

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE

LUANE APARECIDA DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO  
EM FIBRAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL EM  
MODELO PRÉ-CLÍNICO**

CAMPO GRANDE  
2022

LUANE APARECIDA DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO  
EM FIBRAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL EM  
MODELO PRÉ-CLÍNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Elisvânia Freitas dos Santos.

Campo Grande  
2022



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**  
**Doutorado**

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas e trinta minutos, na videoconferência (à distância), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Dalton Luiz Schiessel (UNICENTRO), Daniele Gonçalves Vieira (UNICENTRO), Karine de Cassia Freitas Gielow (UFMS) e Karla Rejane de Andrade Porto (FACSUL), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LUANE APARECIDA DO AMARAL**, CPF 09702729955, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO EM FIBRAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

<b>EXAMINADOR</b>	<b>ASSINATURA</b>	<b>AVALIAÇÃO</b>
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno)		Aprovada
Dr. Dalton Luiz Schiessel (Externo)		Aprovada
Dra. Daniele Gonçalves Vieira (Externo)		Aprovada
Dra. Fabiane La Flor Ziegler Sanches (Externo) (Suplente)		
Dra. Karine de Cassia Freitas Gielow (Interno)		APROVADA
Dra. Karla Rejane de Andrade Porto (Externo)		Aprovada
Dr. Valter Aragao do Nascimento (Interno) (Suplente)		

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação  Aprovação com revisão  Reprovação

**OBSERVAÇÕES:**

---

---

---

---

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

A Deus e aos meus pais, Pedro e Eva, pois sempre me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos desta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira**

Por ser essencial para o desenvolvimento desta pesquisa. Pela confiança depositada, conselhos e por proporcionar o espaço e todos os recursos para a realização dos trabalhos nos CeTroGen e BIOCAPRI. Em todos os momentos do doutorado eu pude contar com seu auxílio e apoio, obrigada por me ensinar tanto!

### **A minha coorientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elisvânia Freitas dos Santos**

Por acreditar em mim e me apoiar mais uma vez. Obrigada por toda a confiança depositada, conselhos e ensinamentos.

### **Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**

Por terem proporcionado espaço para meu desenvolvimento pessoal e pela confiança depositada.

### **Aos professores Ms. Felipe Francisco Bittencourt Junior, Dr. Antonio Carlos Duenhas Monreal, Dr<sup>a</sup> Bruna Paola Murino Rafacho, Dr<sup>a</sup> Cândida Aparecida Leite Kassuya e Dr<sup>a</sup> Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva**

Pela confiança depositada, conselhos e por proporcionarem espaço e todos os recursos para a realização desta pesquisa.

### **Aos amigos Gabriel e Tainá**

Por toda a ajuda durante o experimento e análises, independente do horário, e acima de tudo pela amizade que vou levar para minha vida toda.

### **Ao Dr. Adrivanio Baranoski**

Por toda a ajuda no laboratório e nas análises.

### **À CAPES e à FUNDECT**

Pela bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo