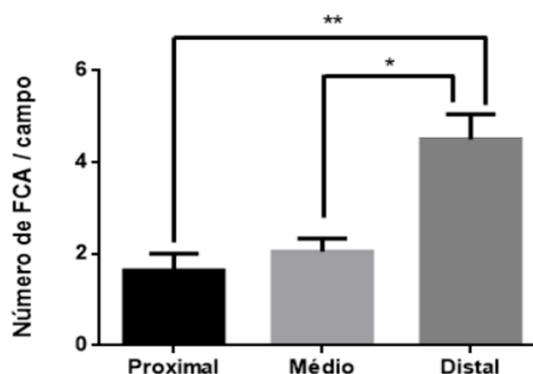
Segmentos intestinais	Grupos Experimentais				
	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO
Proximal	0,0 (0-0,1)	1,8 (0,5-3,0)	0,5 (0-2)	0,5 (0-2)	0,5 (0-1)
Médio	0,0 (0-1)	1,9 (1,4-3,0)#	1,0 (0- 2,8)	0,126 (0-1,4)*	0,25 (0-1)*
Distal	1,1 (0,3-2)	4,3 (3-6) #	2,25 (1-5)	2,0 (0,5-3,33)*	3,0 (1-5)

Os valores foram expressos em como mediana, mínimo e máximo, onde #  $p < 0,05$  vs SHAM e \*  $p < 0,05$  vs 1,2-DMH. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Duuns.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

No grupo 1,2-DMH, o segmento distal do intestino grosso apresenta maior número de FCA por campo em relação aos outros dois segmentos (Figura 10). Por isso, procurou-se investigar esta região com mais detalhes através da dosagem de marcadores relacionados ao EO, inflamação e desenvolvimento do CCR.

Figura 10 - Número de FCA por campo nos segmentos do cólon de ratos do grupo 1,2-DMH



Os dados foram expressos como valor mediano, mínimo e máximo, onde \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  vs grupo 1,2-DMH. Foi utilizado o teste t com pós teste Mann-Whitney para estes dados, considerando o valor de  $p < (0,05)$ .

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

O grupo 1,2-DMH apresenta *score* inflamatório maior que o grupo SHAM. Nos segmentos médio e distal do cólon, a redução do *score* inflamatório foi evidente nos grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO. A redução do *score* inflamatório foi mais intensa no segmento distal do cólon. O grupo 1,2-DMH + PS não é capaz de reduzir o *score* inflamatório, em nenhum segmento colônico, em relação ao grupo 1,2-DMH. As substâncias utilizadas não são capazes de reduzir os *scores* inflamatórios no segmento proximal do cólon (Tabela 3).

Tabela 3 - *Score* histopatológico de inflamação nos segmentos do cólon

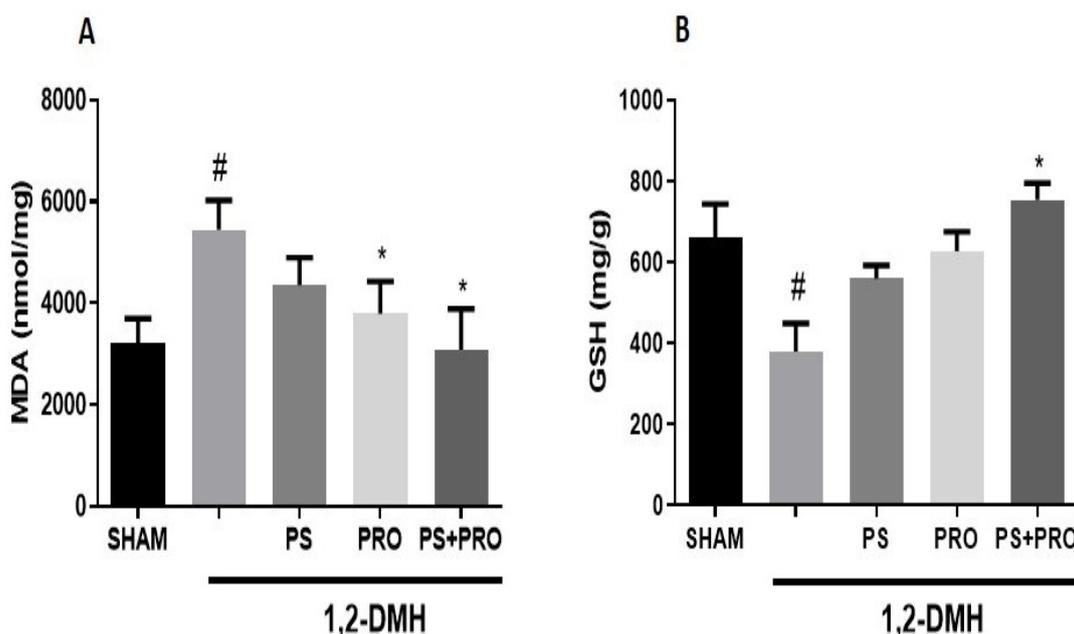
Segmentos intestinais	Grupos Experimentais				
	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO
Proximal	1 (0-1)	3 (1-3) #	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-2)
Médio	0 (0-1)	2 (1-3) #	2 (0-2)	1 (1-2)*	1 (0-2)*
Distal	0 (0-1)	3 (2-3) #	2 (1-3)	1 (1-2)**	2 (1-2)**

Os *scores* foram expressos como valor mediano, mínimo e máximo, onde #  $p < 0,05$  vs SHAM e \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs grupo 1,2-DMH. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Duuns.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A concentração tecidual de MDA é maior no grupo 1,2-DMH em comparação com o grupo SHAM. A suplementação de PRO e PS + PRO reduz significativamente a concentração tecidual de MDA no segmento distal do cólon (Figura 11A). A concentração tecidual de GSH é significativamente menor no grupo 1,2-DMH, um efeito que é melhorado pela suplementação composta de PS + PRO (Figura 11B).

Figura 11 - Análise do dano oxidativo pela mensuração da concentração de MDA e GSH no segmento distal do cólon



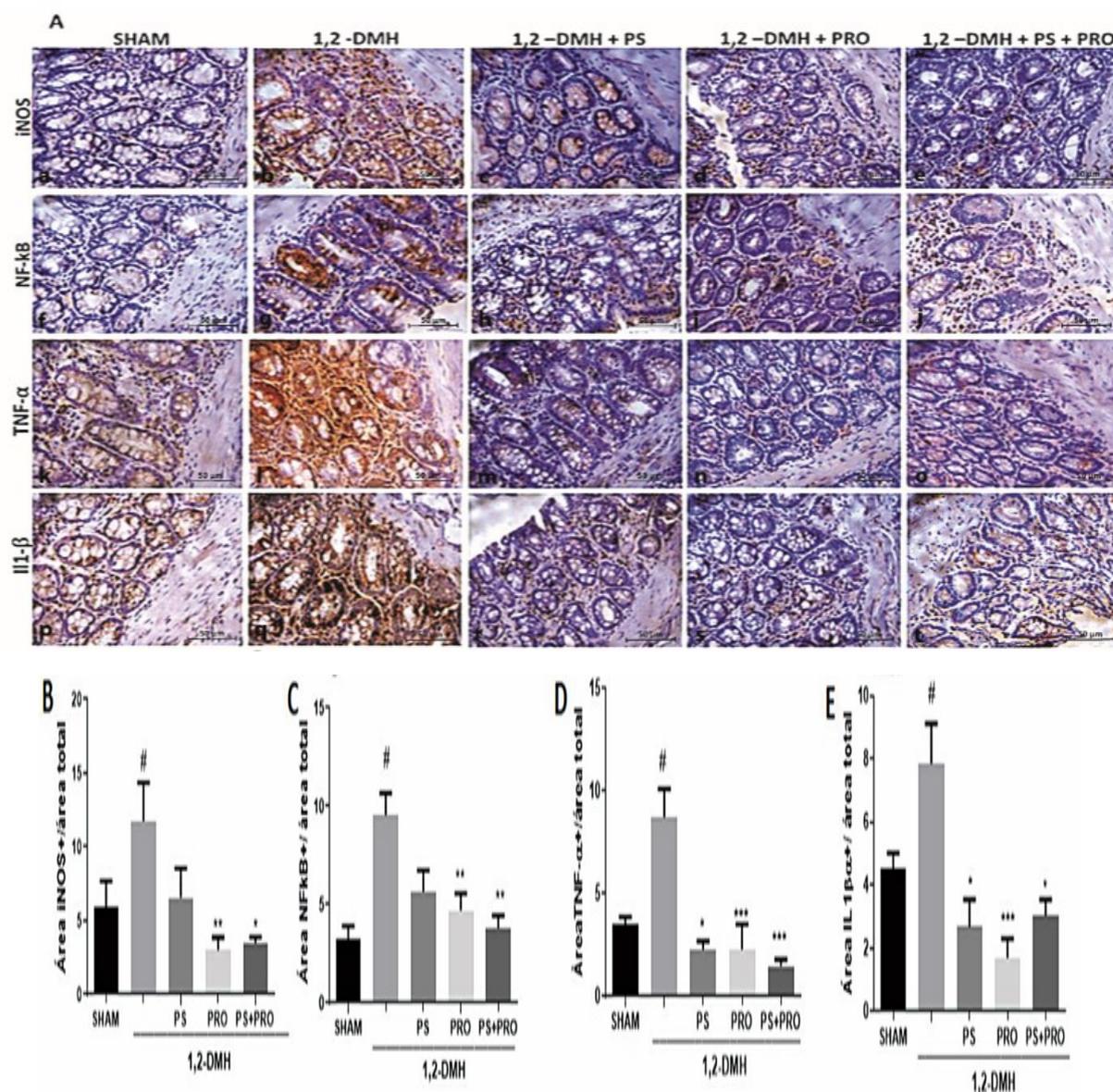
Concentrações teciduais de MDA (Figura 11A) e GSH (Figura 11B) no segmento distal do cólon. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM. #  $p < 0,05$  vs Sham e \*  $p < 0,05$  vs grupo 1,2-DMH. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A imunomarcção das proteínas iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  está presente em todos os grupos do experimento (Figura 12A). Existe diferença significativa entre o grupo 1,2-DMH e o grupo Sham em relação à expressão das proteínas iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ . A imunomarcção de iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos grupos de tratamento não é diferente do grupo Sham. A imunomarcção das proteínas iNOS e NF-kB é reduzida nos grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO em relação ao grupo 1,2-DMH. O grupo 1,2-DMH + PS não é capaz de alterar significativamente a expressão das proteínas iNOS e NF-kB em relação ao grupo 1,2-DMH (Figuras 12B e 12C). A imunomarcção das proteínas TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  é reduzida nos grupos 1,2-

DMH + PS, 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO em relação ao grupo 1,2-DMH (Figuras 12D e 12E).

Figura 12 - Imunoexpressão das proteínas iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  no segmento distal do cólon

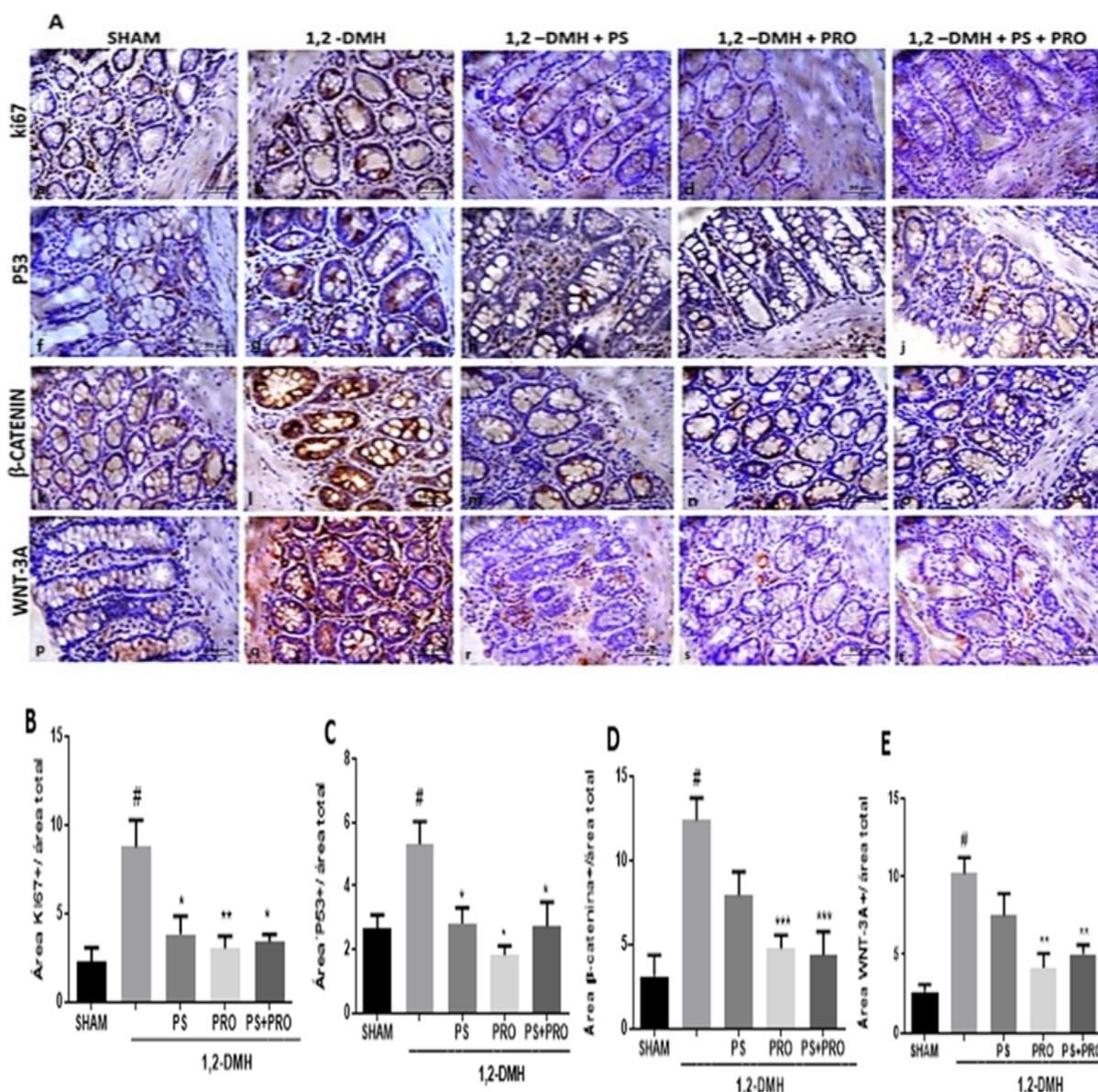


Na figura 12A observa-se a histologia representativa da imunomarcção de iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  nos grupos experimentais. Os gráficos 12B a 12E representam a média  $\pm$  SEM da porcentagem da área imunopositiva para iNOS, NF-kB, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  em relação à área total. #  $p < 0,05$  vs. Sham e \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo 1,2-DMH. Nas figuras 12B e 12D, os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Nas figuras 12C e 12E, os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A imunomarcção das proteínas Ki67, P53,  $\beta$ -catenina e Wnt-3a é mais evidente nas criptas intestinais e presentes em todos os grupos do experimento (Figura 13A). Existe uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1,2-DMH e o grupo Sham em relação à expressão das proteínas Ki67, P53,  $\beta$ -catenina e Wnt-3a. A imunoexpressão das proteínas Ki67 e P53 é reduzida nos grupos 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO em relação ao grupo 1,2-DMH (Figuras 5B e 5C). A imunoexpressão das proteínas  $\beta$ -catenina e Wnt-3a é reduzida nos grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO em relação ao grupo 1, 2-DMH. O grupo 1,2-DMH + PS não é capaz de alterar significativamente a expressão das proteínas  $\beta$ -catenina e Wnt-3a em relação ao grupo 1,2-DMH (Figuras 5D e 5E).

Figura 13 - Imunoexpressão das proteínas Ki67, P53,  $\beta$ -catenina e Wnt-3a no segmento distal do cólon



Na figura 13A observa-se a histologia representativa da imunomarcação das proteínas Ki67, P53,  $\beta$ -catenina e Wnt-3a nos grupos experimentais. Os gráficos 13B a 13E representam a média  $\pm$  SEM da porcentagem da área imunopositiva para Ki67, P53,  $\beta$ -catenina e Wnt-3a em relação à área total. #  $p < 0,05$  vs. Sham e \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo 1,2-DMH. Nas figuras 13B e 13C, os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Nas figuras 13D e 13E, os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

## 7 DISCUSSÃO

A carcinogênese é um processo de três etapas: iniciação, promoção e progressão. Este processo envolve uma série de alterações que podem ser evitadas ou atenuadas com o uso de alimentos (SHU *et al.*, 2010). São mecanismos pelos quais substâncias naturais podem ter ação contra o câncer: efeito anti-inflamatório, atividade antioxidante, modulação de diferentes enzimas, inibição da proliferação celular, indução de genes supressores de tumor, indução da parada do ciclo celular, apoptose, inibição das vias de transdução de sinal, efeito anti-angiogênico, inibição da adesão, migração e invasão celular (CIRMI *et al.*, 2016; RAVISHANKAR *et al.*, 2013). Alguns desses mecanismos foram explorados para analisar o efeito da suplementação de PS e / ou PRO na prevenção primária do CCR.

FCAs são lesões precursoras do CCR que possuem mutações genéticas críticas para a formação e progressão do tumor. Ao estudar essas lesões pode ser possível aprender mais sobre as causas da carcinogênese do cólon (CHENG; LAI, 2003). A prevalência e o número médio de FCAs aumentam significativamente com o estágio da sequência adenoma-carcinoma. Os FCAs podem ser úteis como um biomarcador substituto confiável para a CI (SAKAI *et al.*, 2011). O número de FCA é um fator preditivo da incidência de adenomas colorretais e CCR (ANDERSON *et al.*, 2012; TAKAHASHI *et al.*, 2012). Um trabalho com 861 pessoas submetidas à colonoscopia de alta resolução com cromoscopia foi realizado para investigar a associação dos FCA e a CI. Os indivíduos foram separados em três grupos: pessoas com colonoscopia normal (383), com achados de adenoma (372) e com diagnóstico de CCR (106). Encontrou-se uma prevalência de FCA de 64%, 88% e 95% e um número médio de FCA de 3.6, 6.2 e 10.1 para pessoas com colonoscopia normal, com achados de adenoma e com diagnóstico de CCR. Desta forma, pode-se constatar que o número médio de FCA aumentou significativamente com o estágio da sequência de adenoma-carcinoma, colaborando para o seu uso como biomarcador do CCR (SAKAI *et al.*, 2011). Alguns estudos revelaram associações significativas entre o número de FCA e a presença sincrônica de adenoma e CCR (TAKAYAMA *et al.*, 1998; RUDOLPH *et al.*, 2005). O presente estudo confirmou um número maior de FCAs e LM no grupo que teve o CCR induzido com 1,2-DMH em relação ao grupo Sham. A suplementação de PRO e PS + PRO reduziu o número de FCAs. Não ocorreu redução no número de LM com a suplementação de PS e /ou PRO.

A incidência de FCA é maior no segmento distal do cólon (BURLAMAQUI *et al.*, 2010). Um estudo utilizou 2 aplicações de AOM (15 mg/kg/semana) para a indução do CCR e após um acompanhamento de 16 semanas foram quantificados os FCAs. O número de FCA foi maior no colón distal ( $43.17 \pm 16.46$ ) em relação ao proximal ( $2.33 \pm 3.83$ ) e médio ( $23.83 \pm 18.00$ ) (BRAGA *et al.*, 2019). Os resultados deste estudo, também, mostram uma diferença significativa entre o número de FCAs no colón distal e proximal. A relação entre o número de FCA entre o colón distal e médio foi menos acentuada, mas significativa. Os protocolos experimentais e diferentes espécies de animais podem interferir na distribuição dos FCAs (CARTER *et al.*, 1994; TUDEK; BIRD; BRUCE, 1989). Como esperado, os dados indicam que o maior número de FCAs está localizado no segmento distal do cólon. Dessa forma, as análises foram realizadas no segmento distal do colón.

O escore de inflamação histopatológica de MacPherson e Pfeiffer tem sido usado em pesquisas experimentais para quantificar a intensidade do processo inflamatório agudo do cólon (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978). Curiosamente, observa-se uma associação entre o número de FCA e a intensidade do processo inflamatório. Os resultados indicam que tanto a suplementação de PRO quanto a suplementação combinada de PRO e PS melhoram o escore inflamatório. O aumento do estresse inflamatório estimula o crescimento de células adenomatosas (PIERRE *et al.*, 2015) e evidências crescentes sugerem que aproximadamente 25% das neoplasias tenham sido associadas à infecção crônica e à inflamação (HUSSAIN; HARRIS, 2007). As neoplasias relacionadas com a inflamação se desenvolvem na maioria dos órgãos (Exemplos: estômago, fígado, pâncreas bexiga, colón) (KANDA; OSAKI; OKADA, 2017) e os pacientes com evolução crônica da doença inflamatória intestinal apresentam um risco aumentado de CCR (PEYRIN-BIROULET *et al.*, 2012).

A inflamação prolongada é associada a um EO intenso e produção de ROS que provocam danos oxidativos e nitração de bases de DNA, aumentando o risco de mutações de DNA e, conseqüentemente, o aparecimento de neoplasias (ACHITEI *et al.*, 2013; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014). O EO no DNA de células da mucosa cólica representa um dos fenômenos iniciais da carcinogênese colorretal. Ocorrem com maior intensidade após a flexura esplênica do colón e nos estádios mais precoces da classificação de Dukes (RIBEIRO *et al.*, 2007). Os produtos resultantes da peroxidação lipídica (POL) são parâmetros importantes para o monitoramento do dano causado por ROS em lipídeos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Dos muitos alvos biológicos do EO, os lipídios são a classe de biomoléculas mais envolvida. A oxidação lipídica dá origem a uma série de produtos secundários. O MDA é o principal e mais estudado produto da PL. O MDA é considerado uma molécula tóxica e que eleva o risco de mutação (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). É o indicador mais popular de dano oxidativo em células e tecidos (TSIKAS, 2017). Em pesquisas, a dosagem do MDA tem sido utilizada como um biomarcador do EO e a sua elevação está relacionada ao desenvolvimento de neoplasias (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). O CCR é associado ao aumento do dano oxidativo a proteínas e lipídios. Alguns marcadores do EO podem ser potenciais indicadores do avanço do CCR. A concentração tecidual de MDA é significativamente maior no CCR do que em controles saudáveis (AGHAMOHAMMAD *et al.*, 2022; GOPČEVIĆ *et al.*, 2013; SALEHI; HOSSEINI; KAZEMI, 2022; SHAKIB KHOOB; HOSSEINI; KAZEMI, 2022; SINGH *et al.*, 2014; ZINCZUK *et al.*, 2019). Os níveis de MDA parecem ter relação com a profundidade de invasão tumoral e a presença de metástase linfonodal (ZINCZUK *et al.*, 2019). A concentração de MDA e óxido nítrico (ON) total estão elevados no colón de ratos submetidos a IC com 1,2-DMH (HASSAN *et al.*, 2021).

O GSH é um importante antioxidante não-enzimático, solúvel e altamente abundante em todos os compartimentos celulares do corpo (BIRBEN *et al.*, 2012). O GSH é fundamental para o funcionamento de vários processos biológicos importantes e possui papel central na defesa das células contra o EO (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A concentração de GSH tecidual é significativamente menor no CCR do que nos controles saudáveis (ZINCZUK *et al.*, 2019).

Neste estudo a concentração tecidual de GSH no colón está reduzida e a concentração tecidual de MDA está elevada no colón distal dos animais submetidos a indução do CCR com 1,2-DMH. A suplementação combinada de PRO + PS reduz a concentração de MDA e eleva a concentração de GSH. A suplementação isolada de PRO reduz a concentração de MDA, mas sem alteração na concentração de GSH. O microbioma intestinal pode ser uma fonte de EO e levar o dano genotóxico para as células epiteliais do cólon (STONE *et al.*, 2014). A cerpa *B. lactis* A6 parece atenuar o EO através da redução nos níveis de MDA e elevação nos níveis de GSH nos tecidos colônicos. Além disso, pode atenuar a resposta inflamatória intestinal através da regulação negativa de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 nos tecidos colônicos (WANG *et al.*, 2022).

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são duas citocinas pró-inflamatórias relacionadas à patogênese do CRC (BOUSSEROUËL *et al.*, 2010) e níveis altos sustentados dessas citocinas podem preceder o aparecimento de lesões precursoras do CCR (KAUNTZ *et al.*, 2012). Entre os parâmetros mais utilizados para avaliar um modelo experimental de indução da CI associada a colite estão os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1, Ki-67 e avaliação histológica da inflamação (MODESTO *et al.*, 2022). TNF- $\alpha$  e IL-1 promovem processos inflamatórios e tumorigênicos através do estímulo a via NF-kB / COX-2, ocasionando proliferação celular, angiogênese e inibindo a apoptose no CCR (TORRES-MARAVILLA *et al.*, 2021). O desenvolvimento do CCR associado a colite tem sido relacionado a superprodução de várias citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-10 (LANDSKRON *et al.*, 2014). Entre as citocinas pró-inflamatórias que promovem o desenvolvimento tumoral, o TNF- $\alpha$  e a IL6 desempenham um papel importante na iniciação, promoção e progressão das neoplasias (GRIVENNIKOV; KARIN, 2011). Em um modelo de indução de CI com 1,2-DMH e DSS, observou-se uma elevação na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 (GUO; GAO, 2022). Níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  e IL6 mostram uma relação com maior risco de adenomas colorretais em homens (KIM *et al.*, 2008) e a supressão da sinalização do TNF- $\alpha$  mostrou redução no número e tamanho de pólipos em um modelo animal (GOUNARIS *et al.*, 2008). Os resultados mostram que a suplementação de PS e / ou PRO reduz a imunomarcagem de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido do colón a níveis próximos ao observado no grupo Sham. A via TNF- $\alpha$  / NF-kB ativada acima de um limiar pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (OSHIMA, H.; OSHIMA, M., 2012).

O microambiente inflamatório exibe uma sinalização ativa da via NF-kB (QUANTE *et al.*, 2013) e a ativação crônica do NF-kB está associado ao aumento da sobrevivência de células tumorais. Genes regulados pelo fator de transcrição NF-kB estão relacionados com a mediação da inflamação, transformação celular, sobrevivência de células tumorais, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (PRASAD *et al.*, 2010). A regulação da via NF-kB tem um importante papel na carcinogênese pelo fato de sua supressão inibir o crescimento de células tumorais (CHATURVEDI *et al.*, 2011).

O motivo do NF-kB ser constitutivamente e persistentemente ativo em células cancerígenas não é totalmente compreendido, mas múltiplos mecanismos têm sido descritos. A ativação desta via de sinalização pode ocorrer através de uma agente específico (vírus, proteínas, bactérias e citocinas), intermediários de sinalização

(receptores mutantes, superexpressão de quinases, oncoproteínas mutantes, histona desacetilase e iNOS) e *cross talk* entre NF- $\kappa$ B e outros fatores de transcrição (STAT3,  $\beta$ -catenina, p53). Logo, é pouco provável que se consiga uma supressão eficaz da via NF- $\kappa$ B através da ação em um gene mutado ou uma via isolada (CHATURVEDI *et al.*, 2011).

A regulação cruzada entre as vias de sinalização Wnt e NF- $\kappa$ B é importante para a regulação de um conjunto diversificado de genes e vias ativas relacionadas com a inflamação crônica e tumorigênese (DU; GELLER, 2016; JRIDI *et al.*, 2021; KUMAR; AGNIHOTRI, 2021; MA; HOTTIGER, 2016). A sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina exerce efeito antiinflamatório ou pró-inflamatório através da ação na inibição ou ativação da via NF- $\kappa$ B. Da mesma forma, a via NF- $\kappa$ B regula positiva ou negativamente a sinalização da via Wnt /  $\beta$ -catenina. Dependendo do contexto celular ou do tecido pode ser observado uma regulação cruzada positiva ou negativa. A sinalização de NF- $\kappa$ B regula diretamente a via Wnt /  $\beta$ -catenina através da interferência na formação do complexo transcricional  $\beta$ -catenina / Fator de Células T / p300. (MA; HOTTIGER, 2016). A  $\beta$ -catenina e o NF- $\kappa$ B podem ativar a expressão do iNOS através de uma regulação cruzada entre estas duas vias (DU; GELLER, 2016). O ON derivado da iNOS regula as funções endoteliais da  $\beta$ -catenina, provoca a nitratação da  $\beta$ -catenina endotelial, influencia a associação com as proteínas TCF e induz a translocação para o núcleo (GONZALEZ *et al.*, 2012). O grupo 1,2-DMH eleva a expressão das proteínas iNOS, NF- $\kappa$ B, Wnt e  $\beta$ -catenina que parecem ter relação com um ambiente inflamatório crônico e processo de carcinogênese do cólon.

As mutações no gene APC são as mais prevalentes alterações genéticas encontradas no CCR (POWELL *et al.*, 1992) e ocorrem precocemente durante a tumorigênese do CCR (KINZLER; VOGELSTEIN, 1996). Grande parte dos tumores de cólon se desenvolve por causa de mutações no APC que levam a sinalização aberrante da via Wnt /  $\beta$ -catenina e, posteriormente, instabilidade cromossômica (HADJIHANNAS *et al.*, 2006). Alterações na via de sinalização APC / Wnt resulta no aumento da expressão do complexo Fator de Células T /  $\beta$ -catenina que é considerado um evento precoce no desenvolvimento de adenomas do cólon humano (SOUAZÉ *et al.*, 2006).

Wnt3a, um dos membros da família Wnt, está envolvida na tumorigênese, proliferação e diferenciação celular. O acúmulo de evidências sugere que Wnt3a promove a progressão do CCR através da via de sinalização Wnt canônica (HE *et al.*,

2015). A via de sinalização Wnt é desregulada em 93% de todos os CCR em humanos (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012) e por isso é um alvo atraente na prevenção do CCR. Estudos clínicos estão focando na ação de substâncias na supressão da sinalização de Wnt3a em neoplasias. No entanto, as funções de sinalização de Wnt3a na progressão do câncer é complexa e são necessários mais estudos para determinar os mecanismos relacionados a função tumorigênica de Wnt3a no CCR (PASHIRZAD *et al.*, 2019). Um estudo analisou os níveis da expressão de Wnt3a em 203 amostras de CCR humano. A superexpressão da proteína Wnt3a foi relacionada a diferenciação histológica ( $P = 0,004$ ), estágio clínico ( $P = 0,008$ ), presença de metástase e recorrência ( $P = 0,036$ ) (QI *et al.*, 2014).

A estimulação da via Wnt /  $\beta$ -catenina é observada na fase inicial da carcinogênese do colón e regula funções celulares importantes que incluem o crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento de células tronco estaminais (CLEVERS; LOH; NUSSE, 2014; PAI *et al.*, 2017). Foi evidenciado que a inibição da  $\beta$ -catenina reduz o crescimento tumoral através de alterações no ciclo celular, diferenciação de algumas células e redução do crescimento de xenoenxertos de CCR cultivados em camundongos (SCHOLER-DAHIREL *et al.*, 2011). Existem muitas substâncias que estão tendo sua ação na via Wnt /  $\beta$ -catenina estudada com intuito de prevenir ou tratar o CCR (SEBIO; KAHN; LENZ, 2014).

Ocorre um aumento da expressão da  $\beta$ -catenina citoplasmática e nuclear no decorrer da evolução da CI, sendo a  $\beta$ -catenina nuclear mais relacionada ao desenvolvimento do CCR (WONG *et al.*, 2004). A expressão nuclear da  $\beta$ -catenina no CCR é extremamente variável na literatura. Ogata *et al.* (2010) mostraram uma relação de 81%. Embora a expressão da  $\beta$ -catenina citoplasmática e nuclear possa estar presente em FCAs hiperplásicos (MI *et al.*, 2009), frequentemente está associada a FCAs displásicos e aumenta proporcionalmente ao grau de displasia (HAO *et al.*, 2001). A expressão da  $\beta$ -catenina nuclear e citoplasmática é um marcador útil para lesões precursoras do CCR (YAMADA *et al.*, 2001). O estudo mostrou imunomarcagem de  $\beta$ -catenina citoplasmática e nuclear em criptas colônicas normais e FCAs. A expressão precoce da  $\beta$ -catenina no colón pode representar uma tendencia ao desenvolvimento do CCR que pode ser confirmar após uma investigação mais detalhada (URIHATA *et al.*, 2002).

Um estudo com 163 amostras de Adenocarcinoma de colón mostrou uma imunorreatividade da  $\beta$ -catenina em 161 casos (98,8%). Foi observado acúmulo de  $\beta$ -

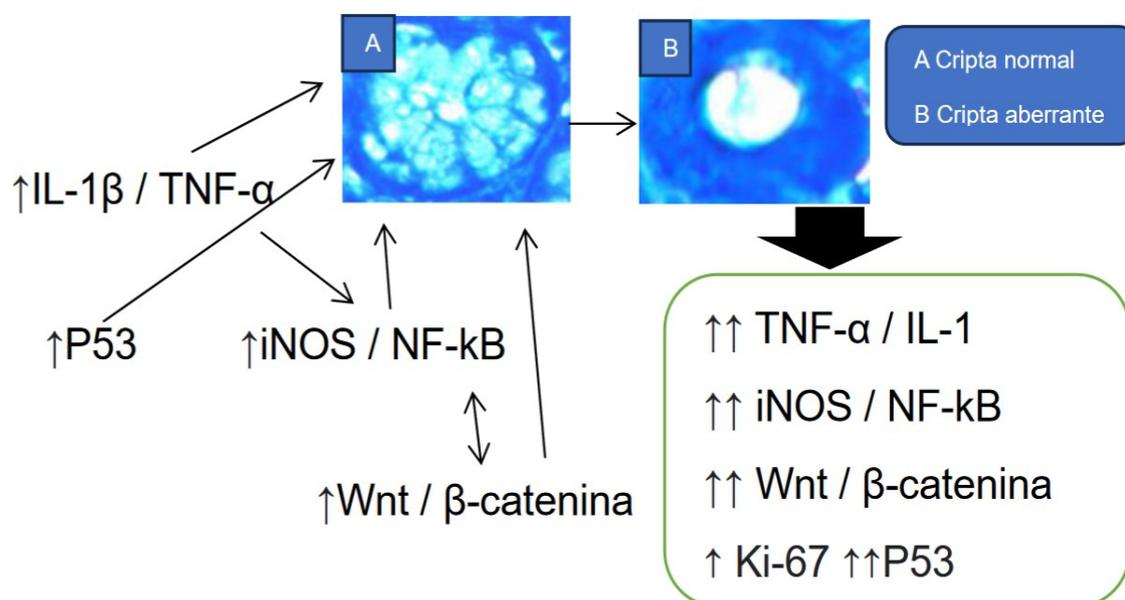
catenina nuclear em 131 casos (80,3%) e os tumores mais agressivos apresentavam um nível menor de  $\beta$ -catenina (WANITSUWAN *et al.*, 2008). A expressão da  $\beta$ -catenina nuclear foi estudada em 240 espécimes de colón que foram divididas igualmente em quatro grupo (carcinoma, adenoma, pólipos e colón normal). Pacientes com CCR e alto nível de  $\beta$ -catenina nuclear tiveram uma maior incidência de metástase linfonodal e menor sobrevida global (WONG *et al.*, 2003). Foi verificada em 44 ressecções de colón com neoplasia a presença da expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em 54% dos casos. Um fato que precisa ser melhor estudado é a expressão heterogênea da  $\beta$ -catenina no colón de pacientes com CCR (BRABLETZ *et al.*, 1998).

A imunomarcção do P53 pode ocorrer no citoplasma e no núcleo da célula e está relacionada à tumorigênese do CCR e a um pior prognóstico (JANSSON; GENTILE; SUN, 2001). O aumento da expressão colônica de P53 é um evento precoce no processo de desenvolvimento do CCR, podendo ocorrer em displasia negativa ou de baixo grau. A mutação de um único alelo do P53 leva ao crescimento tumoral, com expansão clonal de células tumorais e interrupção de mecanismos de reparo do DNA celular (BRETNALL *et al.*, 1994). É reconhecido que tais mutações podem ocorrer na ausência de quaisquer alterações morfológicas (HUMPHRIES; WRIGHT *et al.*, 2008).

O Ki-67 é uma proteína nuclear que tem sido utilizada como um marcador de proliferação para células tumorais (SOBECKI *et al.*, 2017) e pode servir como um biomarcador prognóstico para o CCR. A superexpressão de Ki67 indica um estado celular de alta atividade proliferativa que parece estar relacionado ao CCR (MELLING *et al.*, 2016) e a perda da expressão do Ki-67 pode refletir a inibição da proliferação celular (SOBECKI *et al.*, 2017). Foi avaliada a expressão da proteína Ki-67 em tecidos oriundos de 200 pacientes com CCR e 200 pacientes com neoplasia benigna ou doença inflamatória do colón. O aumento do Ki-67 foi relacionado a um estadiamento mais avançado, tumores mais indiferenciados, menor sobrevida livre de doença e sobrevida global. Assim, a expressão de Ki-67 pode ser considerada altamente sensível (86,5%) e específica (82,9%) para a ocorrência do CCR e associada com um comportamento biológico mais invasivo do CCR (LI *et al.*, 2016).

A Figura 14 mostra de maneira esquemática a relação entre a expressão de proteínas inflamatórias e relacionadas ao processo tumorigênico no colón distal de ratos e o desenvolvimento de lesões precursoras do CCR.

Figura 14 – Relação entre a expressão de proteínas inflamatórias e tumorigênicas no colón e o desenvolvimento de FCA



Fonte: Autoria própria.

O arranjo em matriz de amostras teciduais ou TMA é uma técnica que agrupa muitas amostras teciduais em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos (ANDRADE *et al.*, 2007). Esta técnica foi descrita, pela primeira vez, em 1998 (KONONEN *et al.*, 1998). Uma preocupação desta técnica era a representação da lesão, considerando a pequena amostra estudada. Porém, a fidelidade dos resultados em relação ao uso dos cortes convencionais já foi evidenciada (ANDRADE *et al.*, 2007). Existem inúmeros artigos que avaliam marcadores do CCR através da análise por IHQ do tecido do colón pela técnica TMA (COHEN *et al.*, 2008; MELINCOVICI *et al.*, 2016; OGATA *et al.*, 2010).

A suplementação de PS em dose baixa (40 p.p.m) durante 45 semanas foi capaz de inibir a tumorigênese do colón por meio da regulação da via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina, inibição da expressão de D1, redução na expressão de enzimas inflamatórias (iNOS e COX-2) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (51%), IL-1 $\beta$  (47,7%) e IL-4 (64,2%) (PAUL *et al.*, 2010). Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, o PS reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . No entanto, os resultados não mostraram uma redução da expressão de Wnt3a e  $\beta$ -catenina. Essa discrepância pode ser devido a diferentes períodos de suplementação de PS entre os estudos. Outra pesquisa mostrou que a suplementação

de PS (40 p.p.m.) durante 8 semanas causou supressão dos FCA e reduziu a expressão de iNOS (SUH *et al.*, 2007). Chiou *et al.* (2010) mostraram redução dos FCAs, supressão na sinalização da via Wnt /  $\beta$ -catenina e redução na expressão de ciclina D1 após suplementação de PS (50 ou 250 p.p.m) por 6 ou 23 semanas. A QP foi mais efetiva nos animais que receberam suplementação de PS em maior concentração e por mais tempo. Neste estudo a suplementação de PS ocorreu na concentração de 300 p.p.m e não reduziu significativamente o número de FCAs. Os estudos previamente relatados tiveram a CI induzida com 2 injeções de AOM (15mg / kg) (CHIOU *et al.*, 2010; PAUL *et al.*, 2010; SUH *et al.*, 2007), enquanto este estudo utilizou quinze aplicações consecutivas de 1,2-DMH (20mg / kg). Sabe-se que as alterações relacionadas a carcinogênese ficam mais evidentes à medida que a dose do carcinógeno e o número de aplicações aumentam (NEWELL; HEDDLE, 2004). Um estudo comparou a indução do CCR em ratos Wistar com AOM (aplicação subcutânea 20 mg / kg / semana por 2 semanas consecutivas e eutanásia após 2 semanas) e DMH (Aplicação subcutânea 65 mg / kg / semana por 5 semanas consecutivas e eutanásia após 10 semanas) e mostrou uma maior eficiência e menor custo (50 vezes mais barato) na utilização de DMH em relação ao AOM (JUCÁ *et al.*, 2014).

O PS mostrou efeito modulador da MI e anti-inflamatório em uma pesquisa experimental com colite induzida com DSS. O PS atenuou a gravidade da colite através da redução de IL-2, IL-4 e IL-6 e alterou a composição da MI para um perfil mais saudável, aumentando a concentração de *Bifidobacterium* e reduzindo a concentração de bactérias maléficas para o intestino (LI *et al.*, 2021). Hsu *et al.* (2013) mostraram que o PS possui ação anti-inflamatória através da inibição da produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  e redução da expressão gênica de COX-2 e iNOS. O PS, também, inibe o CCR através da redução da regulação da via NF-kB / p65 que está implicada na proliferação celular descontrolada e inflamação colônica (CHIOU *et al.*, 2011). Neste estudo o PS não reduziu significativamente a expressão de iNOS e NF-kB.

O PS possui ação superior ao reverastrol na atenuação do EO intestinal através da redução da produção de ROS, regulação do estado redox mitocondrial e inibição da apoptose em modelos in vivo e in vitro (CHEN *et al.*, 2021). O PS possui uma importante capacidade de eliminar radicais livres (superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio), reduzir a inflamação do colón ao suprimir a ativação de células dendríticas e promover o desenvolvimento de células T regulatórias (YASHIRO *et al.*,

2020). Ele é capaz de proteger bio-moléculas (lipídios, proteínas e DNA) dentro de uma célula contra o EO (ACHARYA; GHASKADBI, 2013). Várias linhas celulares tratadas com PS mostraram expressão aumentada de glutathiona total, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e superóxido dismutase (MCCORMACK; MCFADDEN, 2012).

O papel da MI na metabolização do PS não deve ser ignorado e merece ser estudado. Sabe-se que o pinostilbeno é o principal metabólito do PS no cólon do rato e suspeita-se que a microbiota possa atuar no metabolismo desta substância (WANG; SANG, 2018). O consumo oral de PS possui extensa biotransformação no trato gastrointestinal. O PS sofre desmetilação, hidroxilação e conjugação no intestino delgado. A desconjugação dos metabólitos do PS ocorre no colón, podendo deixá-los biologicamente mais ativos do que os conjugados. Uma investigação sobre a influência de cepas bacterianas nas reações de desmetilação e desconjugação do PS pode contribuir para o melhor entendimento da farmacocinética desta substância (SUN *et al.*, 2022). Os achados benéficos com PS podem estar principalmente ligados ao pinostilbene (WANG; SANG, 2018). A suplementação de PS + PRO pode favorecer uma composição da microbiota que facilita a metabolização do PS e acentua seus efeitos anti-inflamatórios e anticancerígenos que podem não ser vistos na suplementação isolada de PS.

Nos últimos anos, o número de estudos relacionados às propriedades antioxidantes dos PROs aumentou significativamente. As cepas mais utilizadas são os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium* que secretam enzimas com função antioxidante, produzem metabólitos com atividade antioxidante (butirato, GSH e folato), estimulam o sistema imunológico, levam a uma redução de lipídios pós-prandial que estão envolvidos no dano oxidativo, possuem uma ação como quelante de metais, regulam a MI, estimulam a expressão Nrf2 e liberam exopolissacarídeo que tem um papel importante na redução do EO (HOFFMANN; KLENIEWSKA; PAWLICZAK, 2021). Libredo *et al.* (2013) mostraram ser possível administrar PRO na água dos ratos com benefícios na QP do CCR.

Um estudo avaliou o efeito quimiopreventivo do PRO Dahi (20g / dia) com dois tipos de *Lactobacillus* ( $2 \times 10^9$  UFC / g *L. acidophilus* LaVK2 e *L. plantarum* Lp9) após a indução da CI com quatro aplicações de 1,2-DMH (40mg / kg de peso corporal) em ratos wistar machos. Identificou-se 90% dos FCA nos segmentos medial e distal do colón, sugerindo uma maior predisposição a formação de neoplasia nessas

localizações. A eutanásia ocorreu com 8, 16 e 32 semanas, observando-se um aumento no número de FCA e multiplicidade de criptas (>3 criptas) com o passar do tempo. O grupo que utilizou o PRO mostrou redução estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) na incidência de FCA (MOHANIA; KANSAL; SHAH, 2013). Ratos pré-condicionados (por 1 semana) com uma dieta contendo 0,2% ou 4% de culturas liofilizadas de *L. acidophilus* tiveram a indução da CI com AOM (5 mg / kg / semana) durante duas semanas. A dieta permaneceu por 10 semanas e os animais foram sacrificados. Houve uma supressão no número de FAC e na multiplicidade de criptas no grupo que recebeu PRO (RAO *et al.*, 1999). A suplementação oral (três vezes por semana) de PRO com *L. acidophilus* ( $2 \times 10^9$  UFC) reduziu a incidência e multiplicidade de FCA após a indução de CCR com 1,2-DMH (20 mg / kg / semana) por 10 semanas (CHANG *et al.*, 2012). Os achados nestes estudos apoiam os resultados encontrados que mostram atenuação da formação de lesões histopatológicas precursoras do CCR após suplementação oral de PRO.

Walia *et al.* (2015), avaliaram a suplementação de PRO com *L. rhamnosus* ou *L. plantarum* ( $1 \times 10^{10}$  UFC/ dia) durante 16 semanas após a a IC com vinte aplicações de 1,2-DMH (30 mg / kg) com intervalos que variaram de 3 a 7 dias. Observou-se redução na incidência dos tumores e *downregulation* da expressão de COX-2. Outro experimento com ratos suplementou PRO (07 CCM7766) com *L. plantarum* pela via oral durante 28 semanas e induziu a CI com cinco aplicações de 1,2-DMH (21mg/kg/ peso corporal). Observou-se que a suplementação de PRO foi capaz de reduzir o processo inflamatório no cólon através da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL- 6, IL-17 e TNF- $\alpha$ ), elevação da citocina anti-inflamatória IL-10, preservação de células caliciformes e supressão da atividade de NF- $\kappa$ B nas células da mucosa (STOFILOVÁ *et al.*, 2015).

A suplementação oral de PRO com *L. casei* (BL23;  $5 \times 10^9$  UFC/ ml) foi ofertada durante 46 dias para camundongos após o início da indução da CI com única aplicação de AOM (8 mg/kg), seguido de quatro ciclos de sulfato de dextrano sódico (2,5%) na água. O PRO teve um efeito imunomodulador através da redução da citocina IL-22 e um efeito antiproliferativo medido através da regulação positiva das caspases 7 e 9. Não houve diferenças significativas entre IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Nenhum dos camundongos do grupo que recebeu *L. casei* desenvolveu tumores macroscópicos, enquanto 67% dos camundongos do grupo câncer desenvolveram tumorações. A imunomarcagem do Ki-67 foi menor no grupo que recebeu PRO

(JACOUTONL *et al.*, 2017). Foi avaliado o efeito quimiopreventivo da suplementação oral de PRO com *L. casei* ( $2,1 \times 10^{10}$  UFC / g) por 8 a 12 semanas após a indução da CI com AOM (15mg / kg / semana) durante 5 semanas. A multiplicidade de FCA diminuiu significativamente no grupo que ingeriu o PRO. Na segunda etapa do estudo, a indução da CI ocorreu com aplicações de AOM (7,4 mg / kg / semana) durante 10 semanas. Após 25 semanas ocorreu a eutanásia e o número de animais com CCR e a quantidade de neoplasias por animal reduziram significativamente (YAMAZAKI *et al.*, 2000). Assim, a suplementação de *Lactobacillus* pode ser uma possibilidade menos invasiva na prevenção do CCR (CALAÇA *et al.*, 2017).

O *B. lactis* liofilizado foi suplementado juntamente com amido por 30 semanas. As neoplasias colônicas foram induzidas por 2 injeções de AOM (15 mg / kg / semana). Observou-se uma redução significativa na incidência e multiplicidade de neoplasias colônicas (LEU *et al.*, 2010). O *B. lactis* inibem a via NF-Kb, genes que regulam células do epitélio intestinal e reduzem a incidência de lesões precursoras do CCR após a IC com AOM e DSS (KIM *et al.*, 2010). Um modelo experimental de colite induzida com DSS suplementou *B. lactis* A6 ( $4,0 \times 10^9$  UFC / dia) durante 21 dias consecutivos. A administração de *B. lactis* A6 manteve a integridade da barreira intestinal ( $p < 0,001$ ). O comprometimento da barreira epitelial do intestino pode ser considerado um dos primeiros eventos que ocorrem na inflamação intestinal, uma vez que facilita a entrada de antígenos do lúmen intestinal para a mucosa podendo levar a uma resposta imune descontrolada e exacerbada (VIVINUS-NEBOT *et al.*, 2014). O *B. lactis* A6 atenua o EO nos tecidos do cólon, diminuindo os níveis de MDA e aumentando os níveis de GSH. Além disso, suprime a resposta inflamatória via downregulation de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (WANG *et al.*, 2022).

Um modelo experimental de CCR induzido com 1,2-DMH (30 mg / kg, duas vezes por semana durante 3 semanas) investigou o efeito da dieta suplementada com esfingomielina (0,05%) e PRO com *L. casei* e *B. bifidum* ( $10^8$  UFC/ml). Os animais foram sacrificados no 66º dia do período experimental. A suplementação dietética com o simbiótico reduziu o número de FCA ( $p < 0.05$ ) (MARZO *et al.*, 2022). Outro estudo mostrou que o consumo prolongado (24 semanas) de PRO (*B. longum* e *L. gasseri*) resultou em uma inibição significativa da formação de FCAs e neoplasias de colón após IC com 1,2-DMH (FOO *et al.*, 2011). Um PRO com *B. lactis* e *L. rhamnosus* foi suplementado na dieta de ratos. Dez dias após o início da suplementação os animais receberam duas aplicações de AOM (15mg / kg/ semana). A dieta permaneceu por 31

semanas e observou-se uma redução no número de tumores malignos, mas sem significância estatística ( $P = 0,079$ ) (FEMIA *et al.*, 2002).

PRO com formulação De Simone (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* e *Streptococcus thermophilus*) mostrou atividade anticancerígena e anti-inflamatória em um modelo experimental de indução do CRC (BASSAGANYA-RIERAL *et al.*, 2012). PRO enriquecido com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e /ou *B. lactis* Bb12 foram suplementados na água por um período de 14 semanas. A CI foi induzida com 1,2-DMH (25 mg / kg / semana) durante 6 semanas. Observou-se uma redução no número total de FCAs (55,7% e 45,1%, respectivamente) nos grupos suplementados com um tipo de cepa bacteriana. No entanto, um efeito sinérgico da suplementação de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na inibição da FCAs não foi observado (LIBOREDO *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou que a suplementação de PRO inibiu a incidência de lesões colônicas em 57% com *L. acidophilus* e 27% com *B. bifidum* em comparação ao grupo que teve a IC com AOM e não recebeu PRO (AGAH *et al.*, 2019). A literatura atual apoia o benefício da suplementação de PRO para a saúde intestinal, já que melhora escores histopatológicos relacionados ao desenvolvimento do CCR, EO e biomarcadores de inflamação e do CCR. Outros Estudos são necessários para definir a melhor composição de cepas bacterianas em um complexo PRO com intuito de alcançar maior efetividade na QP do CCR.

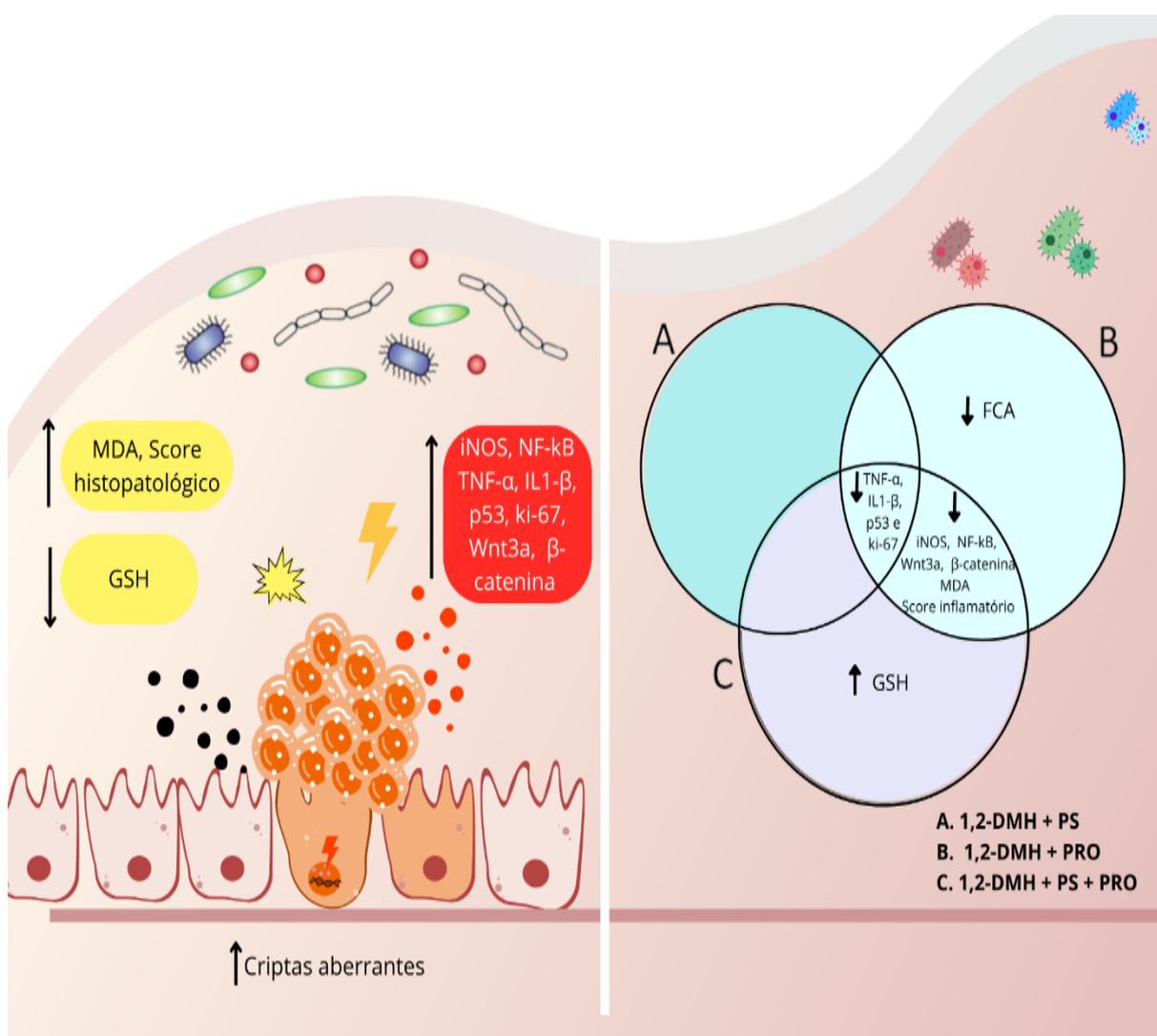
A influência da MI no metabolismo de substâncias no colón tem ação na entrega direcionada de medicamentos. O entendimento dos fatores que alteram a MI nas doenças intestinais é importante no desenvolvimento de uma nova geração de terapias que aproveitam o metabolismo da microflora intestinal. A microbiota pode efetivamente aumentar as pró-drogas e levar a metabólitos ativos. Existem estudos sobre a viabilidade de eliminar certos tipos de câncer através da programação de bactérias para produzir moléculas terapêuticas ou pela manipulação de bactérias intestinais nativas para expressar enzimas ativadoras de pró-drogas. No entanto, há evidências limitadas da eficiência translacional de qualquer uma dessas pesquisas (BAKSHI *et al.*, 2021).

A composição ideal e precisa da MI para promover efeitos antitumorais e respostas imunes, ainda, não é conhecida (AKBAR *et al.*, 2022). Os seguintes pontos devem ser elucidados antes de modular o ecossistema intestinal em pacientes com maior risco de CCR: tipos de cepas probióticas, suas concentrações ideais, duração

da terapia e método de suplementação (KIM; LIM, 2022). Através da inoculação de cepas selecionadas ou grupos de micróbios é possível criar ecossistemas intestinais que podem produzir conhecimentos valiosos sobre o impacto da MI na prevenção de muitas doenças, inclusive, o CCR (HANSEN *et al.*, 2015). Embora os PROs sejam agentes atraentes para a prevenção do CCR, sua eficácia ainda não foi totalmente estabelecida (THAISS *et al.*, 2016).

A Figura 15 resume os principais achados encontrados após a IC no cólon dos ratos com 1,2-DMH e detalha os efeitos protetores da suplementação de PS e/ou PRO.

Figura 15 - Resultado da suplementação de PRO e/ou PS em um modelo experimental de desenvolvimento de CRC com 1,2-DMH



Fonte: Autoria própria.

O grupo 1,2-DMH aumentou escores histopatológicos, EO e marcadores inflamatórios e da tumorigênese. Os grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO reduziram os escores histopatológicos, EO e marcadores inflamatórios e da tumorigênese. O grupo 1,2-DMH + PS apresentou menor expressão tecidual de p53, Ki67, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , mas sem melhorar o EO e os escores histopatológicos.  $\uparrow$ , aumentou;  $\downarrow$ , diminuiu.

Uma limitação deste estudo foi não ter dissecado com mais profundidade as vias cruzadas inflamatórias e tumorigênicas iniciais (incluindo a sinalização Wnt canônica) que podem lançar luz para encontrar novos e promissores alvos farmacológicos para interromper a progressão de lesões precursoras do CCR. Através da análise histopatológica das tumorações macroscópicas é possível extrair informações importantes para complementar o estudo das substâncias utilizadas. Logo, outro fator limitante foi a não diferenciação das LM em benignas e malignas. Uma avaliação mais abrangente do EO acrescentaria confiabilidade aos resultados. Sabe-se que a superóxido dismutase e catalase são enzimas envolvidas na proteção das células contra os efeitos nocivos das ROS (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Novas terapias combinadas são desejáveis para QP do CCR. Este foi o primeiro estudo a avaliar a suplementação combinada de PS e PRO na QP de lesões precursoras de CCR. Novos estudos devem ser realizados para esclarecer qual composição e concentração de cepas bacterianas é ideal para acentuar os efeitos biológicos do PS e, conseqüentemente, contribuir para a QP primária do CCR de forma mais efetiva. Estudos futuros devem mostrar o efeito do PS e /ou PRO no desenvolvimento dos FCAs de maneira mais detalhada através da subclassificação deles em hiperplásicos e displásicos. Os resultados encontrados podem orientar futuros ensaios clínicos em grandes populações em todo o mundo para prevenir ou retardar a ocorrência de CCR e estes achados destacam a importância de medidas dietéticas para modular a MI e minimizar a incidência de CCR em populações de alto risco.

## 8 CONCLUSÃO

A suplementação isolada de PRO e a combinação de PRO com PS são as melhores estratégias de intervenção para reduzir as lesões precursoras do CCR em relação a vários parâmetros de carcinogênese.

O modelo de indução do CCR com 1,2-DMH é efetivo no desenvolvimento de lesões precursoras do CCR.

Os grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO reduzem o *score* histopatológico de inflamação e número de FCA, mas sem reduzir significativamente as LM. O grupo 1,2-DMH + PS não melhorou o *score* histopatológico de inflamação, número de FCA e LM. A maior pontuação no *score* histopatológico e o maior número de FCAs estão localizados no segmento distal do colón.

Os grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO reduzem a expressão de proteínas relacionadas a inflamação e ao desenvolvimento do CCR (Ki67,  $\beta$ -catenina, Wnt3a, p53, NF-kB, iNOS, IL1- $\beta$ , e TNF- $\alpha$ ). Entretanto o grupo 1,2-DMH + OS apresentou redução na expressão tecidual apenas das proteínas p53, Ki67, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Os grupos 1,2-DMH + PRO e 1,2-DMH + PS + PRO apresentaram atenuação do EO através da redução da concentração tecidual de MDA no colón distal. O grupo 1,2-DMH + PS + PRO, também, aumenta a concentração tecidual de GSH no colón distal. O grupo 1,2-DMH + PS não apresenta melhora do EO no tecido do colón.

## REFERÊNCIAS

ABREU, M. T.; PEEK JÚNIOR, R. M. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 146, n. 6, p. 1534-1546, maio 2014. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.001>. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(14\)00003-1/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(14)00003-1/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F). Acesso em: 12 maio 2023.

ACHARYA, J. D.; GHASKADBI, S. S. Protective effect of pterostilbene against free radical mediated oxidative damage. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 238, set. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-238>. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-238>. Acesso em: 18 nov. 2022.

ACHITEI, D. *et al.* Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], v. 58, p. 1244-1249, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2510-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-012-2510-z>. Acesso em: 22 abr. 2023.

AGAH, S. *et al.* More protection of lactobacillus acidophilus than bifidobacterium bifidum probiotics on azoxymethane-induced mouse colon cancer. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [S. l.], v. 11, p. 857-864, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9425-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-018-9425-8>. Acesso em: 25 fev. 2023.

AGHAMOHAMMAD, S. *et al.* The potential role of Bifidobacterium spp. as a preventive and therapeutic agent in controlling inflammation via affecting inflammatory signalling pathways. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 1254-1263, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13793>. Disponível em: <https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/75/5/1254/6989390?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 25 jan. 2023.

AKBAR, N. *et al.* The role of gut microbiome in cancer genesis and cancer prevention. **Health Sciences Review**, [S. l.], v. 2, p. 100010, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2021.100010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S277263202100009X>. Acesso em: 12 fev. 2023.

AMBALAN, P. *et al.* Probiotics, prebiotics and colorectal câncer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 119-131, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691816000135?via%3Di%3Dhub>. Acesso em: 12 fev. 2023.

AMIN, A. *et al.* Perspectives for cancer prevention with natural compounds. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 16, p. 2712-2725, jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6235>. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.20.6235>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ANDERSON, J. C. *et al.* Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy. **Cancer Causes Control**, [S. l.], v. 23, p. 355-361, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9884-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10552-011-9884-7>. Acesso em: 25 jan. 2023.

ANDRADE, V. P. *et al.* O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 55-60, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000100011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/hFCZr83HNrGxSRHvJJFMpxm/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ARAUJO, J. R.; GONÇALVES, P.; MARTEL, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutrition Research**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 77-87, fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.01.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0271531711000145?via%3Di> hub. Acesso em: 9 fev. 2023.

ARUL, A. B. *et al.* Multivitamin and mineral supplementation in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis and evaluation of free radical status, antioxidant potential, and incidence of ACF. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 45-54, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1139/y11-100>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/y11-100>. Acesso em: 25 jan. 2023.

AZZOLINI, M. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. 2122-2132, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400244>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201400244>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BADGELEY, A. *et al.* Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1875, n. 1, p. 188494, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188494>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304419X20302134>. Acesso em: 9 fev. 2023.

BAKSHI, H. A. *et al.* Exploiting the metabolism of the gut microbiome as a vehicle for targeted drug delivery to the colon. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1211, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14121211>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/12/1211>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BASSAGANYA-RIERA, J. *et al.* Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. **PLoS One**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. e34676, abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034676>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034676>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BERBERT, L. *et al.* Metagenomics analysis reveals universal signatures of the intestinal microbiota in colorectal cancer, regardless of regional differences. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 55, p. e11832, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e11832>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmbmr/a/TDdJGqJsWNqC7BKRZn98kxm/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BETHUNE S. J.; SCHULTHEISS, N.; HENCK, J. O. Improving the poor aqueous solubility of nutraceutical compound pterostilbene through cocrystal formation. **Crystal Growth e Design**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 2817-2823, maio 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/cg1016092>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cg1016092#>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BHATTACHARYYA, A. *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 329-354, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physrev.00040.2012>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BIALONSKA, D. *et al.* The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 18, p. 8344-8349, ago. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf901931b>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf901931b>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 9-19, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>. Disponível em: <https://www.worldallergyorganizationjournal.org/action/showPdf?pii=S1939-4551%2819%2930370-9>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 147-151, out. 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304383587901571?via%3DiHub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 112-113, p. 395-402, mar. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00261-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00261-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427499002611?via%3DiHub>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BISSAHOYO, A. *et al.* Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 340-345, dez. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi313>. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/88/2/340/1691186?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BOSMAN, F. T.; YAN, P. Molecular pathology of colorectal cancer. **Polish Journal of Pathology**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 257-266, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5114/pjp.2014.48094>. Disponível em: <https://www.termedia.pl/Review-paper-Molecular-pathology-of-colorectal-cancer,55,24327,1,1.html>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BOUSSEROUEL, S. *et al.* Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1485-1490, jun. 2010. DOI: [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000635](https://doi.org/10.3892/ijo_00000635). Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/36/6/1485>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BOUZOURENE, H. *et al.* Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. **Human Pathology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 66-71, jan. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90302-7](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90302-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0046817799903027?via%3Di> hub. Acesso em: 12 fev. 2023.

BRABLETZ, T. *et al.* Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. **Pathology - Research and Practice**, [S. l.], v. 194, n. 10, p. 701-704, maio 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(98\)80129-5](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(98)80129-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0344033898801295>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BRAGA, V. N. L. *et al.* Gum arabic and red propolis protecteting colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. e201900207, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-8650201900207>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/MJhxfnMx7bWKYsY6c3756fz/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 25 jan. 2023.

BRENTNALL, T. A. *et al.* Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 369-378, ago. 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90161-9). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508594901619#!>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BREY, E. M. *et al.* Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 575-584, maio 2003. DOI: <https://doi.org/10.1177/002215540305100503>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540305100503>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BURLAMAQUI, I. M. B. *et al.* Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 30-36, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000100006>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/99fbTVyCDJng7QQXpbxcGDd/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BURLAMAQUI, I. M. B. *et al.* Hepatic repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 137-141, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912013000200010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/HFr9cmyFtYrFB9yYvfqytJG/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 12 maio 2023.

BURLAMAQUI, I. M. B. *et al.* Optimization of visibility and quantification of aberrant crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 148-152, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000200005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/rwNdTFYrd56y895phm7wtBh/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BYRD, D. A. *et al.* Associations of novel dietary and lifestyle inflammation scores with incident colorectal cancer in the NIH-AARP diet and health study. **JNCI Cancer Spectrum**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. pkaa009, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa009>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jncics/article/4/3/pkaa009/5781963>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CALAÇA, P. R. A. *et al.* Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 6, p. 587-592, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000600009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/x5SQ9W8Yx7hDxX9cyJ6MznQ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, [S. l.], v. 487, p. 330-337, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11252>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11252>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CARR, P. R. *et al.* Estimation of absolute risk of colorectal cancer based on healthy lifestyle, genetic risk, and colonoscopy status in a population-based study.

**Gastroenterology**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 129-138, jul. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.016>. Disponível em:

[https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(20\)30337-](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)30337-1/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)

[1/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)30337-1/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F). Acesso em: 25 jan. 2023.

CARTER, J. W. *et al.* Distribution of intestine-associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2-dimethylhydrazine-treated mice.

**Cancer Research**, [S. l.], v. 54, n. 16, p. 4304-4307, ago. 1994. Disponível em:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/54/16/4304/500329/Distribution-of-Intestine-associated-Lymphoid>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CELIK, O. F.; SULLIVAN, D. J. O. Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 96, n. 6, p. 3506-3516, jun. 2013. DOI:

<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6327>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213002907>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHANG, J. H. *et al.* Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 361-368, mar. 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.035154-0>. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.035154-0>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CHAO, J. *et al.* Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SHSY5Y cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 482-489, jun. 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.02.004>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286309000400?via%3Di> hub. Acesso em: 25 jan. 2023.

CHASSAING, B. *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 15.25.1-15.25.14, fev. 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>. Disponível em:

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1525s104>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHATTOPADHYAY, I. *et al.* Exploring the role of gut microbiome in colon cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 193, p. 1780-1799, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03498-9>. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03498-9>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHATURVEDI, M. M. *et al.* NF- $\kappa$ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene**, [S. l.], v. 30, p. 1615-1630, abr. 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1038/onc.2010.566>. Disponível em:  
<https://www.nature.com/articles/onc2010566>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CHEN, C. C. *et al.* Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 107, n. 11, p. 1623-1634, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114511004934>. Disponível em:  
<https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/B6DC691BBB599EC7E75850760904A336/S0007114511004934a.pdf/oral-inoculation-of-probiotics-lactobacillus-acidophilus-ncfm-suppresses-tumour-growth-both-in-segmental-orthotopic-colon-cancer-and-extra-intestinal-tissue.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CHEN, Y. *et al.* Resveratrol and its derivative pterostilbene attenuate oxidative stress-induced intestinal injury by improving mitochondrial redox homeostasis and function via SIRT1 signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 177, p. 1-14, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.011>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584921007590?via%3DiHub>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 2642-2649, dez. 2003. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i12.2642>. Disponível em:  
<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v9/i12/2642.htm>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CHERNYAVSKIY, P. *et al.* Heterogeneity of colon and rectum cancer incidence across 612 SEER counties, 2000-2014. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 144, n. 8, p. 1786-1795, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.31776>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31776>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHIOU, Y. S. *et al.* Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 15, p. 8833-8841, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf101571z>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf101571z>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHIOU, Y. S. *et al.* Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NFE2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 6, p. 2725-2733, mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2000103>. Disponível em:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf2000103>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 30, p. 351-374, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1499-6>. Disponível em:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-013-1499-6>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CHUNG, Y. *et al.* A synthetic probiotic engineered for colorectal cancer therapy modulates gut microbiota. **Microbiome**, [S. l.], v. 9, n. 122, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01071-4>. Disponível em: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01071-4>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CIRMI, S. *et al.* Chemopreventive agents and inhibitors of cancer hallmarks: may citrus offer new perspectives? **Nutrients**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 698, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu8110698>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/8/11/698>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CLEVERS, H.; LOH, K. M.; NUSSE, R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: wnt signaling and Stem cell control. **Science**, [S. l.], v. 346, n. 6205, out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1248012>. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1248012>. Acesso em: 9 fev. 2023.

COHEN, T. *et al.* Expression of P53, P27 and KI-67 in colorectal cancer patients of various ethnic origins: clinical and tissue microarray based analysis. **Journal of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 97, n. 5, p. 416-422, fev. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/jso.20989>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jso.20989>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CONEM, A. *et al.* A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 151, n. 12, p. 895-897, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-12-200912150-00020>. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-151-12-200912150-00020>. Acesso em: 17 jan. 2023.

COSTA, D. V. S. *et al.* 5-Fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-Dependent Pathway. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 665, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36878-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36878-z>. Acesso em: 25 jan. 2023.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 446-467, dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299710000762?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2023.

CUEVA, C. *et al.* Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 634944, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.634944>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.634944/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CVOROVIC, J. *et al.* Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 501, n. 1, p. 151-157, set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.019>. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986110001864>. Acesso em: 17 jan. 2023.

DASARI, S. *et al.* Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: a systematic review. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1465-1472, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261561416313334>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DEL RIO, D. *et al.* Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 18, n. 14, p. 1818-1892, maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2012.4581>. Acesso em: 17 jan. 2023.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 316-328, ago. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>. Disponível em: [https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753\(05\)00104-3/fulltext](https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753(05)00104-3/fulltext). Acesso em: 12 fev. 2023.

DERRY, M. M. *et al.* Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 119, maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00119>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00119/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

DOMIJAN, A. M. *et al.* Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. **Biomed Chromatography**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 41-46, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.3361>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.3361>. Acesso em: 17 jan. 2023.

DONALDSOM, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 14, p. 20-32, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3552>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DU, Q.; GELLER, D. A. Cross-Regulation Between Wnt and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 7, n. 378, set. 2016. DOI: [10.3389/fimmu.2016.00378](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378). Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00378/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

DUKE, S. O. Benefits of Resveratrol and pterostilbene to crops and their potential nutraceutical value to mammals. **Agriculture**, [S. l.], v. 12 n. 3, p. 368, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture12030368>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/3/368>. Acesso em: 17 jan. 2023.

DUSAK, A.; ATASOY, N.; DEMIR, H. Nutrition and Colon Cancer. **International Journal of Academic Medicine and Pharmacy**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 80-85, jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.29228/jamp.50759>. Disponível em: <https://www.academicmed.org/Uploads/Volume4Issue1/18.-Derleme-50759-Ahmet-Dusak-80-85.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Taking a metagenomic view of human nutrition. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 448-454, set. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283561133>. Disponível em: [https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Abstract/2012/09000/Taking\\_a\\_metagenomic\\_view\\_of\\_human\\_nutrition.9.aspx](https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Abstract/2012/09000/Taking_a_metagenomic_view_of_human_nutrition.9.aspx). Acesso em: 12 fev. 2023.

EL-KHADRAGY, M. F. *et al.* Bone marrow cell therapy on 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced colon cancer in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 1072-1083, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1159/000487349>. Disponível em: <https://karger.com/cpb/article/45/3/1072/74667/Bone-Marrow-Cell-Therapy-on-1-2-Dimethylhydrazine>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ERBEN, U. *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 4557-4576, jul. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4152019/>. Acesso em: 9 fev. 2023.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 139, p. 82-93, set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295217302526?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ESTRELA J. M. *et al.* Pterostilbene: biomedical applications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 65-78, jul. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.805182>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408363.2013.805182?journalCode=ilab20>. Acesso em: 12 fev. 2023.

FAGHFOORI, Z. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of probiotics effects on colorectal cancer. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 18, p. 463-472, out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.08.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464615003977>. Acesso em: 25 jan. 2023.

FELISBERTO, Y. S. *et al.* Colorectal cancer: the importance of early screening. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. e7130, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e7130.2021>. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/7130/4378>. Acesso em: 17 jan. 2023.

FEMIA, A. P. *et al.* Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats.

**Carcinogenesis**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 1953-1960, nov. 2002. DOI:

<https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1953>. Disponível em:

<https://academic.oup.com/carcin/article/23/11/1953/2608318?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

FEMIA, A. P. *et al.* Multiple mucin depleted foci, high proliferation and low apoptotic response in the onset of colon carcinogenesis of the PIRC rat, mutated in *Apc*.

**International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 136, n. 6, p. E488-E495, mar. 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1002/ijc.29232>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29232>. Acesso em: 12 fev. 2023.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 136,

n. 5, p. E359-E386, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29210>. Acesso em: 17 jan. 2023.

FODDE, R.; SMITS, R. Disease model: familial adenomatous polyposis. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 369-373, ago. 2001. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02050-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02050-0). Disponível em:

[https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914\(01\)02050-0?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491401020500%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(01)02050-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491401020500%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 jan. 2023.

FONG, W.; LI, Q.; YU, J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. **Oncogene**, [S. l.], v. 39, p. 4925-4943, jun. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41388-020-1341-1>. Acesso em: 9 fev. 2023.

FOO, N. P. *et al.* Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 24, p. 13337-13345, dez. 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1021/jf203444d>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf203444d>. Acesso em: 17 jan. 2023.

FRANK, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 34, p.

13780-13785, ago. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>. Disponível em:

<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0706625104>. Acesso em: 12 fev. 2023.

GANESAN, K.; JAYACHANDRAN, M.; XU, B. Diet-derived phytochemicals targeting colon cancer stem cells and microbiota in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 3976, jun. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.3390/ijms21113976>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/3976>. Acesso em: 25 jan. 2023.

GAYATHRI, D.; ASHA; DEVARAJA, T. N. Lactobacillus sp. as probiotics for human health with special emphasis on colorectal cancer. **Indian Journal of Science and Technology**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 1008-1014, 2011. DOI: <https://doi.org/10.17485/ijst/2011/v4i8.27>. Disponível em: <https://indjst.org/articles/lactobacillus-sp-as-probiotics-for-human-health-with-special-emphasis-on-colorectal-cancer>. Acesso em: 12 fev. 2023.

GIANOTTI, L. *et al.* Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance: the role of nitric oxide. **Annals of Surgery**, [S. l.], v. 217, n. 6, p. 644-653, jun. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1097/0000658-199306000-00006>. Disponível em: [https://journals.lww.com/annalsofsurgery/Abstract/1993/06000/Arginine\\_Supplement\\_ed\\_Diets\\_Improve\\_Survival\\_in.6.aspx](https://journals.lww.com/annalsofsurgery/Abstract/1993/06000/Arginine_Supplement_ed_Diets_Improve_Survival_in.6.aspx). Acesso em: 9 fev. 2023.

GIBSON, G. R. *et al.* 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin Functional Foods**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-19, maio 2010. DOI: <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>. Disponível em: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1068155189>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of the prebiotics. **The Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 125, n.6, p. 1401-1412, jun. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022316623035514>. Acesso em: 25 jan. 2023.

GOIS JÚNIOR, E. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethylhydrazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. **Undersea & Hyperbaric Medical Society**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 693-698, jun. 2012.

GONZALEZ, D. *et al.* iNOS activation regulates  $\beta$ -catenin association with its partners in endothelial cells. **PLoS One**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e52964, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052964>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052964>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GOPČEVIĆ, K. R. *et al.* Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], v. 58, p. 2646-2652, set. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2681-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-013-2681-2#citeas>. Acesso em: 12 fev. 2023.

GOUNARIS, E. *et al.* Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth. **PLoS One**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. e2916, ago. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002916>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002916>. Acesso em: 25 jan. 2023.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 70, p. 1104-1108, mar. 2011. Supl. 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2010.140145>. Disponível em: [https://ard.bmj.com/content/70/Suppl\\_1/i104](https://ard.bmj.com/content/70/Suppl_1/i104). Acesso em: 12 fev. 2023.

GRYAZNOVA, M. *et al.* Dynamics of changes in the gut microbiota of healthy mice fed with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1020, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051020>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/1020>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GU, S. *et al.* Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. **PLoS One**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. e74957, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074957>. Acesso em: 9 fev. 2023.

GUO, N. I.; GAO, J. Harmol alleviates dimethylhydrazine induced colon cancer by downregulating Bcl2/IL-6/TNF- $\alpha$  expression in association with p53 mediated apoptosis. **European Journal of Inflammation**, [S. l.], v. 20, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1177/1721727X2211100>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1721727X221110044>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GUPTA, B. *et al.* Identification of high-risk aberrant crypt foci and mucin-depleted foci in the human colon with study of colon cancer stem cell markers. **Clinical Colorectal Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 204-213, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.001>. Disponível em: [https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028\(16\)30174-8/fulltext](https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028(16)30174-8/fulltext). Acesso em: 25 jan. 2023.

HADJIHANNAS, M. V. *et al.* Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 103, n. 28, p. 10747-10752, jul. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604206103>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0604206103>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HANSEN, A. K. *et al.* A review of applied aspects of dealing with gut microbiota impact on rodent models. **ILAR Journal**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 250-264, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv010>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/56/2/250/650590?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HAO, X. P. *et al.* Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. **Cancer Research**, [S. l.], v. 61, n. 22, p. 8085-8088, nov. 2001. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/61/22/8085/508061/Catenin-Expression-Is-Altered-in-Human-Colonic>. Acesso em: 9 fev. 2023.

HASSAN, H. F. H. *et al.* The chemopreventive effect of thymol against dimethylhydrazine and/or high fat diet-induced colon cancer in rats: relevance to NF-

κB. **Life Sciences**, [S. I.], v. 274, n. 119335, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119335>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320521003209?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HAUMAIER, F.; STERLACCI, W.; VIETH, M. Histological and molecular classification of gastrointestinal polyps. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. I.], v. 31, n. 4, p. 369-379, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.06.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691817300689?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HE, S. *et al.* Wnt3a: functions and implications in cancer. **Chinese Journal of Cancer**, [S. I.], v. 34, p. 554-562, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0052-4>. Disponível em: <https://cancercommun.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40880-015-0052-4#:~:text=Wnt3a%2C%20one%20of%20Wnt%20family,pathway%20depending%20on%20cancer%20type>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HEDIN, C.; WHELAN, K.; LINDSAY, J. O. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. **Proceedings of the Nutrition Society**, [S. I.], v. 66, n. 3, p. 307-315, ago. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665107005563>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/evidence-for-the-use-of-probiotics-and-prebiotics-in-inflammatory-bowel-disease-a-review-of-clinical-trials/19DC1E6B2BDBCDA420DB56CA72B39866>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HILL, M. J. Bacteria and the etiology of colonic cancer. **Cancer**, [S. I.], v. 34, n. 3, p. 815-818, set. 1974. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197409\)34:3+<815::AID-CNCR2820340705>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197409)34:3+<815::AID-CNCR2820340705>3.0.CO;2-6). Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142%28197409%2934%3A3%2B%3C815%3A%3AAID-CNCR2820340705%3E3.0.CO%3B2-6>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HOFFMANN, A.; KLENIEWSKA, P.; PAWLICZAK, R. Antioxidative activity of probiotics. **Archives of Medical Science**, [S. I.], v. 17, n. 3, p. 792-804, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.89894>. Disponível em: <https://www.archivesofmedicalscience.com/Antioxidative-activity-of-probiotics,89593,0,2.html>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HOLZAPFEL, W.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, [S. I.], v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5). Disponível em: <https://eurekamag.com/research/003/823/003823125.php>. Acesso em: 9 fev. 2023.

HOSSAIN, M. S. *et al.* Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. **Cancers**, [S. I.], v. 14, n. 7, p. 1732, mar. 2022. DOI:

<https://doi.org/10.3390/cancers14071732>. Disponível em:  
<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/7/1732>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HSU, C. L. *et al.* The inhibitory effect of pterostilbene on inflammatory responses during the interaction of 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 602-610, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf304487v>. Disponível em:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf304487v>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1349-1353. nov. 1981. DOI: <https://doi.org/10.1177/29.11.6172466>. Disponível em:  
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/29.11.6172466>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 577-580, abr. 1981. DOI: <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/29.4.6166661>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HSU, W. F.; CHIU, H. M. Cost-effectiveness of colonoscopy and related procedures: population screening perspectives. **Mini-invasive Surgery**, [S. l.], v. 6, n. 26, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.20517/2574-1225.2022.03>. Disponível em:  
<https://misjournal.net/article/view/4850>. Acesso em: 9 fev. 2023.

HUANG, R. *et al.* Lactobacillus and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 260, p. 127019, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127019>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501322000593?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 1-20, dez. 2009. DOI:  
<https://doi.org/10.1080/01635580903191585>. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580903191585>. Acesso em: 25 jan. 2023.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, abr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>. Disponível em: [https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol31No5\\_1170\\_45-RV07068.pdf](https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol31No5_1170_45-RV07068.pdf). Acesso em: 17 jan. 2023.

HUMPHRIES, A.; WRIGHT, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 415-24, jun. 2008. DOI:  
<https://doi.org/10.1038/nrc2392>. Disponível em:  
<https://www.nature.com/articles/nrc2392>. Acesso em: 12 fev. 2023.

HURLSTONE, D. P.; CROSS, S. S. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopy colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 173-181, fev. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03433.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1746.2004.03433.x>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 121, n. 11, p. 2373-2380, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.23173>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23173>. Acesso em: 9 fev. 2023.

ISLAMI, F; *et al.* Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 31-54, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21440>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21440>. Acesso em: 25 jan. 2023.

JACOUTON, E. *et al.* Probiotic strain Lactobacillus casei B123 Prevents colitis-associated colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, n. 1553, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01553>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01553/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

JANSSON, A.; GENTILE, M.; SUN, X. F. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 338-341, maio 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.1189>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.1189>. Acesso em: 9 fev. 2023.

JOHNSON, R. L.; FLEET, J. C. Animal models of colorectal cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 32, n. 1-2, p. 39-61, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-012-9404-6>. Acesso em: 17 jan. 2023.

JRIDI, I. *et al.* Inflammation and Wnt signaling: target for Immunomodulatory Therapy? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 8, p. 615131, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.615131>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.615131/full>. Acesso em: 25 jan. 2023.

JUCÁ, M. J. *et al.* Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. **Journal of Coloproctology**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 167-173, jul./set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2014.06.003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jcol/a/mWRMSvBFn8m48XQvqhG5dM/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 17 jan. 2023.

JUNGERSEN, M. *et al.* The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. **Microorganisms**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 92-110, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/2/2/92>. Acesso em: 12 fev. 2023.

KANDA, Y.; OSAKI, M.; OKADA, F. Chemopreventive strategies for inflammation-related carcinogenesis: current status and future direction. **International Journal of Molecular Science**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 867, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18040867>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/867>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KASAI, C. *et al.* Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: terminal restriction fragment length polymorphism and nextgeneration sequencing analyses. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 325-333, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2015.4398>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2015.4398>. Acesso em: 12 fev. 2023.

KAUNTZ, H. *et al.* Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 849-54, set. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1526>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2012.1526>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KHALILI, F. *et al.* A. Cost-effectiveness analysis of colorectal cancer screening: a systematic review. **Risk Management and Healthcare Policy**, [S. l.], v. 13, p. 1499-1512, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/RMHP.S262171>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/cost-effectiveness-analysis-of-colorectal-cancer-screening-a-systemati-peer-reviewed-fulltext-article-RMHP>. Acesso em: 9 fev. 2023.

KHAVARI-DANESHVAR, H. *et al.* Modifications of mice gut microflora following oral consumption of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum probiotics. **Turkish Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 689-694, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3906/sag-1504-28>. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol47/iss2/47/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KIM, S. *et al.* Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. **Cancer Research**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 323-328, jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2924>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/1/323/540529/Circulating-Levels-of-Inflammatory-Cytokines-and>. Acesso em: 12 fev. 2023.

KIM, S. H.; LIM, Y. J. The role of microbiome in colorectal carcinogenesis and its clinical potential as a target for cancer treatment. **Intestinal Research**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 31-42, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.5217/ir.2021.00034>. Disponível em: <https://www.irjournal.org/journal/view.php?doi=10.5217/ir.2021.00034>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KIM, S. W. *et al.* Bifidobacterium lactis inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. **Inflammatory**

**Bowel Diseases**, [S. I.], v. 16, n. 9, p. 1514-1525, set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/ibd.21262>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/16/9/1514/4628438?login=false>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, [S. I.], v. 87, n. 2, p. 159-170, out. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400813331>. Acesso em: 12 fev. 2023.

KOCABAS, S.; SANLIER, N. A comprehensive overview of the complex relationship between epigenetics, bioactive components, cancer, and aging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. I.], out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1986803>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2021.1986803?journalCode=bfsn20>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KOH, Y. C.; HO, C. T.; PAN, M. H. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. I.], v. 28, n. 1, p. 14-37, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949819301000?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, [S. I.], v. 4, n. 7, p. 844-847, jul. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm0798-844>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KUMAR, A.; SINGH, N. K.; SINHA, P. R. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Molecular Biology Reports**, [S. I.], v. 37, p. 1373-1376, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9519-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-009-9519-1>. Acesso em: 12 fev. 2023.

KUMAR, S.; AGNIHOTRI, N. Piperlongumine targets NF- $\kappa$ B and its downstream signaling pathways to suppress tumor growth and metastatic potential in experimental colon cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. I.], v. 476, n. 4, p. 1765-1781, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04044-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-020-04044-7>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KYSELOVA, Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. **Interdisciplinary Toxicology**, [S. I.], v. 4, n. 4, p. 173-183, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0027-5>. Disponível em: <https://sciendo.com/article/10.2478/v10102-011-0027-5>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LAND, M. H. *et al.* Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. **Pediatrics**, [S. I.], v. 115, n. 1, p. 178-181, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2137>. Disponível em: <https://publications.aap.org/pediatrics/article->

abstract/115/1/178/66977/Lactobacillus-Sepsis-Associated-With-Probiotic?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 17 jan. 2023.

LANDSKRON, G. *et al.* Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, [S. l.], v. 2014, n. 149185, maio 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/149185>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/149185/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LEE, P. S. *et al.* Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: targeting on epigenetic regulation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 26-35, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1401>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.1401>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LEOZ, M. L. *et al.* The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. **The Application Clinical Genetics**, [S. l.], v. 8, p. 95-107, abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147/TACG.S51484>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=24654>. Acesso em: 25 jan. 2023.

LEU, R. K. *et al.* Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 246-251, fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp197>. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/31/2/246/2476894?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LI, C. *et al.* Mouse models for application in colorectal cancer: understanding the pathogenesis and relevance to the human condition. **Biomedicines**, [S. l.], v. 10, n. 7, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071710>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/7/1710>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LI, F. *et al.* Dietary pterostilbene inhibited colonic inflammation in dextran-sodium-sulfate-treated mice: a perspective of gut microbiota. **Infectious Microbes & Diseases**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 22-29, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/IM9.000000000000047>. Disponível em: [https://journals.lww.com/imd/Fulltext/2021/03000/Dietary\\_Pterostilbene\\_Inhibited\\_Colonic.4.aspx](https://journals.lww.com/imd/Fulltext/2021/03000/Dietary_Pterostilbene_Inhibited_Colonic.4.aspx). Acesso em: 25 jan. 2023.

LI, W. *et al.* Analysis of expression of cyclin E, p27kip1 and Ki67 protein in colorectal cancer tissues and its value for diagnosis, treatment and prognosis of disease. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 23, p. 4874-4879, dez. 2016. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/11850>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LIBOREDO, J. C. *et al.* Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 367-372, maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-86502013000500008>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/acb/a/fYJ8fxxNKgc3R73TNWYxdHM/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LINDSTROM, C. G.; ROSENGREN, J. E.; FORK, F. T. Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. **Acta Radiologica**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 523-536. 1979. DOI: <https://doi.org/10.1177/028418517902000314>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/028418517902000314>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LIU, H. P. *et al.* Chemoprevention of intestinal adenomatous polyposis by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in APC (Min/+) mice. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 132, n. 11, p. 2667-2681, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.27929>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.27929>. Acesso em: 25 jan. 2023.

LIU, Y. *et al.* Recent advances in synthesis, bioactivity, and pharmacokinetics of pterostilbene, an important analog of resveratrol. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 21, p. 5166, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25215166>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/5166>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LOKE, Y. L. *et al.* Colon carcinogenesis: the interplay between diet and gut microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 603086, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.603086>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.603086/full>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LOOMANS-KROPP, H. A.; UMAR, A. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults. **Journal of Cancer Epidemiology**, [S. l.], v. 2019, p. 9841295, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/9841295>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jce/2019/9841295/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

LOPEZ-CERON, M.; PELLISE, M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. **Colorectal Disease**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. e157-e164, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02925.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-1318.2011.02925.x>. Acesso em: 17 jan. 2023.

LUK, J. M. *et al.* Traditional chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation. **Liver International**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 879-890, set. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01527.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-3231.2007.01527.x>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MA, B.; HOTTIGER, M. O. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and NF- $\kappa$ B signaling pathway during inflammation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 7, n. 378, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00378/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

MACHADO, V. F. *et al.* A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. **Journal of Coloproctology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 53-57, jan./mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2015.09.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2237936315000957>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 135-150, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1159/000198104>. Disponível em: <https://karger.com/dig/article-abstract/17/2/135/100283/Experimental-Production-of-Diffuse-Colitis-in-Rats?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MAHDAVI, M.; LAFOREST-LAPOINTE, I.; MASSÉ, E. Preventing colorectal cancer through prebiotics. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1325, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061325>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1325>. Acesso em: 12 fev. 2023.

MAHMOD, A. I. *et al.* Chemoprevention effect of the Mediterranean diet on colorectal cancer: Current studies and future prospects. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 9, n. 924192, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.924192>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.924192/full>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MANNAL, P. W. *et al.* Pterostilbene inhibits pancreatic cancer in vitro. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 873-879, maio 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11605-010-1164-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11605-010-1164-4>. Acesso em: 9 fev. 2023.

MARTEL, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 607-615, jun. 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(12\)70137-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(12)70137-7/fulltext). Acesso em: 25 jan. 2023.

MARZO, F. *et al.* Effect of a diet supplemented with sphingomyelin and probiotics on colon cancer development in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [S. l.], v. 14, p. 407-414, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09916-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-022-09916-6>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MCCORMACK, D.; MCFADDEN, D. Pterostilbene and cancer: current review. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 173, n. 2, p. e53-e61, abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.054>. Disponível em: [https://www.journalofsurgicalresearch.com/article/S0022-4804\(11\)00815-8/fulltext](https://www.journalofsurgicalresearch.com/article/S0022-4804(11)00815-8/fulltext). Acesso em: 12 fev. 2023.

MCLELLAN, E. A.; BIRD, R. P. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colons. **Cancer Research**, [S. l.], v. 48, n. 21, p. 6183-6186, nov. 1988. Disponível em:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/48/21/6183/493310/Specificity-Study-to-Evaluate-Induction-of>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MCLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 2093-2098, nov. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/12.11.2093>. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article-abstract/12/11/2093/329978?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MELINCOVICI, C. S. *et al.* The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer - an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 81-89. 2016. Disponível em: <https://rjme.ro/RJME/resources/files/570116081089.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2023.

MELLING, N. *et al.* High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 69, n. 3, p. 209-214, mar. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>. Disponível em: <https://jcp.bmj.com/content/69/3/209>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MENGHINI, P. *et al.* A novel model of colitis-associated cancer in SAMP1/YitFc mice with Crohn's disease-like ileitis. **PLoS One**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e0174121, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174121>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174121>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MI, B. *et al.* Beta-catenin expression is altered in dysplastic and nondysplastic aberrant crypt foci of human colon. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 294-300, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318194525c>. Disponível em: [https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2009/07000/\\_\\_\\_catenin\\_Expressi\\_on\\_is\\_Altered\\_in\\_Dysplastic\\_and.5.aspx](https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2009/07000/___catenin_Expressi_on_is_Altered_in_Dysplastic_and.5.aspx). Acesso em: 12 fev. 2023.

MODESTO, R. *et al.* Chemically induced colitis-associated cancer models in rodents for pharmacological modulation: a systematic review. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 11, n. 10, 2739, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11102739>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/10/2739>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MOHANIA, D.; KANSAL, V. N.; SHAH, D. Probiotic dahi containing lactobacillus acidophilus and lactobacillus plantarum suppresses DMH induced preneoplastic lesions in early colorectal carcinogenesis in wistar rats. **American Journals of Cancer Biology**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 24-37, 201300153, set. 2013.

MORI, H. *et al.* Crypt foci and  $\beta$ -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 566, n. 3, p. 191-208, maio 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.08.002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138357420300111X>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MORTON, H. A theory of the etiology of cancer. **Glasgow Medical Journal**, [S. l.], v. 88, n. 6, p. 321-333, 1917. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5924008/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MOTA, L. P. *et al.* Importance of colorectal cancer screening: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e472101321360, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21360>. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21360>. Acesso em: 12 fev. 2023.

NAKAGAMA, H.; NAKANISHI, M.; OCHIAI, M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. **Cancer Science**, [S. l.], v. 96, n. 10, p. 627-636, out. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00107.x>.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2005.00107.x>. Acesso em: 25 jan. 2023.

NEUFERT, C.; BECKER, C.; NEURATH, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, p. 1998-2004, ago. 2007. DOI:

<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.279>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/nprot.2007.279>. Acesso em: 17 jan. 2023.

NEWELL, L. E.; HEDDLE, J. A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S. l.], v. 564, n. 1, p. 1-7, nov. 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.06.005>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571804001627>. Acesso em: 12 fev. 2023.

NEYRINCK, A. M. *et al.* Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice:

Potential implication of the gut microbiota. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v.

109, n. 5, p. 802-809, mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114512002206>.

Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/017305603AD79FF3130D10A36A45D8A0/S0007114512002206a.pdf/polyphenol-rich-extract-of-pomegranate-peel-alleviates-tissue-inflammation-and-hypercholesterolaemia-in-high-fat-diet-induced-obese-mice-potential-implication-of-the-gut-microbiota.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2023.

NORLIDA, A. O.; PHANG, K. S. Histomorphology of aberrant crypt foci in colorectal carcinoma. **Malaysian Journal of Pathology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 111-116, dez.

2010. Disponível em: [http://www.mjpath.org.my/2010.2/Aberrant\\_crypt\\_foci.pdf](http://www.mjpath.org.my/2010.2/Aberrant_crypt_foci.pdf).

Acesso em: 12 fev. 2023.

OBRADOR, E. *et al.* Pterostilbene in cancer therapy. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 492, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10030492>. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/3/492>. Acesso em: 17 jan. 2023.

OGATA, D. C. *et al.* Aberrant crypt foci and cancer of the colorectal junction: the correlation between  $\beta$ -catenin/Ki-67 expression and the occurrence of early microscopic secondary lesions surrounding periphery colorectal cancer. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 114-120, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912010000200008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/BrQSsyfBz3HypggZqdSzNvp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 25 jan. 2023.

OH, W.; GAO, Y.; SHAHIDI, F. Stilbenoids: chemistry, occurrence, bioavailability and health effects-a review. **Journal of Food Bioactives**, [S. l.], v. 13, p. 20-31, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.31665/JFB.2020.13256>. Disponível em: <http://www.isnff-jfb.com/index.php/JFB/article/view/199/335>. Acesso em: 17 jan. 2023.

OHISHI, A. *et al.* Bifidobacterium septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 156, n. 4, p. 679-681, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.041>. Disponível em: [https://www.jpeds.com/article/S0022-3476\(09\)01150-0/fulltext](https://www.jpeds.com/article/S0022-3476(09)01150-0/fulltext). Acesso em: 12 fev. 2023.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>. Acesso em: 12 fev. 2023.

OSHIMA, H.; OSHIMA, M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. **Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 47, p. 97-106, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0523-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-011-0523-6>. Acesso em: 25 jan. 2023.

PAI, S. G. *et al.* Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 101, maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0471-6>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PANEBIANCO, C.; LATIANO, T.; PAZIENZA, V. Microbiota manipulation by probiotics administration as emerging tool in cancer prevention and therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 679, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00679>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00679/full>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PARRASIA, S. *et al.* Long-term pterostilbene supplementation of a high-fat diet increases adiponectin expression in the subcutaneous white adipose tissue. **Nutraceuticals**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 102-115, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals2020008>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1661-3821/2/2/8>. Acesso em: 25 jan. 2023.

PASHIRZAD, M. *et al.* Role of Wnt3a in the pathogenesis of cancer, current status and prospective. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 46, p. 5609-5616, out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04895-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-019-04895-4>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PATYAR, S. *et al.* Chemopreventive effect of artesunate in 1,2 dimethylhydrazineinduced rat colon carcinogenesis. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 102-107, jul./set. 2017. DOI: [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_61\\_17](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_61_17). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527695/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PAUL, S. *et al.* Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the b-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 1272-1278, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq004>. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/31/7/1272/2477060?login=false>. Acesso em: 25 jan. 2023.

PENG, R. M. *et al.* Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: Resveratrol and pterostilbene. **BioFactors**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 5-15, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1405>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.1405>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PERSE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **Animal Models of Human Pathology**, [S. l.], v. 2011, n. 473964, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/473964>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/473964/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PERSE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. **Radiology and Oncology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 61-70, jan. 2005. Disponível em: [https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokument/Radiology\\_39\\_1\\_10.pdf](https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokument/Radiology_39_1_10.pdf). Acesso em: 25 jan. 2023.

PEYRIN-BIROULET, L. *et al.* Colorectal cancer in inflammatory bowel diseases: a population-based study (1976–2008). **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 2247-2251, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/ibd.22935>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/18/12/2247/4608970?login=false>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S. l.], v. 387, n. 7, p. 605-620, jul. 2014. DOI: [10.1007/s00210-014-0985-1](https://doi.org/10.1007/s00210-014-0985-1). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-014-0985-1>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PIERRE, C. C. *et al.* Kaiso overexpression promotes intestinal inflammation and potentiates intestinal tumorigenesis in ApcMin/+ mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [S. l.], v. 1852, n. 9, p. 1846-1855, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443915001775?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

POWELL, S. M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature**, [S. l.], v. 359, n. 6392, p. 235-237, set. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1038/359235a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/359235a0>. Acesso em: 25 jan. 2023.

PRASAD, S. *et al.* Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Medica**, [S. l.], v. 76, n. 11, p. 1044-1063, ago. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250111>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0030-1250111>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PRATHEESHKUMAR, P. *et al.* Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 1159-1184, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152012803833035>. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/article/47064>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PRETLOW, T. P. *et al.* Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Research**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 1564-1567, mar. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1997197/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

PRIEGO, S. *et al.* Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: ABCl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 3330-3342, out. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0363>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/mct/article/7/10/3330/92935/Natural-polyphenols-facilitate-elimination-of-HT>. Acesso em: 25 jan. 2023.

QI, L. *et al.* Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 33, n. 107, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0107-4>. Disponível em: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-014-0107-4>. Acesso em: 12 fev. 2023.

QUANTE, M. *et al.* The gastrointestinal tumor microenvironment. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 145, n. 1, p. 63-78, jul. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.052>. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(13\)00501-5/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(13)00501-5/fulltext). Acesso em: 17 jan. 2023.

RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. **Drug Development Research**, [S. l.], v. 69, n. 7, p. 460-

471, nov. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.20276>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.20276>. Acesso em: 25 jan. 2023.

RAMOS, M. V. *et al.* Anti-inflammatory latex proteins of the medicinal plant *Calotropis procera*: a promising alternative for oral mucositis treatment. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 69, p. 951-966, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01365-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-020-01365-7>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RAO, C. V. *et al.* Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ in F344 rats. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 939-944, maio 1999. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.14.5.939>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.14.5.939>. Acesso em: 17 jan. 2023.

RAVISHANKAR, D. *et al.* Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 45, n. 12, p. 2821-2831, dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S135727251300321X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jan. 2023.

REFAAT, B. *et al.* Activins and their related proteins in colon carcinogenesis: insights from early and advanced azoxymethane rat models of colon cancer. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 879, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2914-9>. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2914-9>. Acesso em: 12 fev. 2023.

REIS, S. A. *et al.* Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. **Nutrition Research**, [S. l.], v. 37, p. 1-19, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0271531716303943?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

REMSBERG, C. M. *et al.* Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 169-179, fev. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2277>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2277>. Acesso em: 25 jan. 2023.

RIBEIRO, M. L. *et al.* Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 391-402, out./dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-98802007000400005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbc/a/LtTCMDtMdSpntXhTnqQwqRB/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RICHE, D. M. *et al.* Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. **Journal of Toxicology**, [S. l.], v. 2013, n. 463595, fev. 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2013/463595>. Disponível em:  
<https://www.hindawi.com/journals/jt/2013/463595/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

RIMANDO, A. M. *et al.* Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 15, p. 4713-4719, jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf040095e>. Disponível em:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf040095e>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RISIO, M. The natural history of adenomas. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 271-280, jun. 2010. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.04.005>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691810000594?via%3Di> hub. Acesso em: 25 jan. 2023.

RITCHIE, L. E. *et al.* Polyphenol-rich sorghum brans alter colon microbiota and impact species diversity and species richness after multiple bouts of dextran sodium sulfate-induced colitis. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 91, n. 3, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv008>. Disponível em:  
<https://academic.oup.com/femsec/article/91/3/fiv008/436169?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RODRIGUES, M. A. M. *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using c in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 351-355, mar. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000300010>. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/bjmr/a/zSBQkGhcbSqDcNSNhVY8rjd/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 25 jan. 2023.

RUBIO, C. A. *et al.* Minimal invasive carcinoma of the colon in rats. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 161-165, abr. 1986. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888166/pdf/amjpathol00157-0167.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RUDOLPHO, R.E. *et al.* Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, [S. l.], v. 14, n.3, p.605-8, mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0058>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/14/3/605/169688/Risk-Factors-for-Colorectal-Cancer-in-Relation-to>. Acesso em: 20 jul. 2023.

RUIZ, M. J. *et al.* Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 8, p. 3180-3186, abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf803579e>. Disponível em:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803579e>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 197-215, dez. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8). Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165600003758?via%3Di> hub. Acesso em: 25 jan. 2023.

SAKAI, E. *et al.* Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1918-1924, set. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0104>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/20/9/1918/68880/Investigation-of-the-Prevalence-and-Number-of>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SALEHI, A.; HOSSEINI, S. M.; KAZEMI, S. Antioxidant and anticarcinogenic potentials of propolis for dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in wistar rats. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2022, n. 8497562, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/8497562>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/8497562/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SALEHI, B. *et al.* Human microbiome and homeostasis: insights into the key role of prebiotics, probiotics, and symbiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 61, n. 9, p. 1415-1428, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1760202>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1760202>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SÁNCHEZ-ALCOHOLADO, L. *et al.* The role of the gut microbiome in colorectal cancer development and therapy response. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 6, 1406, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12061406>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1406>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SANDERS, M. E. *et al.* Safety assessment of probiotics for human use. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 164-185, jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/gmic.1.3.12127>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SANKARAPANDIAN, V. *et al.* An update on the effectiveness of probiotics in the prevention and treatment of cancer. **Life**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 59, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12010059>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/1/59>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, p. e-213700, fev, 2023. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700/2644>. Acesso em: 19 abr. 2023.

SCANDIUZZI, M. C. P.; CAMARGO, E. B.; ELIAS, F. T. S. Colorectal câncer in Brazil: perspectives for early detection. **Brasília Médica**, [S. l.], v.56, p.8-13. 2019. DOI: <https://doi.org/10.5935/2236-5117.2019v56a02>. Disponível em: <http://rbm.org.br/related-content/289/pt-BR>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SCHOLER-DAHIREL, A. *et al.* Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/beta-catenin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v.

108, n. 41, p. 17135-17140, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1104182108>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1104182108>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 13, p. 800-812, nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3610>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc3610>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SCOPSI, L.; LARSSON, L. I. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. **Histochemistry**, [S. l.], v. 84, p. 221-230, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00495786>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00495786>. Acesso em: 9 fev. 2023.

SEBIO, A.; KAHN, M.; LENZ, H. J. The potential of targeting Wnt/ $\beta$ -catenin in colon cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 611-615, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.906580>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2014.906580>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein-bound, non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 192-205, out. 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269768900924>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SEIDEL, D. V. *et al.* Shaping functional gut microbiota using dietary bioactives to reduce colon cancer risk. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 46, p. 191-204, out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.06.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X17301694?via%3Di> hub. Acesso em: 17 jan. 2023.

SHAKIB KHOOB, M.; HOSSEINI, S. M.; KAZEMI, S. In vitro and in vivo antioxidant and anticancer potentials of royal jelly for dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in wistar rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, n. 9506026, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9506026>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2022/9506026/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SHANAHAN, F. A commentary on the safety of probiotics. **Gastroenterology Clinics of North America**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 869-876, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2012.08.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889855312001008?via%3Di> hub. Acesso em: 25 jan. 2023.

SHU, L. *et al.* Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 29, p. 483-502, set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9239-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-010-9239-y>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SI, H. *et al.* Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora. **Seminars in Cancer Biology**, [S. I.], v. 70, p. 3-10, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X20301000>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SILVA, M. J. B. *et al.* The multifaceted role of commensal microbiota in homeostasis and gastrointestinal diseases. **Journal of Immunology Research**, [S. I.], v. 2015, n. 321241, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/321241>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/321241/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SILVA-REIS, R. *et al.* An integrative approach to characterize the early phases of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in the rat. **Biomedicines**, [S. I.], v. 10, n. 2, p. 409, fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020409>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/2/409>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SINGH, Z. *et al.* Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. **Iranian Journal of Public Health**, [S. I.], v. 43, p. 7-16, out. 2014. Supl. 3. Disponível em: <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/4858/4450>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SIVAMARUTHI, B. S.; KESIKA, P.; CHAIYASUT, C. The role of probiotics in colorectal cancer management. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. I.], v. 2020, n. 3535982, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/3535982>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2020/3535982/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SMERDU, V.; PERSE, M. Effect of carcinogen 1,2-dimethylhydrazine treatment on fiber types in skeletal muscles of male wistar rats. **Physiological Research**, [S. I.], v. 66, p. 845-858, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.33549/physiolres.933508>. Disponível em: [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/66/66\\_845.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/66/66_845.pdf). Acesso em: 9 fev. 2023.

SOARES, L. S.; MENDES, A. C. S.; SAMPAIO, J. R. F. Incidence and mortality of malignant neoplasms in the Northeast / Brazil in the period from 1979 to 2016: an Integrative Review. **Brazilian Journal of Development**, [S. I.], v. 7, n. 3, p. 33262-33275, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-854>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/27437>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SOBECKI, M. *et al.* Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. **Cancer Research**, [S. I.], v. 77, n. 10, p. 2722-2734, maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0707>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/77/10/2722/616181/Cell-Cycle-Regulation-Accounts-for-Variability-in>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SOBHANI, I. *et al.* Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, [S. I.], v. 6, n. 3, p. 215-229, maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.1177/1756283X12473>. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756283X12473674>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SØDRING, M.; GUNNES, G.; PAULSEN, J. E. Spontaneous initiation, promotion and progression of colorectal cancer in the novel A/J Min/1 mouse. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 138, n. 8, p. 1936-1946, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.29928>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29928>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, [S. l.], v. 535, p. 56-64, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature18846>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature18846>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SOUAZÉ, F. *et al.* Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 708-716, abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi269>. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/27/4/708/2390975?login=false>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Emergence of nutrigenomics and dietary components as a complementary therapy in cancer prevention. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 29, p. 89853-89873, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24045-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-24045-x>. Acesso em: 9 fev. 2023.

STEELE, V. E.; LUBET, R. A. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. **Seminars in Oncology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 327-338, ago. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.05.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093775410000758?via%3Di> hub. Acesso em: 17 jan. 2023.

STEVENS, R. G.; SWEDE, H.; ROSENBERG, D. W. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 252, n. 2, p. 171-183, jul. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383506006380?via%3Di> hub. Acesso em: 12 fev. 2023.

STOFILOVÁ, J. *et al.* Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to N, N-dimethylhydrazine. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 361-368, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567576914005001>. Acesso em: 25 jan. 2023.

STONE, W. L. *et al.* The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 55-66, mar. 2014. DOI:

<https://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i3.55>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v6/i3/55.htm>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SUH, N. *et al.* Pterostilbene, an active constituent of blueberries, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis model in rats. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 13, n. 1, p.350-355, jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1528>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/13/1/350/193348/Pterostilbene-an-Active-Constituent-of-Blueberries>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SUN, Y. *et al.* Gastrointestinal biotransformation and tissue distribution of pterostilbene after long-term dietary administration in mice. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 372, n. 131213, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131213>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814621022196>. Acesso em: 17 jan. 2023.

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**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209-249, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 12 fev. 2023.

SUZUI, M.; MORIOKA, T.; YOSHIMI, N. colon preneoplastic lesions in animal models. **Journal of Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 335-341, dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0028>. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/26/4/26\\_2013-0028/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/26/4/26_2013-0028/_article). Acesso em: 25 jan. 2023.

TAKAHASHI, H. *et al.* Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: one-year following up after polypectomy. **World Journal of Gastrointestinal Endoscopy**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 561-564, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4253/wjge.v4.i12.561>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536853/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TAKAYAMA, T. *et al.* Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **N Engl J Med**, [S. l.], v.18, n. 339, p.1277-84, out. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM199810293391803>. Disponível em: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199810293391803?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199810293391803?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 20 jul. 2023.

TAKETO, M. M.; EDELMANN, W. Mouse models of colon cancer. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 136, n. 3, p. 780-798, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.049>. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(08\)02307-X/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(08)02307-X/fulltext). Acesso em: 12 fev. 2023.

TANAKA, T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. **International Journal of Inflammation**, [S. l.], v. 2012, n. 658786, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/658786>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/iji/2012/658786/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TANAKA, T. Preclinical cancer chemoprevention studies using animal model of inflammation-associated colorectal carcinogenesis. **Cancers**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 673-700, set. 2012b. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers4030673>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/4/3/673>. Acesso em: 25 jan. 2023.

TANAKA, T. *et al.* A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer Science**, [S. l.], v. 94, n. 11, p. 965-973, nov. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>. Acesso em: 12 fev. 2023.

TEIXEIRA, M. C. *et al.* Primary prevention of colorectal cancer: myth or reality? **World Journal of Gastrointestinal Endoscopy**, [S. l.], v. 20, n. 41, p. 15060-15069, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15060>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223239/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

THAISS, C. A. *et al.* The microbiome and innate immunity. **Nature**, [S. l.], v. 535, p. 65-74, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature18847>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature18847>. Acesso em: 12 fev. 2023.

THAKER, A. I. *et al.* Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 67, p. 4100, set. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3791/4100>. Disponível em: <https://www.jove.com/t/4100/modeling-colitis-associated-cancer-with-azoxymethane-aom-dextran>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TOMAS, J.; LANGELLA, P.; CHERBUY, C. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. **Animal Health Research Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p.54-63, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1466252312000072>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-health-research-reviews/article/abs/intestinal-microbiota-in-the-rat-model-major-breakthroughs-from-new-technologies/6D0F653777DB3740993AC96686693F6B>. Acesso em: 25 jan. 2023.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**, [S. l.], v. 347, n. 6217, p. 78-81, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1260825>. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1260825>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TORRES-MARAVILLA, E. *et al.* Role of gut microbiota and probiotics in colorectal cancer: onset and progression. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1021, maio

2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051021>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/5/1021>. Acesso em: 12 fev. 2023.

TRICOLI, J. V. *et al.* Biologic and clinical characteristics of adolescent and young adult cancers: acute lymphoblastic leukemia, colorectal cancer, breast cancer, melanoma, and sarcoma. **Cancer**, [S. l.], v. 122, n. 7, p. 1017-1028, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.29871>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.29871>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TSAI, H. Y.; HO, C. T.; CHEN, Y. K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 134-147, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300965?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 524, p. 13-30, maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269716303578?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TUDEK, B.; BIRD, R. P.; BRUCE, W. R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Research**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. 1236-1240, mar. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2917353/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

UCCELLO, M. *et al.* Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**, [S. l.], v. 12, n. S35, nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2482-12-S1-S35>. Disponível em: <https://bmcsurg.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2482-12-S1-S35>. Acesso em: 17 jan. 2023.

UCHIYAMA, T. *et al.* Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. **Digestive Endoscopy**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 353-357, set. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1443-1661.2012.01289.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1443-1661.2012.01289.x>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ULLMAN, T. A.; ITZKOWITZ, S. H. Intestinal inflammation and cancer. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 1807-1816, maio 2011. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.057>. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(11\)00170-3/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(11)00170-3/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F). Acesso em: 12 fev. 2023.

URIHATA, T. *et al.* Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for beta-catenin in inflammation-induced rat colon carcinogenesis. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 4, p.

353-358, abr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11891526/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

VAN ES, J. H.; GILES, R. H.; CLEVERS, H. C. The many faces of the tumor suppressor gene APC. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 264, n. 1, p. 126-134, mar. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5142>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482700951425>. Acesso em: 12 fev. 2023.

VANO, Y. A.; RODRIGUES, M. J.; SCHNEIDER, S. M. Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer. **Bulletin Cancer**, [S. l.], v. 96, n. 6, p. 647-658, jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1684/bdc.2009.0874>. Disponível em: [https://www.jle.com/fr/revues/bdc/e-docs/lien\\_epidemiologique\\_entre\\_comportement\\_alimentaire\\_et\\_cancer\\_exemple\\_du\\_cancer\\_colorectal\\_281598/article.phtml](https://www.jle.com/fr/revues/bdc/e-docs/lien_epidemiologique_entre_comportement_alimentaire_et_cancer_exemple_du_cancer_colorectal_281598/article.phtml). Acesso em: 17 jan. 2023.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3m4YvKPKckKKFGvgYzyyWjn/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 fev. 2023.

VENDRAME, S. *et al.* Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 24, p.12815-12820, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2028686>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf2028686>. Acesso em: 17 jan. 2023.

VIVINUS-NEBOT, M. *et al.* Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. **Gut**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 744-752, maio 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304066>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/63/5/744>. Acesso em: 12 fev. 2023.

VUIK, F. E. *et al.* Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. **Gut**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 1820-1826, out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317592>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/68/10/1820>. Acesso em: 9 fev. 2023.

WAGNER, R. D.; BALISH, E. Potential hazards of probiotic bacteria for immunodeficient patients. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, [S. l.], v. 96, p. 165-170, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-2452\(98\)80011-0](https://doi.org/10.1016/S0020-2452(98)80011-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020245298800110>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WALIA, S. *et al.* Cyclooxygenase as a target in chemoprevention by probiotics during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rats. **Nutrition Cancer**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 603-611, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1011788>. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2015.1011788?journalCode=hnuc20>. Acesso em: 12 fev. 2023.

WANG, H. *et al.* Anti-inflammatory effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A6 on DSS-induced colitis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 133, n. 3, p. 2063-2073, set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15681>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/133/3/2063/6989273?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WANG, P.; SANG, S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. **BioFactors**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 16-25, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1410>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.1410>. Acesso em: 12 fev. 2023.

WANG, X.; YANG, Y.; HUYCKE, M. M. Microbiome-driven carcinogenesis in colorectal cancer: Models and mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 105, p. 3-15, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.504>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089158491630990X?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2023.

WANG, Y. *et al.* Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 5, 521, maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu9050521>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/521>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WANITSUWAN, W. *et al.* Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. **World Journal Gastroenterology**, [S. l.], v. 14, n. 39, p. 6052-6059, out. 2008. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6052>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2760180/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

WARD, J. M.; TREUTING, P. M. Rodent intestinal epithelial carcinogenesis: pathology and preclinical models. **Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 148-161, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623313505156>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623313505156>. Acesso em: 9 fev. 2023.

WARGOVICH, M. J.; BROWN, V. R.; MORRIS, J. Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 1705-1716, set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers2031705>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/2/3/1705>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WASHINGTON, M. K. *et al.* Pathology of rodent models of intestinal cancer: progress report and recommendations. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 144, n. 4, p. 705-717, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.067>. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(13\)00166-2/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(13)00166-2/fulltext). Acesso em: 12 fev. 2023.

WINAWER, S. J. Natural history of colorectal cancer. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 3-6, jan. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00338-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00338-6). Disponível em: [https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(98\)00338-6/fulltext](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(98)00338-6/fulltext). Acesso em: 17 jan. 2023.

WONG, S. C. *et al.* Nuclear  $\beta$  catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. **Molecular Pathology**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 347-352, dez. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/mp.56.6.347>. Disponível em: <https://mp.bmj.com/content/56/6/347>. Acesso em: 9 fev. 2023.

WONG, S. C. *et al.* Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1401-1408, fev. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0157-03>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/10/4/1401/184450/Prognostic-and-Diagnostic-Significance-of-Catenin>. Acesso em: 12 fev. 2023.

WU, X.; PATTERSON, S.; HAWK, E. Chemoprevention-history and general principles. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 25, n. 4-5, p. 445-459, ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.10.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691811001004>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WYNDER, E. L.; SHIGEMATSU, T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1520-1561, set. 1967. DOI: 10.1002/1097-0142(196709)20:9<1520::aid-cnrc2820200920>3.0.co;2-3. Disponível em: [https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(196709\)20:9%3C1520::AID-CNCR2820200920%3E3.0.CO;2-3](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(196709)20:9%3C1520::AID-CNCR2820200920%3E3.0.CO;2-3). Acesso em: 12 fev. 2023.

XU, X. *et al.* Gut microbiota, host health, and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 318-337, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.12.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975012002169>. Acesso em: 17 jan. 2023.

YAMADA, Y. *et al.* Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 1874-1878, mar. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11280741/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

YAMAZAKI, K. *et al.* The effect of an oral administration of lactobacillus casei strain shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 977-982, out. 2000. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.7.5.977>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.7.5.977>. Acesso em: 17 jan. 2023.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and probiotic-derived functional factors-mechanistic insights into applications for intestinal homeostasis. **Front Immunology**, [S. l.], v. 11,

p. 1428, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01428>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01428/full>. Acesso em: 9 fev. 2023.

YASHIRO, T. *et al.* Pterostilbene reduces colonic inflammation by suppressing dendritic cell activation and promoting regulatory T cell development. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 34, p. 14810-14819, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.202001502R>. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202001502R>. Acesso em: 12 fev. 2023.

YEO, S. C.; HO, P. C.; LIN, H. S. Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: The impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation, and dosing route on bioavailability. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 1015-1025, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200651>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201200651>. Acesso em: 9 fev. 2023.

YING, D. Y. *et al.* Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 75, n. 9, p. E588-E595, dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ZAUBER, A. G. *et al.* Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 366, p. 687-696, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100370>. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1100370>. Acesso em: 9 fev. 2023.

ZEINELDIN, M.; NEUFELD, K. L. More than two decades of Apc modeling in rodents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1836, n. 1, p. 80-89, ago. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.01.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304419X13000024?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ZHANG, Y. *et al.* Effect of pterostilbene, a natural derivative of resveratrol, in the treatment of colorectal cancer through Top1/Tdp1-Mediated DNA repair pathway. **Cancers**, [S. l.], v. 13, n. 16, p. 4002, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13164002>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/16/4002>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ZHU, Q. *et al.* Analysis of the intestinal lumen microbiota in an animal model of colorectal cancer. **PloS One**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. e90849, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090849>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090849>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ZHU, Q. *et al.* The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 34, p. 1285-1300, jun. 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s13277-013-0684-4>. Disponível em:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-013-0684-4>. Acesso em: 12 fev.  
2023.

ZHU, Y. *et al.* Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 309, n. 2, p. 119-127, out. 2011. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.004>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383511003405?via%3Di>  
hub. Acesso em: 12 fev. 2023.

ZINCZUK, J. *et al.* Antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to biomolecules in patients with colorectal cancer. Can malondialdehyde and catalase be markers of colorectal cancer advancement? **Biomolecules**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 637, out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom9100637>. Disponível em:  
<https://www.mdpi.com/2218-273X/9/10/637>. Acesso em: 17 jan. 2023.

## ANEXO A - Protocolo da CEUA

**CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS**

 **Unichristus**  
Centro Universitário Christus

Of. No. 031/18

Protocolo da CEUA: 031/18

Pesquisador Responsável: Prof. MARCIO WILKER SOARES CAMPELO

Titulo do Projeto: EFEITOS DE NOVO FITOQUÍMICO NO CÂNCER DE CÔLON EXPERIMENTAL.

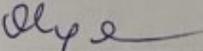
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 26 (vinte e seis) de março de 2019.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Rattus norvegicus albinus, linhagem Wistar, pesando entre 80 a 150 g.	Número Amostral:	96
----------	---	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 26/3/2020.

Fortaleza, 26 de março de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Olga Vale Oliveira Machado  
Coordenadora  
CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

## APÊNDICE A - Análise de pterostilbeno



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E  
ENFERMAGEM DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
LABORATÓRIO DE FARMACOTÉCNICA

### Análise de pterostilbeno

#### **Condições cromatográficas:**

Coluna: 250 x 4,66 mm (comprimento e diâmetro interno), empacotada com sílica quimicamente ligada agrupamentos octadecilsilano (C18), com tamanho de partícula de 5 µm, mantida em temperatura ambiente.

Fase móvel: Mistura de acetonitrila (ACN) e água na proporção de 50:50, em modo isocrático.

Fluxo: 1 mL/min

Detecção: UV 310 nm, monitorando em todo o espectro UV com uso de PDA. Volume de amostra injetada: 20 µL.

#### **Tratamento das amostras**

Cápsula contendo pterostilbeno, descrita pelo fabricante (Mental Refreshment – Lot nº 081216) como possuindo 150 mg em cada cápsula, foi esvaziada e seu conteúdo solubilizado com acetonitrila através do uso de agitador de tubo de ensaios e sonificador, e o volume final completado para 50 mL, resultando em concentração de 3 mg/mL. Esta solução foi diluída em acetonitrila para obter soluções nas concentrações de 0,03; 0,15 e 0,3 mg/mL (30, 150 e 300 µg/mL).

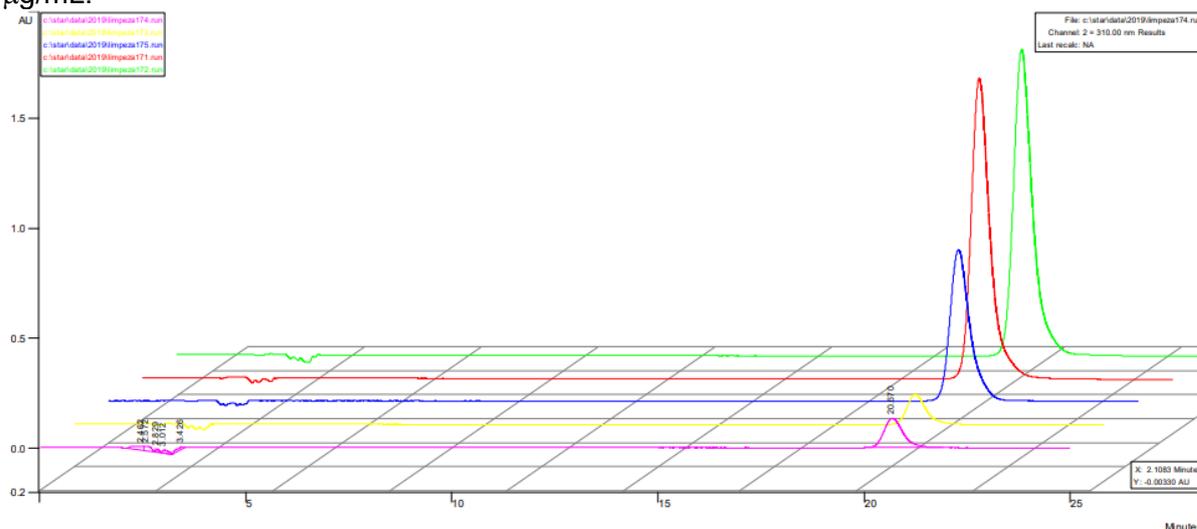
#### **Fígado**

Amostras de fígado removidos de animais tratados sob diferentes condições durante o experimento em andamento (grupo ingerindo apenas ração e grupo que recebeu dieta adicionada de pterostilbeno) foram fragmentados em pequenos tamanhos através do uso de lâmina de bisturi e em seguida submetidos a extração por sonicação com acetonitrila. A suspensão resultante foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante transferido para tubo eppendorf.

#### **Ensaio e resultados**

As amostras preparadas como descrito acima foram manualmente injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), inicialmente apenas as soluções contendo o pterostilbeno para que fosse avaliado o cromatograma obtido e, caso necessário, realizar os ajustes. Como inicialmente foi empregada composição de fase móvel ACN:água (45:55), o tempo de retenção do pterostilbeno foi próximo de 20 minutos e o tempo de cada corrida ficou longo., porém as respostas em termos de repetibilidade e linearidade apontaram que o método empregado foi capaz de detectar e até quantificar a presença de pterostilbeno nas amostras injetadas, como demonstrado na figura 1.

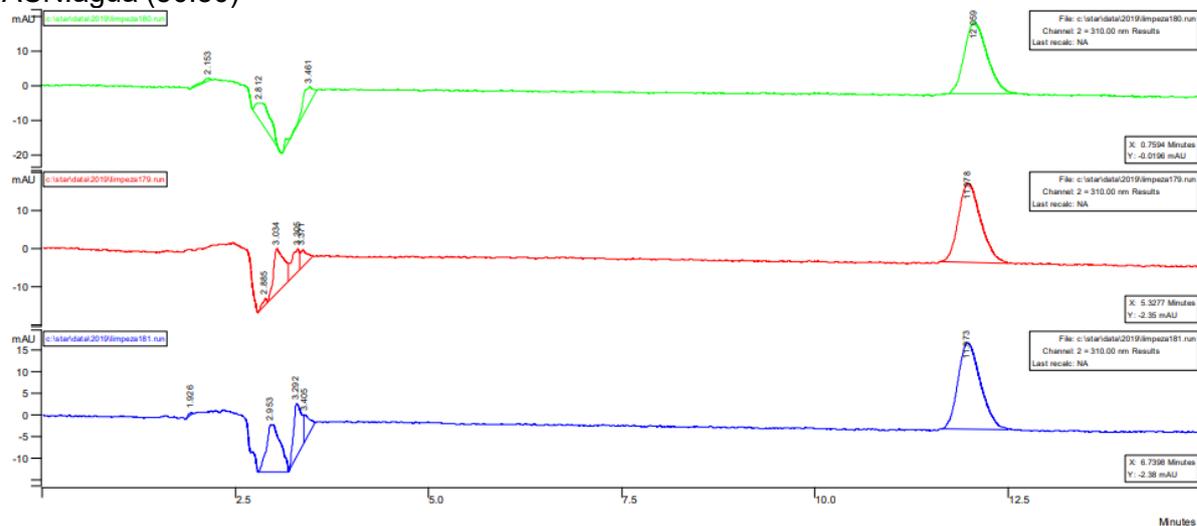
Figura 1 – cromatogramas das soluções de pterostilbeno nas concentrações de 30, 150 e 300 µg/mL.



Em decorrência deste resultado, passou-se a utilizar a composição da fase móvel com partes iguais de ACN e água, o que reduziu o tempo de retenção do analito e o tempo total de análise para cada injeção.

Na figura 2 apresentamos os resultados obtidos com injeções repetidas de amostras contendo o 30 µg/mL do fármaco em corridas com esta nova composição da fase móvel. Observa-se que o tempo de retenção passou a ser de 11 minutos, e o tempo de corrida foi de 15 minutos.

Figura 2 – cromatogramas de pterostilbeno a 30 µg/mL em fase móvel constituída de ACN:água (50:50)

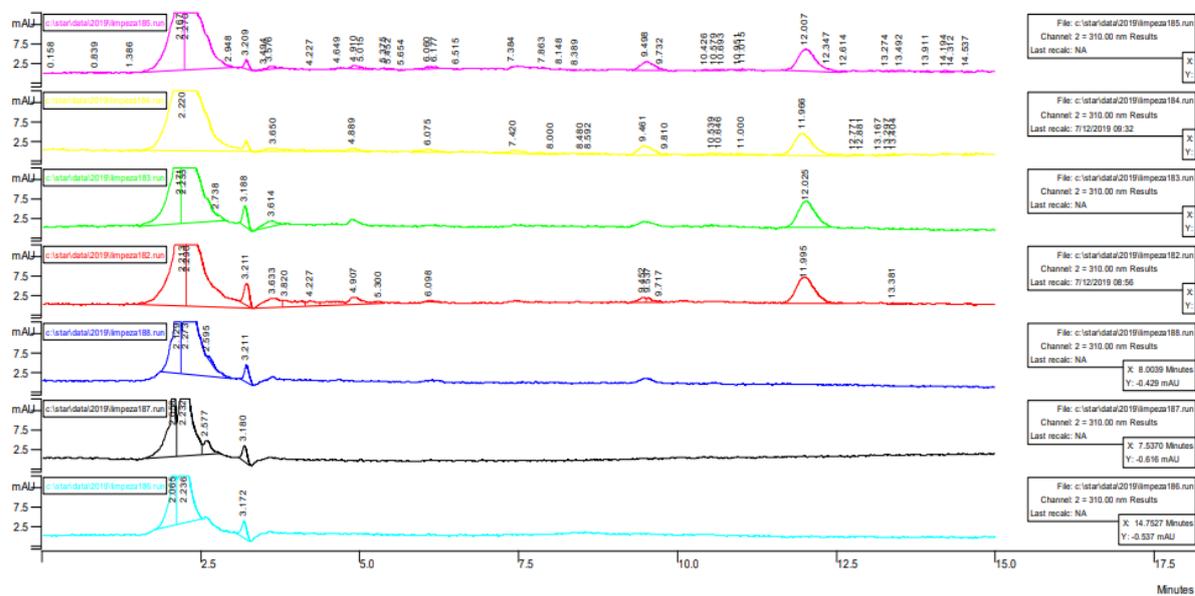


Diante desse resultado, passamos a realizar as injeções com as amostras provenientes do processamento dos fígados, conforme descrito acima, tendo sido processados fígados de animais que se alimentavam apenas com ração (dieta normal) e animais que receberam ração contendo pterostilbeno.

Na figura 3 são apresentados cromatogramas que expressam os resultados obtidos. Os quatro cromatogramas superiores apresentam o pico correspondente ao pterostilbeno no tempo de retenção próximo dos 11 minutos, caracterizando a presença da substância na amostra obtida da extração do fígado dos animais que estavam sob dieta com ração contendo pterostilbeno. Confirmando, dessa forma, que a ingestão do fármaco acrescentado à ração está resultando na sua presença no fígado desses animais. Os três cromatogramas inferiores

estão representadas as amostras provenientes da extração dos fígados dos animais submetidos a dieta com a ração normal, nos quais se constata a ausência do pterostilbeno.

Figura 3 – cromatogramas obtidos com extratos em ACN dos fígados dos animais sob dieta normal (3 inferiores) e dieta com ração acrescida de pterostilbeno (4 superiores).



## APÊNDICE B - Artigo publicado na Revista Cancers



Article

# Pterostilbene and Probiotic Complex in Chemoprevention of Putative Precursor Lesions for Colorectal Cancer in an Experimental Model of Intestinal Carcinogenesis with 1,2-Dimethylhydrazine

Márcio Alencar Barreira <sup>1,\*</sup>, Márcio Wilker Soares Campelo <sup>2,3</sup>, Conceição da Silva Martins Reboças <sup>4</sup>, Antoniella Souza Gomes Duarte <sup>4</sup>, Maria Lucianny Lima Barbosa <sup>4</sup>, Said Gonçalves da Cruz Fonseca <sup>5</sup>, Raphaela Ribeiro Queiroz <sup>3</sup>, Érica Uchoa Holanda <sup>3</sup>, Ana Beatriz Aragão de Vasconcelos <sup>3</sup>, Vitória Jannynne Guimarães de Sousa Araújo <sup>3</sup>, Gabriel Maia Diniz <sup>3</sup>, Reinaldo Barreto Oriá <sup>4</sup> and Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Walter Cantídio University Hospital, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-140, CE, Brazil

<sup>2</sup> Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-140, CE, Brazil

<sup>3</sup> School of Medicine, Christus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza 60192-345, CE, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny, and Nutrition, Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-170, CE, Brazil

<sup>5</sup> Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-370, CE, Brazil

\* Correspondence: drmarciobarreira@gmail.com



**Citation:** Barreira, M.A.; Campelo, M.W.S.; da Silva Martins Reboças, C.; Duarte, A.S.G.; Barbosa, M.L.L.; da Cruz Fonseca, S.G.; Queiroz, R.R.; Holanda, É.U.; de Vasconcelos, A.B.A.; de Sousa Araújo, V.J.G.; et al. Pterostilbene and Probiotic Complex in Chemoprevention of Putative Precursor Lesions for Colorectal Cancer in an Experimental Model of Intestinal Carcinogenesis with 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancers* **2023**, *15*, 2401. <https://doi.org/10.3390/cancers15082401>

Academic Editors: Takuji Tanaka and Alessandro Cama

Received: 11 February 2023

Revised: 28 March 2023

Accepted: 12 April 2023

Published: 21 April 2023



**Copyright:** © 2023 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/>).

**Simple Summary:** The composition of the intestinal microbiota, chronic inflammation, and oxidative stress are factors related to the onset of colorectal cancer (CRC). Diet is the environmental factor most related to the development of non-hereditary CRC. Pterostilbene has great potential as an antitumor drug for CRC chemoprevention. Several strains of probiotics in multiple combinations, concentrations, and dosages have been studied for cancer prevention. The available evidence is insufficient to justify the chronic and simultaneous administration of pterostilbene and probiotics with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to a population at high risk of CRC. In vivo studies may contribute to the incorporation of dietary supplementation with the ability to reduce the incidence of CRC. The combination of substances should be stimulated with a view to potentiating the expected effect through action on different targets.

**Abstract:** Dietary supplementation with pterostilbene (PS) and/or a probiotic (PRO) may ameliorate the intestinal microbiota in disease conditions. This study aims to evaluate PS and PRO for the chemoprevention of putative precursor lesions for colorectal cancer (CRC) in an experimental model of intestinal carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH). Sixty male Wistar rats were equally divided into five groups: Sham, 1,2-DMH, 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO, and 1,2-DMH + PS + PRO. PRO ( $5 \times 10^7$ /mL) was offered in water, and PS (300 ppm) was provided in the diet ad libitum. 1,2-DMH (20 mg/kg/week) was administered for 15 consecutive weeks. In the 25th week, proctocolectomy was conducted. PRO alone and PRO combined with PS were the best intervention strategies to improve experimental 1,2-DMH-induced CRC regarding several parameters of carcinogenesis. Our findings may contribute to the development of novel preventive strategies for CRC and may help to identify novel modulators of colon carcinogenesis.

**Keywords:** chemoprevention; colorectal neoplasms; aberrant crypt foci; probiotics; pterostilbene; intestinal microbiota; intestinal inflammation; Wnt signaling pathway; carcinogenesis

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second neoplasm with the highest number of potentially preventable deaths, behind lung neoplasms. About 45.1% of cancer-related deaths in the

United States are related to modifiable factors [1]. Aberrant crypt foci (ACF) are pre-neoplastic lesions associated with CRC development [2]. Most ACF are found in the distal colon segment [3], and the number of ACF is a predictive factor of the incidence of colorectal adenomas and CRC [2].

Diet is the environmental factor most closely related to the development of non-hereditary CRC [4]. It is estimated that thousands of cancer deaths can be prevented through dietary modifications [5], and up to 75% of CRC cases are associated with an unhealthy diet [6]. Many epidemiological studies have shown the relationship between adherence to the Mediterranean diet and a low incidence of CRC [7]. Natural foods with potential antitumorigenic properties are good targets for CRC prevention [8].

Pterostilbene (PS) and resveratrol are part of the stilbenes. PS, a polyphenolic compound, has a superior action to resveratrol in the attenuation of intestinal oxidative stress (OS), reducing reactive oxygen species (ROS) and regulating the mitochondrial redox state in vivo and in vitro models [9] with potential antitumoral effects to improve CRC [10]. PS has optimal oral absorption, metabolic stability, and lipophilicity [11,12]. PS can be rapidly absorbed and widely distributed in tissues with 2 to 25 times higher levels than in blood due to its high lipophilicity [13]. PS in large doses is considered pharmacologically safe [10] and has become popular due to its antioxidant and anti-inflammatory functions [12]. PS added to the diet, even at high doses (30, 300, and 3000 mg/kg/day), was found safe after a 28-day supplementation in rats [14].

The intestinal microbiota (IM) is increasingly recognized as modulating cancer-related immune and inflammatory responses [15]. Diet and environment play an important role in modulating the IM in CRC [16]. Higher numbers of *Escherichia coli*, *Escherichia faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Streptococcus gallolyticus* are increased with cancer development [17]. The administration of several strains of probiotics (PRO) in multiple combinations, concentrations, and dosages has been beneficial in modulating the IM and preventing cancer [15].

In recent years, the number of studies addressing the antioxidant properties of PROs has significantly increased. The most used strains are *Lactobacillus* (L) and *Bifidobacterium* (B), which release antioxidant enzymes (SOD and CAT) and metabolites (butyrate, GSH, and folate), with immune system stimulation. In addition, those strains are shown to improve postprandial lipids involved in oxidative cell injury, with a metal chelating action, increased Nrf2 expression, and OS-reducing exopolysaccharides release [18]. The probiotic *B. animalis subsp lactis* BB-12 is the most studied *Bifidobacterium* strain. It has excellent tolerance to gastric acidity and bile, optimal intestinal mucosa adherence, and pathogen inhibitory actions, and favors immunological responses [19]. *L. acidophilus* shows greater stability than *B. bifidum* in the intestinal microflora of mice in the long-term (5 months) [20]. PRO with *lactobacillus* and *bifidobacterium* has a long history of safety [21]. However, not all PROs protect against CRC development. The beneficial impact of PRO supplementation depends on the strain, dosage, intervention time, host physiology, and association with other dietary supplements [22]. A better understanding of IM dysbiosis effects on CRC pathophysiology is of utmost need [23], and its diet modulation may be a promising approach to preventing CRC [24].

Rodent carcinogenesis models are fast, reproducible, and exhibit an adenoma-to-carcinoma progression similar to that found in humans [25]. 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) is the eldest and most used carcinogen to induce tumors in rats [26]. Although the 1,2-DMH-induced carcinogenesis model does not represent the complexity of the human disease, it can be a valuable tool to study CRC and test novel chemopreventive anti-cancer agents [27]. Comparative histopathology revealed many similarities between intestinal cancer in rodents and humans, and comparative molecular pathology also showed genetic similarities [28].

The ideal and precise composition of the IM to promote antitumor effects and immune responses is not yet known [29]. The gut ecosystem in patients at higher risk of CRC may benefit from probiotic supplementation considering optimal concentrations, the duration

of therapy, and the method of supplementation [30]. Although probiotics are attractive agents for the prevention of CRC, their effectiveness has not yet been fully established, and more studies need to be carried out [31].

Our study aims to evaluate the isolated or combined effect of PS and PRO supplementation on the CRC tumorigenesis markers, OS reduction, and histopathological scores after 1,2-DMH-induced CRC. The potential protective effect of PRO and PS in preventing precursor lesions for CRC would be particularly beneficial for high-risk patients.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

The sample consisted of 60 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) from the Christus University Center (UNICHRISTHUS) vivarium, weighing  $80 \pm 10$  g. The study protocol was approved by the Ethics and Animal Research Committee (n° 031/2018). The rats were kept in polypropylene cages in a temperature-controlled environment ( $22 \pm 1$  °C) with a 12-h light/dark cycle, free access to drinking water, and a standard chow diet. Animals that showed any signs of illness or died were excluded from the study and replaced.

### 2.2. PRO and PS Preparation

A PRO complex capsule (GNC, EUA) contains 50 billion ( $50 \times 10^9$ ) colony-forming units (CFU) with the following bacteria: *Lactobacillus acidophilus* (CUL 60), *Lactobacillus acidophilus* (CUL 21), *Bifidobacterium bifidum* (CUL 20), and *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (CUL 34). The PRO capsule was diluted in drinking water to reach a solution with a concentration of  $5 \times 10^7$  CFU/mL. An adult rat ingests approximately 20 mL ( $1 \times 10^9$  CFU) of water daily. The solution was offered ad libitum and changed three times a week.

Eight capsules with 150 mg of PS (Mental Refreshment, EUA) were mixed with 4 kg of the standard chow diet (Nuvilab CR-1, Quintia, BRA) to produce a diet with 300 ppm of PS or 3 mg of PS/10 g of diet. The PS molecular weight was 256.3 g/mol and the PS diet concentration was 1.17 mmol/kg. A rat weighing 200 g consumes on average 10 to 20 g of the diet with 3 to 6 mg of PS/day or 15 to 30 mg of PS/Kg/day. Tests were performed to verify the presence of PS in the rats' diet and liver (Supplementary Materials).

### 2.3. Experimental Design

The rats were randomly divided into five groups of 12 animals (control group or Sham, cancer group or 1,2-DMH, 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO, and 1,2-DMH + PS + PRO). The rats in the experimental group received a weekly subcutaneous injection of 1,2-DMH (D161802; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a dose of 20 mg/kg body weight for 15 weeks [32]. The carcinogen was dissolved in 0.9% NaCl (pH 6.5) and the control group received the equivalent dose of 0.9% NaCl without adding the carcinogen.

After dividing the groups, solutions with PRO (in the water) and/or PS (in the diet) were administered ad libitum from the first day of the research until euthanasia during the 25th week (Figure 1).

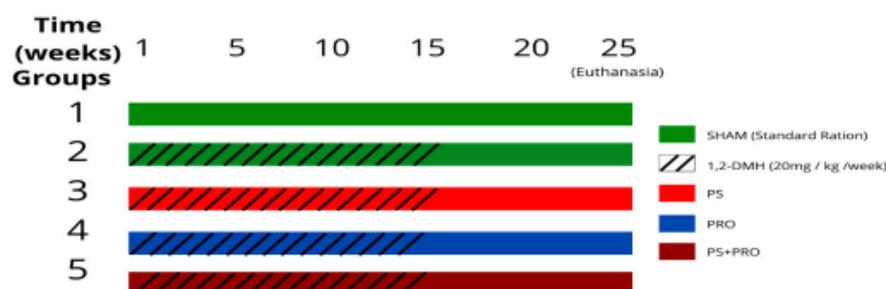


Figure 1. Experiment design.

#### 2.4. Surgical Procedure and Sample Preparation

At the end of 25 weeks, the animals were anesthetized with 10% ketamine hydrochloride (80 mg/kg/weight) and 2% xylazine hydrochloride (10 mg/kg/weight). The animals were positioned in dorsal decubitus on a wooden board and immobilized by fixing their limbs. Then, a laparotomy and proctocolectomy were performed. Subsequently, the surviving animals were sacrificed by hypovolemic shock after a section of the abdominal aorta was cut. Confirmation of death occurred by verifying the absence of respiratory movements (apnea), heartbeat (asystole), and pulse.

The proctocolectomy product was opened longitudinally at the antimesenteric border for intestinal lavage and extended with the exposed mucosa. After macroscopic evaluation and division of the colon into three equal segments, the specimens were randomly stored in a 10% buffered formalin solution ( $n = 30$ ) and in a freezer at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $n = 30$ ). The samples separated for histology and immunohistochemistry were embedded in paraffin using a conventional method and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Then, the paraffin blocks were used to make new slides that were stained with methylene blue (MB) at a concentration of 0.1% [33]. In the frozen samples, the distal segments of the colon were used to measure oxidative stress.

#### 2.5. Analyzed Variables

##### 2.5.1. Microscopy

The colonic mucosa was evaluated with an optical microscope with  $20\times$  and  $40\times$  objective magnification. To evaluate the H&E-stained slides, a blind evaluator used the inflammatory score of MacPherson and Pfeiffer [34]: zero (0) for normal histological findings; one (1) for villus shortening, loss of crypt architecture, sparse infiltration of inflammatory cells, vacuolization, and edema (<25%); two (2) for villus shortening, crypt necrosis, extensive inflammatory cell infiltration, vacuolization, and edema (25% to 50%); and three (3) for villus shortening, crypt necrosis, intense inflammatory cell infiltration, vacuolization, and edema (>50%).

To evaluate the slides stained with MB, 10 fields per bowel segment (distal, middle, and proximal) were photographed randomly at  $400\times$  magnification. The crypts were analyzed in cross-sections, and the factors analyzed were the number of aberrant crypt foci (ACF) and the location in the colon (distal, middle, and proximal). ACF was considered when the crypts had at least two criteria: an increased crypt size, a thicker epithelial layer, more intense staining (due to nuclear increase and mucin depletion) [33], an increased pericrypt zone, an elliptical shape [35], and a reduction of goblet cells greater than 50% [36]. The ACF were not classified as hyperplastic and dysplastic.

##### 2.5.2. Immunohistochemistry by the Tissue Microarray Technique

Six cylindrical distal colon fragments were collected from each rat from paraffin blocks. The material was collected with a 2 mm-diameter needle (Quick-Ray UNITMA<sup>®</sup>, Seongnam-si, Republic of Korea) to offer good sampling, ease the construction of the recipient block, and avoid damage to the donor block. Then, the material was included in three paraffin blocks with 70 wells. In the same blocks, tissues were included to serve as a positive control for immunohistochemical reactions. Sequential 3  $\mu\text{m}$ -thick sections of the tissue microarray block were deposited on silanized glass slides for conventional H&E staining and immunohistochemistry reactions.

Immunohistochemistry for iNOS, NF- $\kappa\text{B}$ , IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt3a proteins was performed using the streptavidin–biotin–peroxidase method [37]. In this technique, the slides were deparaffinized, hydrated in xylene and alcohol, and immersed in a retrieval solution of acid or basic pH. Then, antigenic retrieval took place for 30 min at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an automated medium (PT-LINK). After cooling, washings were performed with Dako wash buffer solution, interspersed with blocking endogenous peroxidase with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution (20 min). The sections were incubated for 1 h with primary goat anti-Ki67 antibody ab15580 (Abcam, Boston, MA, USA, 1:200), Anti- $\beta$ -catenin ab32572

(Abcam, 1:200), Wnt3a PAS37320 (Invitrogen, 1:500), P53 IS616 (Flex, Dako), Anti-NFKB p65 ab16502 (Abcam, 1:200), Anti-iNOS ab283655 (Abcam, 1:200), Anti-IL1- $\beta$  ab283818 (Abcam, 1:100), and TNF- $\alpha$  ab307164 (Abcam, 1:100) diluted in antibody diluent. After washing in wash buffer solution, incubation was performed with HRP polymer (DAKO) for 30 min. The sections were washed again with a wash buffer, followed by staining with chromogen 3,3'-diaminobenzidine-peroxide (DAB) [38] and counterstaining with Mayer's hematoxylin. Finally, the samples were dehydrated, and slides mounted. Negative controls were processed simultaneously and incubated with serum diluent only.

The images were captured using a light microscope coupled to a camera with a LAZ 3.5 acquisition system (Leica DM1000, Wetzlar, Germany). Ten fields were photographed per histological section (40 $\times$  objective), trying to select the areas with the highest marking in each animal (hot areas). For counting positive cells marked by each field, the adobe photoshop 8.0 program was used to obtain the total tissue area and the immunostained area. Positive cells were considered with brown staining within the cytoplasm for iNOS, NF-kB, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and Wnt3a and within the nucleus for Ki67 and both for P53 and  $\beta$ -catenin. The most evident labeling of the protein was considered, avoiding the background. Then, to measure the percentage (%) of the marked area, the following calculation was performed: marked area (%) = immunomarked area (pixels)  $\times$  100/total area (pixels) [39].

### 2.5.3. Oxidative Stress Markers

Samples from the distal segment of the large intestine were thawed and homogenized in cold EDTA (0.02 M) or KCL (0.15 M) to prepare a 10% homogenized suspension and estimate glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. Tissue GSH levels were estimated by the Sedlak method [40], with minor modifications. Approximately 100  $\mu$ L aliquots of tissue homogenate were mixed with 80  $\mu$ L of distilled water and 20  $\mu$ L of trichloroacetic acid (50%, *w/v*) and centrifuged at 4500 rpm for 15 min. The supernatant (100  $\mu$ L) was mixed with 200  $\mu$ L of TRIS buffer (0.4 M, Ph 8.9) and 10  $\mu$ L of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Sigma-Aldrich, USA). The absorbance of GSH was read at 412 nm using a control reagent (without the homogenate). The concentration was expressed in mg/g of tissue.

To determine the level of MDA in the tissues, the 2-thiobarbituric acid assay was used, which assays the level of lipid peroxidation (LP) in biological samples [41]. Aliquots of 125  $\mu$ L of tissue homogenized were mixed with 750  $\mu$ L of 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and 250  $\mu$ L of 0.6% 2-thiobarbituric acid and incubated for 1 h in a bath at 100 °C. Then, the solution was cooled on ice for 20 min, and 1 mL of n-butanol was added. The mixture was centrifuged (2000 rpm, 15 min at 4 °C), and 100  $\mu$ L of supernatant was added to 96-well plates to read the absorbance at 535 nm, using a control reagent (without the homogenate). The MDA concentration was expressed in nmol/mg tissue.

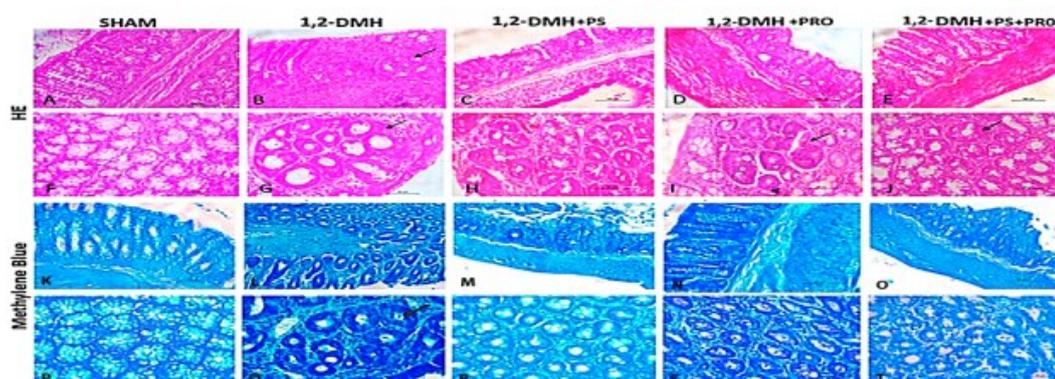
### 2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software, version 6.0. To assess normality, the Shapiro–Wilk test was used. Parametric data were evaluated by the one-way ANOVA test of variance followed by Tukey's multiple comparisons test, and non-parametric data were analyzed by the Kruskal–Wallis test followed by Dunns' multiple comparisons test. The significance level adopted was 0.05 ( $\alpha = 5\%$ ), and descriptive levels (p) lower than this value were considered significant. All quantitative results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), except for histopathological score data and the number of ACF that were presented as median, minimum, and maximum values.

## 3. Results

Figure 2 shows the representative images of colon sections stained with H&E and MB. In the Sham group, normal crypts were observed, showing preserved goblet cells and enterocytes and the absence of inflammatory infiltrate and edema in the mucosa, submucosa, and muscle layer. In the 1,2-DMH group, a marked loss of tissue architecture and a

reduction in goblet cells were seen. In addition, increased infiltration of inflammatory cells, pericrypt zone enlargement, and highly stained crypts were observed. The 1,2-DMH + PS group did not show significant improvements in histopathological scores. The PRO (1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO) groups showed more preserved goblet cells and reduced inflammatory processes. However, ACF were also observed in the PRO groups (Figure 2I,J).



**Figure 2.** Histopathology of the experimental groups. Photos 2 (A–E) and 2 (K–O) were under 20× objective magnification (scale bar 100 μm) and the longitudinal section. Photos 2 (F–J) and 2 (P–T) were under 40× objective magnification (scale bar 50 μm) and the cross-section. Black arrow—the presence of an aggregate of ACF with more intense staining due to nuclear enlargement and mucin depletion.

Table 1 shows the average of ACF identified by field in the three segments of the large intestine. In the large intestine middle and distal segments, the 1,2-DMH group showed a higher mean ACF per field compared to the Sham group. In the distal colon segment, a reduction in the number of ACF per field was found in the 1,2-DMH + PRO group, while in the medial colon segment, the reduction of ACF per field was seen in the groups 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO. The 1,2-DMH + PS group was not able to reduce the number of ACF per field, in any colonic segment, compared to the 1,2-DMH group. The substances used were not able to reduce the number of ACF per field in the proximal segment of the colon. The highest number of ACF per field was observed in the distal large intestine segment.

**Table 1.** Number of ACF per field in the three colonic segments. The values are expressed as the median, minimum, and maximum, where #  $p < 0.05$  vs. Sham and \*  $p < 0.05$  vs. group 1,2-DMH. The data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s post-test.

Intestinal Segments	Experimental Groups				
	Sham	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO
Proximal	0.0 (0–0.1)	1.8 (0.5–3.0)	0.5 (0–2)	0.5 (0–2)	0.5 (0–1)
Medium	0.0 (0–1)	1.9 (1.4–3.0) #	1.0 (0–2.8)	0.126 (0–1.4) *	0.25 (0–1) *
Distal	1.1 (0.3–2)	4.3 (3–6) #	2.25 (1–5)	2.0 (0.5–3.33) *	3.0 (1–5)

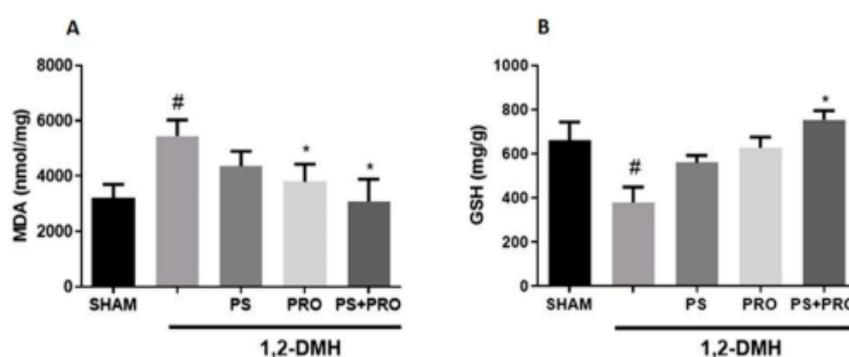
The 1,2-DMH group had a higher inflammatory score than the control group. In the middle and distal segments of the colon, the reduction in the inflammatory score was evident in the 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO groups. The reduction in the inflammatory score was more intense in the distal segment of the colon. The 1,2-DMH + PS group was not able to reduce the inflammatory score, in any colonic segment, in relation to

the 1,2-DMH group. The tested compounds were not able to reduce inflammatory scores in the proximal segment of the colon (Table 2).

**Table 2.** Histopathological score of inflammation in the three colonic segments. The scores are expressed as the median, minimum, and maximum values, where #  $p < 0.05$  vs. Sham and \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. 1,2-DMH group. The data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s post-test.

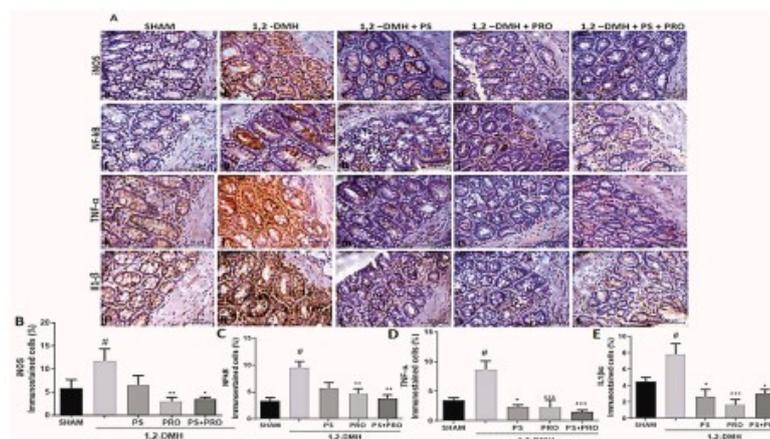
Intestinal Segments	Experimental Groups				
	Sham	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO
Proximal	1 (0–1)	3 (1–3) #	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–2)
Medium	0 (0–1)	2 (1–3) #	2 (0–2)	1 (1–2) *	1 (0–2) *
Distal	0 (0–1)	3 (2–3) #	2 (1–3)	1 (1–2) **	2 (1–2) **

MDA levels were higher in the 1,2-DMH group compared to the Sham group. 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO supplementation significantly reduced MDA levels in the distal large intestine. In addition, GSH levels were significantly reduced in the 1,2-DMH group, an effect that was improved by either compounded 1,2-DMH + PS + PRO supplementation (Figure 3).



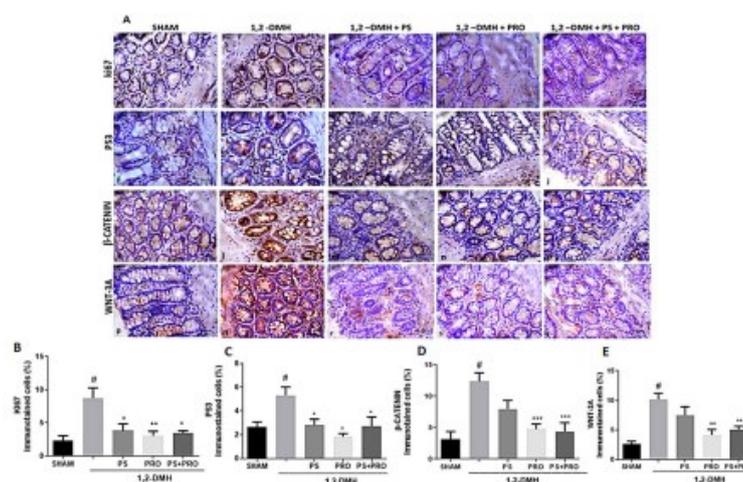
**Figure 3.** Analysis of oxidative damage by measuring MDA and GSH levels in the distal colon segment. (A) MDA and GSH (B) levels in the distal colon segment. The values are presented as the mean  $\pm$  SEM. #  $p < 0.05$  vs. Sham and \*  $p < 0.05$  vs. 1,2-DMH group. For statistical analysis, the one-way ANOVA test was used followed by Tukey’s post-test.

The immunostaining of iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL1 $\beta$  proteins is present in all groups of the experiment (Figure 4A). A statistically significant difference was found between the 1,2-DMH group and the Sham group regarding the expression of iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL1 $\beta$  proteins. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  immunolabeling in the treatment groups was not different from the Sham. The immunoeexpression of iNOS and NF- $\kappa$ B proteins was reduced in the 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO groups compared to the 1,2-DMH group. The 1,2-DMH + PS group was not able to significantly alter the expression of iNOS, and NF- $\kappa$ B proteins in relation to the 1,2-DMH group (Figure 4B,C). The immunoeexpression of TNF- $\alpha$  and IL1 $\beta$  proteins was reduced in the 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO, and 1,2-DMH + PS + PRO groups compared to the 1,2-DMH group (Figure 4D,E).



**Figure 4.** Immunopositivity of iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL1 $\beta$  proteins in the distal colon segment. (A) Representative histology of iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL1 $\beta$  immunolabeling in the experimental groups. The graphs (B–E) represent the mean  $\pm$  SEM of the percentage of the immunopositive area for iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL1 $\beta$  in relation to the total area. #  $p < 0.05$  vs. Sham and \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. 1,2-DMH group. (B,D) The data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s post-test. (C,E) The data were analyzed by the one-way ANOVA test followed by Tukey’s post-test.

The immunostaining of Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt-3a proteins is more evident in the intestinal crypts and present in all groups of the experiment (Figure 5A). There is a statistically significant difference between the 1,2-DMH group and the Sham group regarding the expression of Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt-3a proteins. The immunopositivity of Ki67 and P53 proteins was reduced in the 1,2-DMH + PS, 1,2-DMH + PRO, and 1,2-DMH + PS + PRO groups in relation to the 1,2-DMH group (Figure 5B,C). The immunopositivity of  $\beta$ -catenin and Wnt-3a proteins was reduced in groups 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO in relation to group 1, 2-DMH. The 1,2-DMH + PS group was not able to significantly alter the expression of  $\beta$ -catenin and Wnt-3a proteins in relation to the 1,2-DMH group (Figure 5D,E).



**Figure 5.** Immunopositivity of Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt-3a proteins in the distal colon. (A) Representative histology of Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt-3a protein immunolabeling in the experimental

groups. The graphs (B–E) represent the mean  $\pm$  SEM of the percentage of the immunopositive area for Ki67, P53,  $\beta$ -catenin, and Wnt-3a in relation to the total area. #  $p < 0.05$  vs. Sham and \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. 1,2-DMH group. (B,C) The data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s post-test. (D,E) The data were analyzed by the one-way ANOVA test followed by the Tukey’s post-test.

#### 4. Discussion

The concept of cancer prevention is to delay, regress, or eliminate precancerous lesions. The ACF number can be used as a reliable biomarker of preneoplastic and cancerous lesions in the large intestine [42]. This information contributes to developing different preventive strategies for CRC and helps in identifying modulators of colon carcinogenesis [35]. As expected, our study confirmed a higher number of ACF in the 1,2-DMH-induced CRC group compared to the Sham rats. The PRO and PS-PRO combination improved the number of microscopic lesions, including the number of ACF.

The histopathological inflammation scoring by MacPherson and Pfeiffer has been used in experimental research to quantify the intensity of the acute inflammatory process of the colon [34]. However, we showed an interesting association between the number of ACF and the intensity of the inflammatory process after 1,2-DMH-induced CRC. Our data indicated that both PRO and the PRO and PS combination improved the inflammatory score, indicating that this score is a valuable tool to assay CRC histopathological remediation.

Furthermore, our data support prolonged inflammation being associated with higher levels of ROS and CRC severity [43]. GSH is one key antioxidant of the tissue arsenals for balancing OS. Importantly, reduced levels of GSH in the 1,2-DMH-induced CRC were found in our study and were closely associated with increased intestinal MDA (a surrogate marker of OS). Zińczuk et al. observed a reduction in GSH levels and an increase in MDA levels in the blood of patients with CRC compared to healthy controls [44]. ACF from CRC patients were compared to healthy tissues, confirming a pro-oxidative crypt milieu. Only PRO and PS combined supplementation could improve intestinal GSH and MDA levels in our cancer-challenged rats. Of note, *B. lactis* A6 was found to attenuate OS by lowering MDA levels and increasing GSH levels in colonic tissues. It may also attenuate the inflammatory response via the downregulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in colonic tissues [45]. Intestinal MDA levels have been consistently related to tumor invasion depth and lymph node metastasis [44].

Our data showed that PS and PRO alone or in combination improved TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  immunolabeling, two critical pro-inflammatory cytokines related to CRC pathogenesis [46], in the colon tissue compared to the 1,2-DMH-challenged controls, reaching the level of the sham group. Sustained high levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  may precede putative CRC precursor lesions [47].

Although our findings with PS improved Ki67, p53, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  intestinal tissue expression, it did not improve Wnt3a and  $\beta$ -catenin expression. Interestingly, a low dose of PS (40 ppm) in the diet of rats for 45 weeks lessens colon tumorigenesis with reduced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and with cyclin D1 expression inhibition (a well-known Wnt downstream effector) [48]. This discrepancy may be due to different time periods of PS supplementation between both studies. Corroborating our data, PS was also found to reduce the expression of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  (by 51%) and IL-1 $\beta$  (by 47.7%) in mucosal scrapings derived from the colon of the Azoxymethane (AOM)-injected rats [48].

Interestingly, we found some P53-positive cells showing cytoplasmatic labeling, especially within the colonic crypt cells. Jansson and colleagues have highlighted that P53 cytoplasmatic accumulation could indeed be related to tumorigenesis and that both nuclear and cytoplasmatic expression of P53 could be associated with poor cancer prognosis [49]. Increased P53 colonic expression is an early genetic event in the process of CRC tumorigenesis. P53 mutations have been detected in the colonic mucosal tissue even with a negative or low-grade dysplasia and later surrounding regions of high-grade dysplasia and carcinoma. The mutation of a single P53 allele leads to tumoral growth advantage, with tumor cell

clonal expansion with disrupted cellular DNA repair mechanisms [50]. It is recognized that such mutations may occur in the absence of any morphological changes [51]. Neoplasia may arise within different populations of cells in separate areas of the same colon [52].

Cytoplasm and nuclear  $\beta$ -catenin expression is a useful marker for premalignant lesions of rat colon carcinogenesis [53,54]. In our study, we found  $\beta$ -catenin immunolabeling in colonic crypts, even in the ones with no clear ACF alteration. Early cytoplasmic or nuclear localization of  $\beta$ -catenin may be a meaningful proxy of CRC precursor lesions that may corroborate with the more laborious genetic analyses [55].

Notably, a diet with added PS (40 ppm) for eight weeks was found to suppress ACF (57% inhibition) and reduce iNOS expression [56]. In another study, when PS was added to the diet (50 or 250 ppm) of mice for 6 to 23 weeks, PS reduced the number of ACF which was more pronounced when the supplementation was given for a longer time, with diminished iNOS and COX-2 levels and declines of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, VEGF, and cyclin D1 expression, along with high apoptosis rates in the colon [57]. Previously reported studies had intestinal carcinogenesis induced with the carcinogen AOM. There are no reports of experimental studies with the addition of PS in the diet to prevent the development of CRC.

PS was recognized to modulate IM with anti-inflammatory effects in an experimental study with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. PS attenuated the severity of colitis by reducing IL-2 and IL-6 and shifted the IM composition toward a healthier profile, increasing the concentration of *Bifidobacterium* and reducing the concentration of harmful bacteria in the gut [58].

Our beneficial findings with PS could be mainly linked to pinostilbene, the primary metabolite of PS in the colon. Pinostilbene may play important roles in the anti-colon cancer effects elicited by orally administered PS [59]. Pinostilbene bio-availability may be influenced by the IM through demethylation [60]. PS-deconjugated metabolites are biologically more active than conjugated ones [61]. The combination of PRO with PS may favor a composition of microbiota that facilitates the metabolism of pinostilbene, thus improving its anti-cancer effects that may not be seen with PS alone.

In support of our data, the chemopreventive effects of PRO Dahi (20 g/day) with two types of *Lactobacillus* ( $2 \times 10^9$  CFU/g *Lactobacillus acidophilus* LaVK2 and *Lactobacillus plantarum* Lp9) have been highlighted following intestinal carcinogenesis (IC) with four applications of 1,2-DMH (40 mg/kg body weight) in Wistar rats [62]. In addition, pre-conditioned rats (for 1 week) with a diet containing 0.2% or 4% lyophilized cultures of *L. acidophilus* were later challenged with AOM (5 mg/kg/week) for two weeks to induce IC and kept on the same diet for 10 weeks and showed a significantly lower number of ACF compared to non-supplemented controls [63].

Another study has shown that PRO with *L. acidophilus* ( $2 \times 10^9$  CFU), orally administered (three times a week), significantly reduced the incidence and multiplicity of ACF after the induction of CRC with 1,2-DMH [64]. The preventive administration of PRO (07 CCM7766) with *L. plantarum* to rats that received applications of 1,2-DMH was able to reduce the inflammatory process in the colon through the negative regulation of proinflammatory cytokines (IL-2, IL-6, IL-17, and TNF- $\alpha$ ), the elevation of the anti-inflammatory cytokine IL-10, and the suppression of NF- $\kappa$ B activity in mucosal cells [65]. Furthermore, a PRO composed of *L. casei* BL23 improved CRC induced in mice by a single application of AOM (8 mg/kg) followed by four cycles of DSS (2.5%) in drinking water. PRO had an immunomodulatory effect through a reduction of the IL-22 cytokine and an antiproliferative effect measured through the upregulation of caspases 7 and 9. There were no significant differences between IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10. None of the mice in the group that received *L. casei* BL23 developed macroscopic tumors, while 67% of the mice in the cancer group did. Ki-67 immunolabeling was lower in the group that received PRO [66].

It has been documented that *B. lactis* inhibits the NF- $\kappa$ B pathway and regulatory genes in intestinal epithelial cells after the induction of IC with AOM and DSS [67]. The impairment of the intestinal epithelial barrier can be considered one of the first events that occurs in intestinal inflammation since it facilitates the entry of antigens from the

intestinal lumen to the mucosa, which can lead to an uncontrolled and exacerbated immune response [68].

An experimental model of CRC induction with 1,2-DMH (30 mg/kg, twice a week for three weeks) investigated the effect of a diet supplemented with a combination of *L. casei*, *B. bifidum* ( $10^8$  CFU/mL) and sphingomyelin (0.05%) and showed improvements in the number of ACF in the colon [69]. Another study showed that long-term (24 weeks) consumption of PRO (*B. longum* and *L. gasseri*) resulted in significant inhibition of ACF formation after the induction of CRC with 1,2-DMH [70].

In addition, PRO with De Simone formulation (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, and *Streptococcus thermophilus*) showed anti-cancer and anti-inflammatory activity in an experimental induction model of the CRC [71]. PRO enriched in *L. delbrueckii* UFV-H2b20 or *B. animalis* var. lactis Bb12 resulted in a reduction in the total number of ACF (55.7% and 45.1%, respectively). However, a synergistic effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* supplementation on ACF inhibition was not observed [72]. *L. acidophilus* has been found to have a more important effect than *B. bifidum* in the chemoprevention of CRC. The administration of PRO inhibited the incidence of colonic lesions by about 57% with *L. acidophilus* and 27% with *B. bifidum* compared to the group that had the induction of IC with AOM and did not receive PRO [73]. Future studies are warranted to better balance the PRO composition of selected bacteria with more anti-tumoral effects.

Table 3 summarizes the main selected studies with PRO, discussed in this article. All of the studies are from experimental CRC models. The current literature supports the benefit of PRO to intestinal health in improving colonic histopathological scores, OS, and inflammation biomarkers.

**Table 3.** Summary of animal model studies of PRO supplementation following CRC induction.

Studies	Bacteria Strains	Concentration	Supplementation Time	Benefits
Wang et al., 2022 [45]	<i>B. lactis</i> A6	$4 \times 10^9$ CFU/day	3 weeks	↓ MDA, ↑ SOD, GSH, and ↓ TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IL-6 levels in colon tissues
Kim et al., 2010 [67]	<i>B. lactis</i>	$5 \times 10^9$ CFU/g	9 weeks	↓ NF- $\kappa$ B and COX-2 expression
Mohania et al., 2013 [62]	<i>L. acidophilus</i> and <i>L. plantarum</i>	$2 \times 10^9$ CFU/g	32 weeks	↓ Number of ACF
Rao et al., 1999 [63]	<i>L. acidophilus</i>	diet containing 0.2% or 4% lyophilized cultures	10 weeks	↓ Number of ACF
Chang et al., 2012 [64]	<i>L. acidophilus</i>	$2 \times 10^9$ CFU/mL	10 weeks	↓ Number of ACF
Štofilová et al., 2015 [65]	<i>L. plantarum</i>	$1 \times 10^9$ CFU/mL	28 weeks	↓ Pro-inflammatory cytokines (IL-2, IL-6, IL-17, and TNF- $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B, COX-2, and iNOS proteins; ↑ goblet cell
Jacouton et al., 2017 [66]	<i>L. casei</i> BL23	$5 \times 10^9$ CFU/mL	46 days	↓ Ki-67 immunolabeling
Marzo et al., 2022 [69]	<i>L. casei</i> and <i>B. bifidum</i>	$1 \times 10^9$ CFU/mL	66 days	↓ Number of ACF
Foo et al., 2011 [70]	<i>L. gasseri</i> and <i>B. longum</i>	$1 \times 10^{11}$ CFU/g and $5 \times 10^9$ CFU/g	24 weeks	↓ Number of ACF

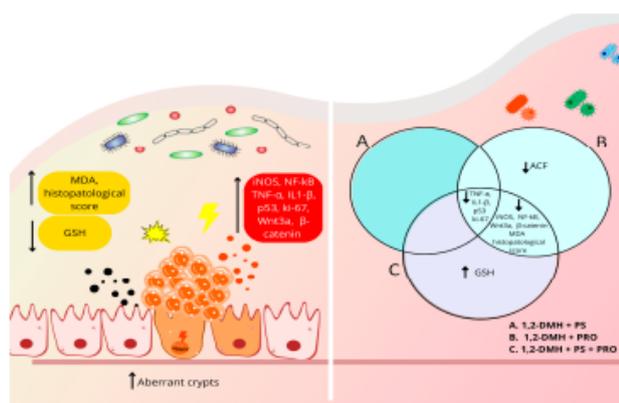
Table 3. Cont.

Studies	Bacteria Strains	Concentration	Supplementation Time	Benefits
Bassaganya-Riera et al., 2012 [71]	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , and <i>Streptococcus thermophilus</i>	1.2 billion bacteria per mouse/day	68 days	↓ Adenoma and adenocarcinoma formation; ↑ mRNA expression of TNF-α
Liboredo et al., 2013 [72]	<i>L. delbrueckii</i> or <i>B. lactis</i>	$3 \times 10^8$ CFU/mL	14 weeks	↓ Number of ACF (55.7% vs. 45.1%, respectively).
Agah et al., 2019 [73]	<i>L. acidophilus</i> or <i>B. bifidum</i>	$1 \times 10^9$ CFU/g	5 months	↓ Incidence of colonic lesions (57% vs. 27%, respectively), CEA, and CA19-9

↑, increased; ↓, decreased

The limitations of this study are that we could not dissect in more depth the OS metabolism (including SOD and catalase tissue levels) and the downstream Wnt signaling and other regulatory cell proliferation pathways. In the future, it would be interesting to evaluate IM modulation by PS and/or PRO.

Figure 6 summarizes our findings following the 1,2-DMH-challenge in the rats' colons and the protective effects of PS and/or PRO supplementation.



**Figure 6.** The outcome of PRO and/or PS supplementation in an experimental model of CRC development with 1,2-DMH. 1,2-DMH increased histopathological scores, OS (elevated MDA and reduced GSH), and selected inflammatory and tumorigenesis markers (Ki67,  $\beta$ -catenin, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ). 1,2-DMH + PRO and 1,2-DMH + PS + PRO reduced histopathological scores, and selected inflammatory and tumorigenesis markers (Ki67,  $\beta$ -catenin, Wnt3a, p53, NF- $\kappa$ B, iNOS, IL1- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) and improved OS (MDA). 1,2-DMH + PS + PRO also increased intestinal GSH levels. 1,2-DMH + PS reduced p53, Ki67, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  tissue expression, but without improving OS and histopathological scores. ↑, increased; ↓, decreased.

Progression from this precursor lesion to CRC is a multistep process, accompanied by alterations in several suppressor genes that result in abnormalities of cell regulation, and it has a natural history of 10–15 years. The 10–15-year time frame of this process provides an opportunity for both primary and secondary prevention [74]. An advantage of chemoprevention over the current secondary prevention strategy of routine colonoscopy is

the potential to intervene early in the carcinogenic sequence to reduce CRC risk, allowing for less frequent surveillance exams and a reduction in the number of invasive cancers.

## 5. Conclusions

New combination therapies are desirable for CRC prevention and adjuvant treatment. This was the first study to evaluate both PS and PRO supplementation in the chemoprevention of precursor lesions for CRC. Further studies should be performed to clarify which PRO-selected microorganism composition and concentration are more synergistic to improve PS biological effects and CRC chemoprevention.

Altogether our findings suggest that PRO alone and PRO combined with PS were the best intervention strategies to improve experimental 1,2-DMH-induced CRC regarding several parameters of carcinogenesis. Our findings highlight the importance of preventive measures to control intestinal microbiota and minimize CRC incidence in high-risk populations.

We acknowledge, due to the relatively low number of results obtained and experiments performed, we could not dissect in-depth the fine downstream inflammatory and early tumorigenesis crosstalk pathways (including the canonical Wnt signaling) that could shed light to find novel and promising pharmacological targets to halt CRC precursors lesion progression. Such results may guide future clinical trials in large populations worldwide to prevent/slow the occurrence of CRC.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15082401/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.A.B., M.W.S.C. and P.R.L.d.V.; data curation, M.A.B., C.d.S.M.R. and M.L.L.B.; formal analysis, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., A.S.G.D. and M.L.L.B.; investigation, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., M.L.L.B., R.R.Q., É.U.H., A.B.A.d.V., V.J.G.d.S.A. and G.M.D.; methodology, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., A.S.G.D., S.G.d.C.F. and P.R.L.d.V.; project administration, M.A.B., M.W.S.C. and P.R.L.d.V.; resources, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R. and R.B.O.; supervision, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R. and P.R.L.d.V.; validation, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., A.S.G.D. and M.L.L.B.; visualization, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., M.L.L.B., S.G.d.C.F., R.B.O. and P.R.L.d.V.; writing—original draft, M.A.B.; writing—review and editing, M.A.B., M.W.S.C., C.d.S.M.R., A.S.G.D., S.G.d.C.F., R.B.O. and P.R.L.d.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Animal Research Committee (protocol 031/2018) of Christus University Center.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this article.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank the staff of the Experimental Surgery Laboratory at the Christus University Center for their support during the experimental part of the research. The authors also appreciate the aid of the technical staff of the Morphology Department of the Federal University of Ceará for providing the necessary structure for sample analyses.

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

## Abbreviations

Aberrant crypt foci (ACF), azoxymethane (AOM), Bifidobacterium (B), colony-forming units (CFU), colorectal cancer (CRC), dextran sodium sulfate (DSS), glutathione (GSH), hematoxylin and eosin (H&E), intestinal carcinogenesis (IC), intestinal microbiota (IM), lactobacillus (L), lipid peroxidation (LP), malondialdehyde (MDA), methylene blue (MB), oxidative stress (OS), probiotics (PRO), pterostilbene (PS), reactive oxygen species (ROS), and 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH).

## References

1. Islami, F.; Goding Sauer, A.; Miller, K.D.; Siegel, R.L.; Fedewa, S.A.; Jacobs, E.J.; McCullough, M.L.; Patel, A.V.; Ma, J.; Soerjomataram, I.; et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 31–54. [\[CrossRef\]](#)
2. Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1323–1338. [\[CrossRef\]](#)
3. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*, 9–19. [\[CrossRef\]](#)
4. Araújo, J.R.; Gonçalves, P.; Martel, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 77–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Crosara Teixeira, M.; Braghiroli, M.I.; Sabbaga, J.; Hoff, P.M. Primary prevention of colorectal cancer: Myth or reality. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 15060–15069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Hen, C.C.; Lin, W.C.; Kong, M.S.; Shi, H.N.; Walker, W.A.; Lin, C.Y.; Huang, C.T.; Lin, Y.C.; Jung, S.M.; Lin, T.Y. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1623–1634. [\[CrossRef\]](#)
7. Mahmood, A.I.; Haif, S.K.; Kamal, A.; Al-Ataby, I.A.; Talib, W.H. Chemoprevention effect of the Mediterranean diet on colorectal cancer: Current studies and future prospects. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 924192. [\[CrossRef\]](#)
8. Ganesan, K.; Jayachandran, M.; Xu, B. Diet-Derived Phytochemicals Targeting Colon Cancer Stem Cells and Microbiota in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3976. [\[CrossRef\]](#)
9. Obrador, E.; Salvador-Palmer, R.; Jihad-Jebbar, A.; López-Blanch, R.; Dellinger, T.H.; Dellinger, R.W.; Estrela, J.M. Pterostilbene in Cancer Therapy. *Antioxidants* **2021**, *10*, 492. [\[CrossRef\]](#)
10. Remsberg, C.M.; Yáñez, J.A.; Ohgami, Y.; Vega-Villa, K.R.; Rimando, A.M.; Davies, N.M. Pharmacometrics of pterostilbene: Preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 169–179. [\[CrossRef\]](#)
11. Ruiz, M.J.; Fernández, M.; Picó, Y.; Mañes, J.; Asensi, M.; Carda, C.; Asensio, G.; Estrela, J.M. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3180–3186. [\[CrossRef\]](#)
12. Estrela, J.M.; Ortega, A.; Mena, S.; Rodríguez, M.L.; Asensi, M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2013**, *50*, 65–78. [\[CrossRef\]](#)
13. Kasai, C.; Sugimoto, K.; Moritani, I.; Tanaka, J.; Oya, Y.; Inoue, H.; Tameda, M.; Shiraki, K.; Ito, M.; Takei, Y.; et al. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 325–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Azzolini, M.; La Spina, M.; Mattarei, A.; Paradisi, C.; Zoratti, M.; Biasutto, L. Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 2122–2132. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, Y.; Li, Y.; Sun, C.; Chen, X.; Han, L.; Wang, T.; Liu, J.; Chen, X.; Zhao, D. Effect of Pterostilbene, a Natural Derivative of Resveratrol, in the Treatment of Colorectal Cancer through Top1/Tdp1-Mediated DNA Repair Pathway. *Cancers* **2021**, *13*, 4002. [\[CrossRef\]](#)
16. Chen, Y.; Zhang, H.; Ji, S.; Jia, P.; Chen, Y.; Li, Y.; Wang, T. Resveratrol and its derivative pterostilbene attenuate oxidative stress-induced intestinal injury by improving mitochondrial redox homeostasis and function via SIRT1 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *177*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
17. Panebianco, C.; Latiano, T.; Paziienza, V. Microbiota Manipulation by Probiotics Administration as Emerging Tool in Cancer Prevention and Therapy. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 679. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Hoffmann, A.; Kleniewska, P.; Pawliczak, R. Antioxidative activity of probiotics. *Arch. Med. Sci.* **2019**, *17*, 792–804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Jungersen, M.; Wind, A.; Johansen, E.; Christensen, J.E.; Stuer-Lauridsen, B.; Eskesen, D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. *Microorganisms* **2014**, *2*, 92–110. [\[CrossRef\]](#)
20. Khavari-Daneshvar, H.; Mosavi, M.; Khodayari, H.; Rahimi, E.; Ranji, P.; Mohseni, A.H.; Mahmudian, R.; Shidfar, F.; Agah, S.; Alizadeh, A.M. Modifications of mice gut microflora following oral consumption of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* probiotics. *Turk. J. Med. Sci.* **2017**, *47*, 689–694. [\[CrossRef\]](#)
21. Shanahan, F. A commentary on the safety of probiotics. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2012**, *41*, 869–876. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sivamaruthi, B.S.; Kesika, P.; Chaiyasut, C. The Role of Probiotics in Colorectal Cancer Management. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 3535982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Gao, D.; Jing, S.; Zhang, Q.; Wu, G. Pterostilbene protects against acute renal ischemia reperfusion injury and inhibits oxidative stress, inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in rats via the Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 1029–1035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Loke, Y.L.; Chew, M.T.; Ngeow, Y.F.; Lim, W.W.D.; Peh, S.C. Colon Carcinogenesis: The Interplay between Diet and Gut Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 603086. [\[CrossRef\]](#)

25. Sánchez-Alcoholado, L.; Ramos-Molina, B.; Otero, A.; Laborda-Illanes, A.; Ordóñez, R.; Medina, J.A.; Gómez-Millán, J.; Queipo-Ortuño, M.I. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers* **2020**, *12*, 1406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Machado, V.F.; Feitosa, M.R.; Rocha, J.J.R.; Féres, O. A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. *J. Coloproctol.* **2016**, *36*, 53–57. [[CrossRef](#)]
27. Gois, E., Jr.; Daniel, R.A.; Parra, R.S.; Almeida, A.L.; Rocha, J.J.; Garcia, S.B.; Féres, O. Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethylhydrazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. *Undersea Hyperb. Med.* **2012**, *39*, 693–698.
28. 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](#)]
29. Akbar, N.; Khan, N.A.; Muhammad, J.S.; Siddiqui, R. The role of gut microbiome in cancer genesis and cancer prevention. *Health Sci. Rev.* **2022**, *2*, 100010. [[CrossRef](#)]
30. Kim, S.H.; Lim, Y.J. The role of microbiome in colorectal carcinogenesis and its clinical potential as a target for cancer treatment. *Intest. Res.* **2022**, *20*, 31–42. [[CrossRef](#)]
31. Thaiss, C.A.; Zmora, N.; Levy, M.; Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* **2016**, *535*, 65–74. [[CrossRef](#)]
32. Patyar, S.; Patyar, R.R.; Medhi, B.; Khanduja, K.L. Chemopreventive effect of artesunate in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2017**, *8*, 102–107. [[CrossRef](#)]
33. 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](#)]
34. MacPherson, B.R.; Pfeiffer, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* **1978**, *17*, 135–150. [[CrossRef](#)]
35. 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](#)]
36. Erben, U.; Loddenkemper, C.; Doerfel, K.; Spieckermann, S.; Haller, D.; Heimesaat, M.M.; Zeitz, M.; Siegmund, B.; Kühl, A.A. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 4557–4576.
37. Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **1981**, *29*, 577–580. [[CrossRef](#)]
38. Scopsi, L.; Larsson, L.I. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. *Histochemistry* **1986**, *84*, 221–230. [[CrossRef](#)]
39. Brey, E.M.; Lalani, Z.; Johnston, C.; Wong, M.; McIntire, L.V.; Duke, P.J.; Patrick, C.W., Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 575–584. [[CrossRef](#)]
40. Sedlak, J.; Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **1968**, *25*, 192–205. [[CrossRef](#)]
41. Piechota-Polanczyk, A.; Fichna, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 605–620. [[CrossRef](#)]
42. Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay, R.; Mitra, S.; Crowe, S.E. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 329–354. [[CrossRef](#)]
43. Domijan, A.M.; Ralić, J.; Radić Brkanac, S.; Rumora, L.; Zanić-Grubišić, T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL—Application to various biological samples. *Biomed. Chromatogr.* **2015**, *29*, 41–46. [[CrossRef](#)]
44. Zińczuk, J.; Maciejczyk, M.; Zaręba, K.; Romaniuk, W.; Markowski, A.; Kędra, B.; Zalewska, A.; Pryczynicz, A.; Matowicka-Karna, J.; Guzińska-Ustymowicz, K. Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Biomolecules in Patients with Colorectal Cancer. Can Malondialdehyde and Catalase Be Markers of Colorectal Cancer Advancement? *Biomolecules* **2019**, *9*, 637. [[CrossRef](#)]
45. Wang, H.; Fan, C.; Zhao, Z.; Zhai, Z.; Hao, Y. Anti-inflammatory effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A6 on DSS-induced colitis in mice. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *133*, 2063–2073. [[CrossRef](#)]
46. Bousserouel, S.; Kauntz, H.; Gossé, F.; Bouhadjar, M.; Soler, L.; Marescaux, J.; Raul, F. Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 1485–1490. [[CrossRef](#)]
47. Kauntz, H.; Bousserouel, S.; Gosse, F.; Marescaux, J.; Raul, F. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 849–854. [[CrossRef](#)]
48. Paul, S.; DeCastro, A.J.; Lee, H.J.; Smolarek, A.K.; So, J.Y.; Simi, B.; Wang, C.X.; Zhou, R.; Rimando, A.M.; Suh, N. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the beta-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1272–1278. [[CrossRef](#)]
49. Jansson, A.; Gentile, M.; Sun, X.F. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 338–341. [[CrossRef](#)]
50. Brentnall, T.A.; Crispin, D.A.; Rabinovitch, P.S.; Haggitt, R.C.; Rubin, C.E.; Stevens, A.C.; Burmer, G.C. Mutations in the p53 gene: An early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **1994**, *107*, 369–378. [[CrossRef](#)]
51. Humphries, A.; Wright, N.A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 415–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Levine, D.S.; Rabinovitch, P.S.; Haggitt, R.C.; Blount, P.L.; Dean, P.J.; Rubin, C.E.; Reid, B.J. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* **1991**, *101*, 1198–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Yamada, Y.; Yoshimi, N.; Hirose, Y.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Sakata, K.; Shimizu, M.; Kuno, T.; Mori, H. Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1874–1878.
54. Yamada, Y.; Yoshimi, N.; Hirose, Y.; Hara, A.; Shimizu, M.; Kuno, T.; Katayama, M.; Qiao, Z.; Mori, H. Suppression of occurrence and advancement of beta-catenin-accumulated crypts, possible premalignant lesions of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 617–623. [[CrossRef](#)]
55. Furihata, T.; Kawamata, H.; Kubota, K.; Fujimori, T. Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for beta-catenin in inflammation-induced rat colon carcinogenesis. *Int. J. Mol. Med.* **2002**, *9*, 353–358. [[CrossRef](#)]
56. Suh, N.; Paul, S.; Hao, X.; Simi, B.; Xiao, H.; Rimando, A.M.; Reddy, B.S. Pterostilbene, an active constituent of blueberries, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis model in rats. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 350–355. [[CrossRef](#)]
57. Chiou, Y.S.; Tsai, M.L.; Wang, Y.J.; Cheng, A.C.; Lai, W.M.; Badmaev, V.; Ho, C.T.; Pan, M.H. Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8833–8841. [[CrossRef](#)]
58. Li, F.; Wang, Q.; Han, Y.; Song, M.; Cai, X.; Goulette, T.; Xiao, H. Dietary Pterostilbene Inhibited Colonic Inflammation in Dextran-Sodium-Sulfate-Treated Mice: A Perspective of Gut Microbiota. *Infect. Microbes Dis.* **2021**, *3*, 22–29. [[CrossRef](#)]
59. Sun, Y.; Wu, X.; Cai, X.; Song, M.; Zheng, J.; Pan, C.; Qiu, P.; Zhang, L.; Zhou, S.; Tang, Z.; et al. Identification of pinostilbene as a major colonic metabolite of pterostilbene and its inhibitory effects on colon cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 1924–1932. [[CrossRef](#)]
60. Wang, P.; Sang, S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *Biofactors* **2018**, *44*, 16–25. [[CrossRef](#)]
61. Sun, Y.; Wang, Q.; Wu, X.; Li, F.; Song, M.; Wang, M.; Cai, X.; Li, Z.; Gao, Z.; Zheng, J.; et al. Gastrointestinal biotransformation and tissue distribution of pterostilbene after long-term dietary administration in mice. *Food Chem.* **2022**, *372*, 131213. [[CrossRef](#)]
62. Mohania, D.; Kansal, V.K.; Shah, D. Probiotic Dahi Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* Suppresses DMH Induced Preneoplastic lesions in early Colorectal Carcinogenesis in Wistar Rats. *Am. J. Cancer Biol.* **2013**, *17*, 325–333.
63. Rao, C.V.; Sanders, M.E.; Indranie, C.; Simi, B.; Reddy, B.S. Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM7M in F344 rats. *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 939–944. [[CrossRef](#)]
64. Chang, J.H.; Shim, Y.Y.; Cha, S.K.; Reaney, M.J.T.; Chee, K.M. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFR1342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61 Pt 3*, 361–368. [[CrossRef](#)]
65. Štofilová, J.; Szabadosová, V.; Hřčková, G.; Salaj, R.; Bertková, I.; Hijová, E.; Strojny, L.; Bomba, A. Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to N,N-dimethylhydrazine. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *24*, 361–368. [[CrossRef](#)]
66. Jacouton, E.; Chain, F.; Sokol, H.; Langella, P.; Bermúdez-Humarán, L.G. Probiotic Strain *Lactobacillus casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1553. [[CrossRef](#)]
67. Kim, S.W.; Kim, H.M.; Yang, K.M.; Kim, S.A.; Kim, S.K.; An, M.J.; Park, J.J.; Lee, S.K.; Kim, T.I.; Kim, W.H.; et al. *Bifidobacterium lactis* inhibits NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1514–1525. [[CrossRef](#)]
68. Vivinus-Nébot, M.; Frin-Mathy, G.; Bziouche, H.; Dainese, R.; Bernard, G.; Anty, R.; Filippi, J.; Saint-Paul, M.C.; Tulic, M.K.; Verhasselt, V.; et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: Role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* **2014**, *63*, 744–752. [[CrossRef](#)]
69. Marzo, F.; Jauregui, P.; Barrenetxe, J.; Martínez-Peñuela, A.; Ibañez, F.C.; Milagro, F.I. Effect of a Diet Supplemented with Sphingomyelin and Probiotics on Colon Cancer Development in Mice. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2022**, *14*, 407–414. [[CrossRef](#)]
70. Foo, N.P.; Ou Yang, H.; Chiu, H.H.; Chan, H.Y.; Liao, C.C.; Yu, C.K.; Wang, Y.J. Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13337–13345. [[CrossRef](#)]
71. Bassaganya-Riera, J.; Viladomiu, M.; Pedragosa, M.; De Simone, C.; Hontecillas, R. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34676. [[CrossRef](#)]
72. Liboredo, J.C.; Anastácio, L.R.; Pelúzio Mdo, C.; Valente, F.X.; Penido, L.C.; Nicoli, J.R.; Correia, M.I. Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. *Acta Cirúrgica Bras.* **2013**, *28*, 367–372. [[CrossRef](#)]
73. Agah, S.; Alizadeh, A.M.; Mosavi, M.; Ranji, P.; Khavari-Daneshvar, H.; Ghasemian, F.; Bahmani, S.; Tavassoli, A. More Protection of *Lactobacillus acidophilus* Than *Bifidobacterium bifidum* Probiotics on Azoxymethane-Induced Mouse Colon Cancer. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 857–864. [[CrossRef](#)]
74. Winawer, S.J. Natural history of colorectal cancer. *Am. J. Med.* **1999**, *106*, 3S–6S; discussion 50S–51S. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## APÊNDICE C - Artigo publicado na Revista Acta Cirúrgica Brasileira



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

Original Article

<https://doi.org/10.1590/acb383623>

### The role of TNF- $\alpha$ and NF- $\kappa$ B in an experimental model of intestinal carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine

Márcio Alencar Barreira<sup>1\*</sup>, Márcio Wilker Soares Campelo<sup>2</sup>, Conceição da Silva Martins Rebouças<sup>3</sup>, Ana Paula Bomfim Soares<sup>4</sup>, Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos<sup>2</sup>

1. Universidade Federal do Ceará – Walter Cantídio University Hospital – Fortaleza (Ceará) – Brazil.
2. Universidade Federal do Ceará – School of Medicine – Department of Surgery – Fortaleza (Ceará) – Brazil.
3. Universidade Federal do Ceará – School of Medicine – Department of Morphology – Fortaleza (Ceará) – Brazil.
4. Centro Universitário Christus – School of Medicine – Fortaleza (Ceará) – Brazil.

#### ABSTRACT

**Purpose:** To analyze the potential of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) as colorectal cancer (CRC) biomarkers in an experimental model of intestinal carcinogenesis with 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH). **Methods:** Twenty-four male Wistar rats were divided into two groups: sham and 1,2-DMH. First, 1,2-DMH (20 mg/kg/week) was administered for 15 consecutive weeks. In the 25th week, proctocolectomy was conducted. Histopathological analysis, immunohistochemistry, and gene expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B were performed. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. The location of aberrant crypt foci (ACF) was analyzed by Kruskal-Wallis' test. For analyses with two groups with parametric data, the t-test was used; for non-parametric data, the Mann-Whitney's test was used.  $P < 0.05$  was considered significant. **Results:** The number of ACF and macroscopic lesions was significantly higher ( $p < 0.5$ ) in the 1,2-DMH group compared to the sham group, and most ACF were concentrated in the distal segment of the colon. There was a statistically significant increase ( $p < 0.5$ ) in protein and gene expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the 1,2-DMH group compared to the sham group. **Conclusion:** Our results provide supportive evidence that TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathways are strongly involved in CRC development in rats and might be used as early biomarkers of CRC pathogenesis in experimental studies.

**Key words:** Aberrant Crypt Foci. Carcinogenesis. Colorectal Neoplasms. Tumor Necrosis Factor-Alpha. NF-Kappa B.

#### Introduction

In general, the incidence and mortality from cancer are growing rapidly worldwide<sup>1</sup>. Malignant neoplasms will be the major cause of morbidity and mortality, surpassing cardiovascular diseases<sup>2</sup>. In men, colorectal cancer (CRC) represents the third neoplasm with the highest incidence (behind lung and prostate cancer) and the fourth neoplasm with the highest mortality (behind lung, liver, and stomach cancer). In women, CRC represents the second neoplasm with the highest incidence (behind breast neoplasm) and the third neoplasm with the highest mortality (behind breast and lung)<sup>3</sup>.

The use of animal models has the potential to increase our understanding of carcinogenesis, tumor biology, and the impact of specific molecular events on colon biology<sup>4</sup>. Rodent models are rapid, reproducible, and exhibit an adenoma-carcinoma sequence like that found in humans<sup>5</sup>. 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) is a widely used agent for developing CRC in rodents. Although DMH-induced CRC in rats does not represent the complexity of the human disease and does not replace studies with patient material, it is a valuable tool for studying the molecular events of CRC<sup>6</sup>.

\*Corresponding author: [drmarciobarreira@gmail.com](mailto:drmarciobarreira@gmail.com)

Received: May 5, 2023 | Accepted: Jul 17, 2023

Research performed at Postgraduate Program in Medical-Surgical Sciences, Federal Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brazil. Part of doctoral thesis. Tutor: Prof. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.



Aberrant crypt foci (ACF) are widely accepted as precursors of CRC morphologically, histologically, biologically, and genetically. Identification of ACF both in carcinogen-treated rodents and in human colon makes the study of CRC at precancerous stages possible. They harbor gene mutations that are vital to tumor formation and progression. By studying these lesions, it may be possible to learn more about the causes of colon carcinogenesis<sup>7</sup>. The prevalence and mean number of ACFs significantly increased with the stage of the adenoma–carcinoma sequence. ACFs may be useful as a reliable surrogate biomarker for colorectal carcinogenesis<sup>8</sup>.

Increased inflammatory stress stimulates adenomatous cell growth<sup>9</sup> and suggests a strong association between intestinal inflammation and CRC<sup>10</sup>. Research on tumor necrosis factors alpha (TNF- $\alpha$ ) and factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) have been tightly intertwined. Cytokines belonging to the TNF- $\alpha$  family induce rapid transcription of genes regulating inflammation, cell survival, proliferation, and differentiation, primarily through activation of the NF- $\kappa$ B pathway<sup>11</sup>. NF- $\kappa$ B is increasingly recognized as a crucial player in many steps of cancer initiation and progression<sup>12</sup>.

TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B seem to be interesting markers of intestinal carcinogenesis. However, we did not find scientific works dedicated to showing this association. Consolidation of markers related to CRC development strengthens the CRC induction model with 1,2-DMH. Thus, this study aimed to analyze the potential of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B as a CRC biomarker in an experimental model of intestinal carcinogenesis with 1,2-DMH.

## ■ Methods

The sample consisted of 24 male Wistar rats from the Centro Universitário Christus vivarium, weighing  $80 \pm 10$  g. The study protocol was approved by the Ethics and Animal Research Committee (no. 031/2018). The rats were kept in polypropylene cages in a temperature-controlled environment ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light/dark cycle, free access to drinking water, and a standard chow diet.

### *Experimental design*

The rats were randomly divided into two groups of 12 animals each (sham and 1,2-DMH). The rats in the experimental group received a weekly subcutaneous injection of 1,2-DMH (D161802; Ph 6,5; Sigma-Aldrich) at the dose of 20 mg/kg body weight for 15 weeks<sup>13</sup>. The carcinogen was dissolved in 0.9% NaCl, and the control group received the equivalent dose of 0.9% NaCl without adding the carcinogen.

### *Surgical procedure and sample preparation*

At the end of 25 weeks, the animals were anesthetized with 10% ketamine hydrochloride (80 mg/kg/weight) and 2% xylazine hydrochloride (10 mg/kg/weight). The animals were positioned in dorsal decubitus on a wooden board. Then, a laparotomy and proctocolectomy were performed. Subsequently, the surviving animals were sacrificed by hypovolemic shock after a section of the abdominal aorta.

The proctocolectomy product was opened longitudinally at the antimesenteric border for intestinal lavage and extended with the exposed mucosa. After dividing the colon into three equal segments, the specimens were randomly stored in a 10% buffered formalin solution ( $n = 12$ ) and a freezer at  $-80^\circ\text{C}$  ( $n = 12$ ) without RNA/DNA preservation solution. Samples separated for histology and immunohistochemistry were embedded in paraffin using a conventional method and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Then, the paraffin blocks were used to make new slides that were stained with methylene blue (MB) at a concentration of 0,1%<sup>14</sup>. In the frozen samples, the colon's distal segments were used for polymerase chain reaction (PCR).

### *Macroscopy*

The presence of macroscopic lesions (ML) was identified and recorded. ML were counted per rat immediately after euthanasia, and the results are shown as an average absolute number per group.

### Microscopy

The colonic mucosa was evaluated with an optical microscope with 20X and 40X objective magnification. To evaluate the slides stained with MB, 10 fields per bowel segment (distal, middle, and proximal) were photographed randomly at 400x magnification. The crypts were analyzed in cross-section, and the analyzed factors were the number of ACF and the location in the colon (distal, middle, and proximal). ACF was considered when the crypts had at least two of the criteria: increased crypt size, thicker epithelial layer, more intense staining (due to nuclear increase and mucin depletion), increased pericrypt zone, and elliptical shape<sup>14,15</sup>.

### Immunohistochemistry

Distal colon fragments were collected from each rat from paraffin blocks. Colon and positive control (colon carcinoma) tissue were deposited on silanized glass slides for conventional H&E staining and immunohistochemistry reactions. Immunohistochemistry for TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B proteins was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method<sup>16</sup>. In this technique, the slides were deparaffinized, hydrated in xylene and alcohol, and immersed in a retrieval solution of acid or basic pH. Then, antigenic retrieval took place for 30 minutes at 95°C in an automated medium (PT-LINK). After cooling, washings were performed with Dako wash buffer solution, interspersed with blocking endogenous peroxidase with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (20 min).

Sections were incubated for 1 hour with primary goat Anti-NF- $\kappa$ B p65 (1:200, code ab16502, Abcam, Cambridge, MA, United States of America) and TNF- $\alpha$  (1:100, code ab1793, Abcam, Cambridge, United Kingdom) diluted in antibody diluent. After washing the sections in wash buffer solution, incubation was performed with HRP polymer (Dako) for 30 minutes. The sections were washed again with a wash buffer, followed by staining with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine-peroxidase (DAB) and counterstaining with Mayer's hematoxylin. Finally, samples were dehydrated, and slides mounted. Negative controls were processed simultaneously and incubated with serum diluent only.

The images were captured using a light microscope coupled to a camera with a LAZ 3.5 acquisition system (Leica DM1000, Germany). Ten fields were photographed per histological section (40x objective), trying to select the areas with the highest marking in each animal (hot areas). For counting positive cells marked by each field, the Adobe Photoshop 8.0 program was used to obtain the total tissue area and immunostained area. Positive cells stained with brown cytoplasmic staining were considered. Then, to measure the percentage (%) of the marked area, Eq. 1<sup>17</sup> was performed:

$$\text{Marked area (\%)} = \text{immunomarker area (pixels)} \times 100 / \text{total area (pixels)} \quad (1)$$

### Quantitative real-time polymerase chain reaction

The gene expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B was analyzed in distal colon tissue stored at -80°C. Total RNA was extracted by an RNA isolation system (Promega) according to the manufacturer's protocol. The RNA was quantified by a NanoDrop spectrometer (Promega Corporation, Madison, WI, United States of America), and RNA quality was determined by examining the 260/280 ratio. A total of 1  $\mu$ g RNA was then reverse transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems; Warrington, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol. qPCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (A25742; Applied Biosystems; Warrington, United Kingdom), as described in the manufacturer's instructions.

To compare gene expression under different conditions, the expression under each condition (normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase—GAPDH, the endogenous control) was quantified relative to the control condition. TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B qPCR amplification was performed in a CFX Connect system (Bio-Rad Laboratories, StepOne Real time PCR System, 4376357, United States of America) under the following conditions: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. The relative expression levels of the genes were calculated using the threshold cycle (2- $\Delta\Delta$ CT) method<sup>18</sup>. Table 1 shows the sequence of the primers used.

**Table 1** – GAPDH, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  primer sequences.

Primer	Forwards primer	Reverse primer
GAPDH	5' TGCTGGTGCTGAGTATGTCG3'	5' TTGAGAGCAATGCCAGCC3'
NFK-B	5' CAGAGCTGGCAGAGAGACTG3'	5' TACGAAGGAGACTGCCACTG3'
TNF- $\alpha$	5' GAGGTCAACCTGCCCAAGTA3'	5' GTCGCTTCACAGAGCAATGA3'

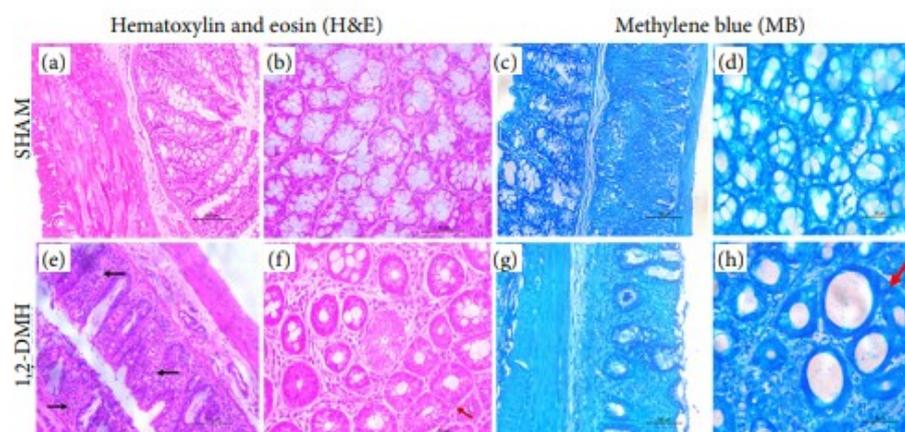
Source: Elaborated by the authors. GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, United States of America). The data normality was analyzed using the Shapiro-Wilk's test. The results of the location of ACFs were analyzed by Kruskal-Wallis' test, followed by Dunn's test (multiple comparisons). For analyses with two groups with parametric data, the *t*-test was used; for non-parametric data, the Mann-Whitney's test was used.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

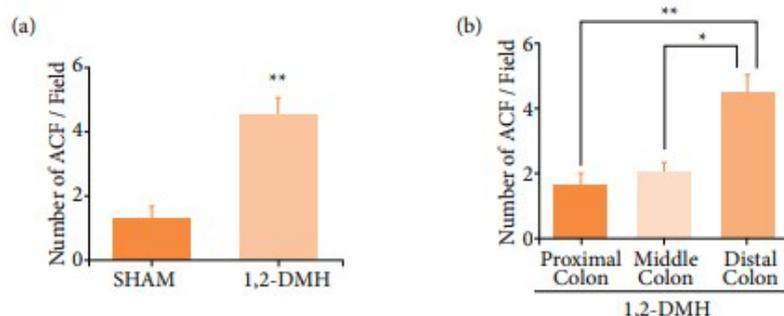
Figure 1 shows the representative images of colon sections stained with H&E and MB from the control group (Figs. 1a–1d) and 1,2-DMH group (Figs. 1e–1h).



Source: Elaborated by the authors.

**Figure 1** – Histopathology of the colon. (a and c) Longitudinal section with normal crypts showing preserved goblet cells and enterocytes, absence of inflammatory infiltrate, and edema in the mucosa, submucosa, and muscle layer (20x objective magnification; scale bar 100  $\mu$ m). (b and d) Cross section with crypts without morphological changes (40x objective magnification; scale bar 50  $\mu$ m). (e and g) Longitudinal section with aberrant crypts with inflammatory cell infiltrate (black arrow), loss of goblet cells, shortened and aberrant crypts (20x objective magnification; scale bar 100  $\mu$ m). (f and h) Cross-section showing the presence of multiple aberrant crypts (red arrow), increased pericrypt zone, presence of inflammatory cells, reduced goblet cells, and mucin depletion (40x objective magnification; 50  $\mu$ m scale bar).

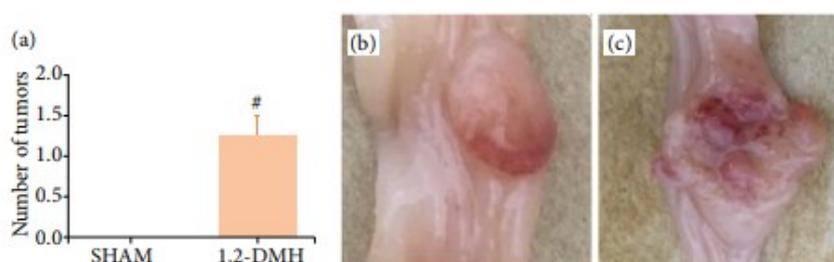
In Fig. 2a, the number of ACF was significantly higher ( $p < 0.01$ ) in the 1,2-DMH group compared to the sham group. Most lesions are in the distal colon, with the difference being more significant ( $p < 0.01$ ) between the proximal and distal parts of the colon (Fig. 2b).



Source: Elaborated by the authors. ACF: aberrant crypt foci; 1,2-DMH: 1,2-dimethylhydrazine.

**Figure 2** – Number of ACFs in the colon and location of ACFs in the 1,2-DMH group. (a) Data were analyzed by *t*-test with Mann-Whitney's test, where \*\* $p < 0.01$  vs. Sham group. (b) Data were analyzed by Kruskal-Wallis' test, followed by Dunn's test, where \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. other groups.

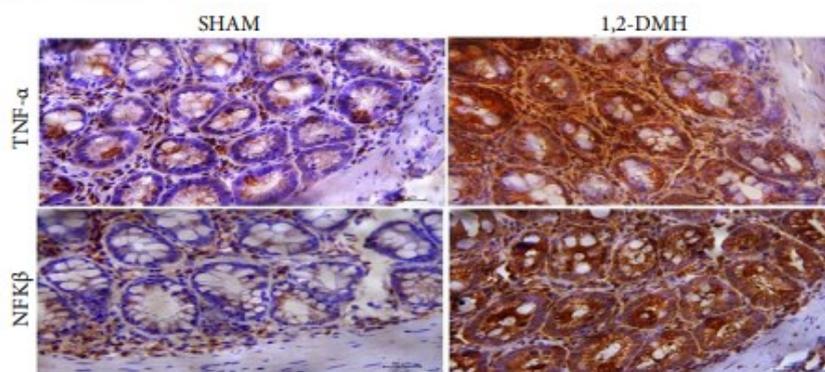
The 1,2-DMH group showed a significant increase in the number of ML compared to the sham group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3a). Figures 3b and 3c show examples of ML with distinct characteristics accounted for in the macroscopic evaluation.



Source: Elaborated by the authors. ML: macroscopic lesions.

**Figure 3** – Number and appearance of ML in the colon. (a) Graphic representation of the number of ML in the resected specimen. Data were analyzed by *t*-test with Mann-Whitney's test, where # $p < 0.05$  vs. sham. (b) ML with a polypoid appearance. (c) ML with an ulcerated appearance.

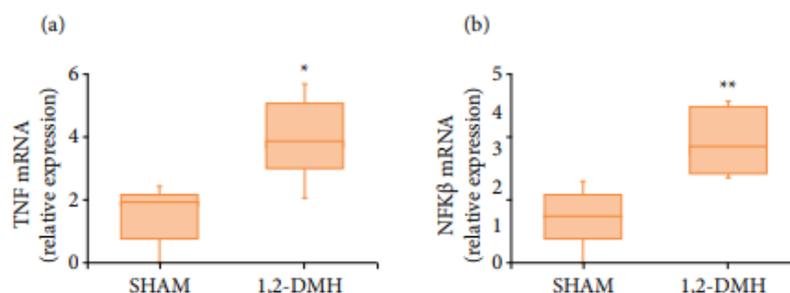
There was a statistically significant increase ( $p < 0.5$ ) in protein expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the 1,2-DMH group compared to the sham group (Fig. 4).



Source: Elaborated by the authors. TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B; MB: methylene blue; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. sham group.

**Figure 4** – Expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B proteins in the distal colon of Wistar rats. The photos are with 40 $\times$  objective magnification (50  $\mu$ m scale bar), cross section, and the staining used in the tissue was MB. Data were analyzed by *t*-test with Mann-Whitney's test.

There was a statistically significant increase ( $p < 0.5$ ) in gene expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the 1,2-DMH group compared to the sham group (Fig. 5).



Source: Elaborated by the authors. TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. sham group.

**Figure 5** – Expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B genes in the distal colon of Wistar rats. Data were analyzed by *t*-test with Mann-Whitney's test.

## Discussion

The Wistar rat can be used in the study of colorectal carcinogenesis, but it requires more prolonged exposure to the carcinogen<sup>19</sup>. Transgenic mice or rats are also widely used to study colon tumorigenesis. Transgenic mice with adenomatous polyposis coli (APC) mutation develop CRC more quickly. However, tumors developed in these models are mostly located in the small intestine instead of the colon<sup>20</sup>. Nowadays, the DMH model represents a useful research tool for the study of colonic carcinogenesis. The carcinogenic effect may be obtained after a single injection or via a series of weekly injections. The tumor incidence can be modulated by the amount of carcinogen administered and the number of applications<sup>21</sup>.

Bird was the first to identify and describe ACF in the colorectal mucosa of rodents exposed to the action of carcinogenic substances, in addition to recognizing them as an early lesion and precursor of CRC<sup>14</sup>. Subsequently, ACF was recognized and identified in humans<sup>22</sup> and has since shown its potential as a reliable biological biomarker of preneoplastic and cancerous lesions in the large intestine<sup>23</sup>. Sakai et al.<sup>8</sup> performed high magnification chromoscopic colonoscopy to identify ACF in 861 subjects undergoing a diagnostic endoscopy. The study compared the number of ACF in three subject groups (normal subjects, adenoma cases, and CRC cases). The mean number of ACF was 3.6, 6.2, and 10.1, in normal subjects, adenoma cases, and CRC cases, respectively. As expected, our study confirmed a higher number of ACFs and ML in the 1,2-DMH-induced CRC group compared to the sham rats.

Braga et al.<sup>24</sup> experimentally induced intestinal carcinogenesis, and after 16 weeks the ACF were quantified. The number of ACF was higher in the distal colon ( $43.17 \pm 16.46$ ) compared to the proximal colon ( $2.33 \pm 3.83$ ) and middle colon ( $23.83 \pm 18.00$ ). The incidence of ACF is higher in the distal segment of the colon<sup>8, 25</sup>. Our data indicated that the highest number of ACF was in the distal segment of the colon.

TNF- $\alpha$  levels are one of the most used parameters to characterize experimental models of colitis-associated CRC<sup>26</sup>. The combination of 1,2-DMH (30 mg/kg) with dextran sulfate sodium (seven days) has been used for the induction of CRC in rats, and an increase in TNF- $\alpha$  levels was highlighted in the cancer group<sup>27</sup>. Elevated serum levels of TNF- $\alpha$  show a marked relationship with the increased risk of colorectal adenomas in men<sup>28</sup>, and suppressing TNF- $\alpha$  signaling reduced the number and size of polyps in an animal model<sup>29</sup>.

The inappropriate or excessive activation of TNF- $\alpha$  signaling is associated with chronic inflammation and can eventually lead to the development of a wide variety of diseases<sup>30</sup>. However, our data showed that during CRC induction in rats with 1,2-DMH the high TNF- $\alpha$  tissue levels were markedly associated with CRC precursor lesions.

A myriad of genes regulated by NF- $\kappa$ B transcription factors has been shown to mediate inflammation, cellular transformation, tumor cell survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis<sup>31</sup>. The reason why NF- $\kappa$ B is constitutively and persistently active in cancer cells is not fully understood, but multiple mechanisms have been described. Activation of this signaling pathway can occur through a specific agent (viruses, proteins, bacteria, and cytokines), signaling intermediates (mutant receptors, kinase overexpression, mutant oncoproteins, histone deacetylase, and induced nitric oxide synthase), and crosstalk between NF- $\kappa$ B and other transcription factors (STAT3,  $\beta$ -catenin, p53)<sup>32</sup>. In mice models, the NF- $\kappa$ B pathway has been directly linked to intestinal inflammation and to the development of colitis-associated cancer<sup>33</sup>. The expression of NF- $\kappa$ B in the colonic tissue of patients with CRC, inflammatory bowel disease, and polyps was evaluated, and a higher expression of NF- $\kappa$ B was observed in patients with CRC. This finding may support the hypothesis that NF- $\kappa$ B plays an important role early in the process of colonic dysplasia development that may lead to cancer<sup>34</sup>.

One of the limitations of this study is that we could not dissect the histopathological changes seen in the ML in more depth. Thus, polypoid and tumor-like lesions were counted in the same way. Some studies have revealed significant associations between the number of ACF and the synchronous presence of advanced neoplasms, including both adenoma and CRC<sup>35,36</sup>.

The TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B influence on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway may be further explored in future studies since this pathway is considered one of the first events in the development of CRC<sup>37</sup>. In addition, other TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B-related signaling pathways controlling cell cycle and tumorigenesis may shed light better to understand the early pathophysiology of intestinal carcinogenesis induction.

## ■ Conclusion

Our results provide evidence that the TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathways are strongly involved in CRC development in rats and might be used as early biomarkers of CRC pathogenesis in experimental studies.

## ■ Authors' contribution

**Conception and design of the study:** Barreira MA, Campelo MWS, Vasconcelos PRL; **Technical procedures:** Barreira MA, Rebouças CSM; **Data collect:** Barreira MA; **Interpretation and analysis of data:** Barreira MA, Rebouças CSM; **Statistical analysis:** Rebouças CSM; **Critical revision:** Campelo MWS, Rebouças CSM, Soares APB, Vasconcelos PRL; **Manuscript preparation and writing:** Barreira MA; **Final approval:** Campelo MWS, Rebouças CSM, Soares APB, Vasconcelos PRL.

## ■ About the authors

Barreira MA is MD.

Campelo MWS, CSMRebouças, APBSoares and PRIVasconcelos are PhD.

## ■ Conflict of interest

Nothing to declare.

## ■ Data availability statement

All datasets were generated or analyzed in the current study.

## ■ Funding

Not applicable.

## ■ Acknowledgments

My thanks to the staff of the Vivarium at the Centro Universitário Christus for their support during the experimental part of the research. My thanks to the Morphology Department of the Universidade Federal do Ceará for providing the necessary structure for the analysis of the samples.

## ■ References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. ReFaey K, Tripathi S, Grewal SS, Bhargav AG, Quinones DJ, Chaichana KL, Antwi SO, Cooper LT, Meyer FB, Dronca RS, Diasio RB, Quinones-Hinojosa A. Cancer mortality rates increasing vs cardiovascular disease mortality decreasing in the world: future implications. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 2021;5(3):645–53. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2021.05.005>
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
4. Johnson RL, Fleet JC. Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):39–61. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6>
5. Machado VF, Feitosa MR, Rocha JJR, Féres O. A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. *J Coloproctol.* 2016;36(1):53–7. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6>
6. 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. <https://doi.org/10.1155/2011/473964>
7. Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2003;9(12):2642–9. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i12.2642>
8. Sakai E, Takahashi H, Kato S, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Maeda S, Yoneda M, Taguri M, Nakajima A. Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(9):1918–24. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-11-0104>
9. Pierre CC, Longo J, Mavor M, Milosavljevic SB, Chaudhary R, Gilbreath E, Yates C, Daniel JM. Kaiso overexpression promotes intestinal inflammation and potentiates intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(9):1846–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2015.06.011>
10. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2373–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.23173>
11. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014;26(3):253–66. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
12. Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm.* 2021;2(4):618–53. <https://doi.org/10.1002/mco2.104>
13. El-Khadragy MF, Nabil HM, Hassan BN, Tohamy AA, Waaer HF, Yehia HM, Alharbi AM, Moneim AEA. Bone Marrow Cell Therapy on 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Cancer in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(3):1072–83. <https://doi.org/10.1159/000487349>

14. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987;37(2):147–51. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1)
15. Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* 2000;112-113:395–402. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00261-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00261-1)
16. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577–80. <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>
17. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(5):575–84. <https://doi.org/10.1177/002215540305100503>
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
19. Burlamaqui IM, Dornelas CA, Valença Júnior JT, Mota DM, Mesquita FJ, Veras LB, Vasconcelos PR, Rodrigues LV. Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. *Acta Cir Bras.* 2012;27(1):30–6. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502012000100006>
20. Li C, Lau HC, Zhang X, Yu J. Mouse models for application in colorectal cancer: understanding the pathogenesis and relevance to the human condition. *Biomedicines.* 2022;10(7):1710. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071710>
21. Newell LE, Heddl JA. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res.* 2004;564(1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.06.005>
22. Pretlow TP, O’Riordan MA, Pretlow TG, Stellato TA. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem.* 1992;50(Suppl. 16G):55–62. <https://doi.org/10.1002/jcb.240501111>
23. Wargovich MJ, Brown VR, Morris J. Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. *Cancers (Basel).* 2010;2(3):1705–16. <https://doi.org/10.3390/cancers2031705>
24. Braga VNL, Juanes CC, Peres Júnior HS, Sousa JR, Cavalcanti BC, Jamaru FVF, Lemos TLG, Dornelas CA. Gum arabic and red propolis protecting colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. *Acta Cir Bras.* 2019;34(2):e201900207. <https://doi.org/10.1590/s0102-8650201900207>
25. Burlamaqui IM, Dornelas CA, Escalante RD, Mota DM, Mesquita FJ, Carvalho ER, Veras LB, Rodrigues LV. Optimization of visibility and quantification of aberrant crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2010;25(2):148–52. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502010000200005>
26. Modesto R, Estarreja J, Silva I, Rocha J, Pinto R, Mateus V. Chemically Induced Colitis-Associated Cancer Models in Rodents for Pharmacological Modulation: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2022;11(10):2739. <https://doi.org/10.3390/jcm11102739>
27. Guo N, Gao J. Harmol alleviates dimethylhydrazine induced colon cancer by downregulating Bcl2/IL-6/TNF- $\alpha$  expression in association with p53 mediated apoptosis. *Eur J Inflamm.* 2022;20. <https://doi.org/10.1177/1721727X221110044>
28. Kim S, Keku TO, Martin C, Galanko J, Woosley JT, Schroeder JC, Satia JA, Halabi S, Sandler RS. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2008;68(1):323–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2924>
29. Gounaris E, Tung CH, Restaino C, Maehr R, Kohler R, Joyce JA, Ploegh HL, Barrett TA, Weissleder R, Khazaie K. Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth. *PLoS One.* 2008;3(8):e2916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002916>
30. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
31. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med.* 2010;76(11):1044–63. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250111>

32. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- $\kappa$ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*. 2011;30(14):1615–30. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.566>
33. Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(4):451–64. <https://doi.org/10.2174/156800911795538066>
34. Berkovich L, Gerber M, Katzav A, Kidron D, Avital S. NF-kappa B expression in resected specimen of colonic cancer is higher compared to its expression in inflammatory bowel diseases and polyps. *Sci Rep*. 2022;12(1):16645. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21078-7>
35. 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(18):1277–84. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810293391803>
36. Rudolph RE, Dominitz JA, Lampe JW, Levy L, Qu P, Li SS, Lampe PD, Bronner MP, Potter JD. Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(3):605–8. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0058>
37. Kumar S, Agnihotri N. Piperlongumine targets NF- $\kappa$ B and its downstream signaling pathways to suppress tumor growth and metastatic potential in experimental colon cancer. *Mol Cell Biochem*. 2021;476(4):1765–81. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04044-7>

## APÊNDICE D - Dados brutos

### DADOS BRUTOS

#### A) DADOS BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DE GSH

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO	T
	Y	Y	Y	Y	Y	
1	695.0172	359.8448	601.9138	799.500000	732.2586	
2	504.1552	476.3966	690.3621	504.155200	741.5690	
3	490.1897	311.2241	550.7069	476.224100	695.0172	
4	965.0172	213.6379	560.0172	587.948300	929.8448	
5	615.8793	513.4655	480.8793	636.779300	629.8448	
6	513.4655	625.1897	471.5690	601.913800	787.9483	
7						
8						

#### B) DADOS BRUTOS DAS CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DE MDA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	3040	6080	3400	3140	3400
2	3200	5300	3480	5440	3480
3	2520	7660	5860	4980	2860
4	3320	3590	3300	3456	3300
5	4040	5740	6220	4560	1580
6	3100	4320	3880	1180	3880
7					
8					

## C) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE Ki67

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	2.520752	10.648090	2.312215	4.349490	5.724300
2	2.578654	18.254090	0.804647	2.874247	4.264832
3	1.366679	4.116313	5.362447	2.086870	2.982931
4	1.337179	7.456116	1.445048	8.104960	4.408101
5	3.337606	3.104655	1.150513	1.147461	2.616374
6	3.104655	8.136190	1.734456	4.909770	1.700846
7	3.105754	4.116313	1.936890	2.029419	4.688517
8	1.331075	8.456116	7.201131	2.315267	3.152974
9	2.450053	8.051554	6.019084	1.441956	4.688517
10	1.740906	15.086870	10.370380	1.147461	10.499570
11					

## D) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE P53

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	1.778666	12.463890	11.349490	2.312215	4.724300
2	17.632040	11.574300	18.254090	0.804647	4.264832
3	11.007690	8.762105	15.086870	5.362447	6.982931
4	11.299130	2.235413	8.104960	0.445048	4.408101
5	2.511597	3.532410	1.147461	1.150513	2.616374
6	0.467428	6.369019	4.909770	0.734456	1.700846
7	2.039591	4.512533	2.029419	0.936890	4.688517
8	5.452474	23.638920	2.315267	7.201131	3.152974
9	0.895182	22.105920	1.441956	6.019084	4.688517
10	5.835978	22.492470	1.147461	5.370380	4.499570
11					

## E) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE iNOS

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	5.183919	7.957458	1.814270	1.823934	6.386312
2	1.954651	9.492600	2.470907	1.708984	2.915446
3	1.915995	5.114746	1.966858	1.534017	0.633240
4	3.690592	4.697164	2.577209	3.905233	5.440267
5	2.166748	4.269409	2.059428	2.394104	1.453654
6	3.045654	4.228719	1.378886	1.213582	1.835632
7	2.496338	3.046163	3.716532	1.015218	6.386312
8	3.953552	2.293905	5.449931	0.792440	0.975037
9	1.689657	4.830933	5.593363	2.271525	0.637817
10	0.643921	7.301839	1.140849	1.650492	0.644430
11					

## F) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE TNF -ALPHA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	G
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO	
	Y	Y	Y	Y	Y	
1	3.449422	10.476680	3.512187	3.512187	0.452169	
2	5.671183	6.990560	1.065063	1.065063	2.696818	
3	15.226750	4.611206	3.741069	3.741069	1.108846	
4	6.322410	7.516988	2.570170	2.570170	1.442505	
5	2.140055	12.907410	1.588949	1.588949	0.542704	
6	3.501180	10.087590	1.079305	1.079305	3.878398	
7	5.236308	14.311730	2.159668	2.159668	0.390116	
8	3.886922	2.917989	1.317851	1.317851	1.290426	
9	2.345670	1.236798	4.457890	4.457890	1.554327	
10	3.886922	2.917989	1.588949	1.588949	1.442505	
11						

## G) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE NFKB

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO	
	Y	Y	Y	Y	Y	
1	3.282166	7.449341	8.181860	8.299255	2.410929	
2	5.871582	9.964498	3.820390	4.575094	1.407878	
3	5.185445	6.359355	9.716288	5.403137	1.637777	
4	4.693095	16.208500	5.638631	5.710856	6.988120	
5	4.818217	6.373596	5.775106	8.749898	5.626933	
6	4.452515	7.972209	7.287089	5.358887	6.613668	
7	2.511597	6.239827	3.307088	5.294291	3.867594	
8	0.995382	13.200380	10.866800	0.741069	2.518717	
9	0.627645	7.790120	0.693766	0.689189	4.570679	
10	0.432120	13.820390	1.564327	2.345180	2.432610	
11						

## H) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE WNT3a

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	2.743022	5.585920	9.053406	2.134196	4.189555
2	2.908325	10.683960	2.305094	3.217061	3.850810
3	4.038493	7.073466	5.000000	3.990173	4.525757
4	5.107625	12.137860	2.645874	4.357910	5.110168
5	1.189677	16.752120	6.389994	0.136312	3.569031
6	1.966858	11.513960	4.702759	4.585266	8.965556
7	4.508464	8.981323	13.239950	10.195920	8.101240
8	1.539612	12.620540	15.928650	6.284587	4.651388
9	1.588440	9.320068	5.261739	5.760193	4.034932
10	0.749715	7.233683	10.370380	1.147461	3.378805

## I) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE IL1

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	1.899211	10.476680	0.512187	0.108337	4.521179
2	3.128052	6.990560	3.608195	0.991821	3.748576
3	6.071472	4.611206	2.775574	1.259867	2.957153
4	4.658508	7.516988	4.130554	0.434367	2.477010
5	6.105550	12.907410	1.588949	1.207987	0.542704
6	6.975301	10.087590	1.079305	0.578817	0.964864
7	3.201803	14.311730	1.159668	1.044210	3.441874
8	3.886922	2.917989	1.317851	0.323486	1.868062
9	5.185445	6.359355	9.716288	5.403137	1.637777
10	3.953552	2.293905	0.792440	5.449931	5.145772
11					

## J) DADOS DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DE B-CATENINA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
	SHAM	Data Set-B	PS	PRO	PS+PRO
	Y	Y	Y	Y	Y
1	2.743022	13.585920	4.189555	2.134196	4.053406
2	2.908325	16.683960	9.850810	3.217061	5.305094
3	4.038493	7.073466	11.525800	3.990173	2.377828
4	5.107625	12.137860	5.110168	4.357910	4.645874
5	1.189677	16.752120	15.928650	6.136312	3.389994
6	3.966858	19.513960	8.965556	4.585266	4.702759
7	4.508464	8.981323	12.101240	10.195920	3.239950
8	2.539612	12.620540	4.651388	6.284587	3.569031
9	1.588440	9.320068	4.034932	5.760193	5.261739
10	2.749715	7.233683	3.378805	1.147461	7.370380
11					

## K) DADOS DO NÚMERO DE FCAs

Intestino Distal						
Animal	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO	
1	1,15	3,5	2	0,5	3	
2	1,2	3,5	2,5	5	1	
3	0,3	5	2	3,33	3	
4	2	3	5	2,5	4	
5	2,7	6	1	1	2	
6	0,5	6	3	2	5	
Intestino Médio						
1	0	1,4	0,25	0,7	1	
2	0	1,6	1	0,25	0	
3	0	2,1	1,25	0	0	
4	0	2,8	1	0	0,5	
5	1	3	0	1,43	0	
6	0	1,4	2,75	0	0,5	
Intestino proximal						
1	0,1	0,84	0,16	1	1	
2	0	0,5	0,5	2	0,5	
3	0	2	0	0,5	0	
4	0	3	2	0,16	0	
5	0	2	0,5	0	0,5	
6	0	1,5	1	0,5	1	

## L) DADOS DO SCORE INFLAMATÓRIO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	S
1	SCORE HE INTESTINO DISTAL (A+B)	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO	SCORE HE INTESTINO MEDIO (C+D)	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO	S
2		1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0
3		2	0	2	1	1	1	2	0	1	0	1	0
4		3	0	2	1	1	1	3	0	1	1	1	0
5		4	0	2	1	1	1	4	0	2	1	1	0
6		5	0	3	2	1	1	5	0	2	1	1	1
7		6	0	3	2	1	2	6	0	2	2	1	1
8		7	0	3	2	1	2	7	0	2	2	1	1
9		8	0	3	2	1	2	8	0	2	2	1	1
10		9	0	3	2	2	2	9	0	2	2	1	1
11		10	1	3	3	2	2	10	0	2	2	1	2
12		11	1	3	3	2	2	11	1	3	2	2	2
13		12	1	3	3	2	2	12	1	3	2	2	2
14	SCORE HE INTESTINO PROXIMAL (E + F/G)	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO							
15		1	0	1	1	1							
16		2	0	2	1	1							
17		3	0	2	1	2							
18		4	1	2	1	2							
19		5	1	2	1	2							
20		6	1	3	2	2							
21		7	1	3	2	2							
22		8	1	3	2	2							
23		9	1	3	2	2							
24		10	1	3	2	2							
25		11		3	2	3							
26		12			3								

## M) DADOS DO NÚMERO DE TUMORES MACROSCÓPICOS

5							
7	Tumores (numero)	SHAM	1,2-DMH	1,2-DMH + PS	1,2-DMH + PRO	1,2-DMH + PS + PRO	F
3	RATO						F
3		1	0	0	0	0	0
0		2	0	0	0	0	0
1		3	0	0	0	0	0
2		4	0	0	0	0	0
3		5	0	1	1	0	0
4		6	0	1	1	1	0
5		7	0	2	1	1	1
5		8	0	2	1	1	1
7		9	0	2	2	1	1
3		10	0	2	2	1	1
3		11	0	2	2	2	2
0		12	0	2	2	2	2
1		13		2		2	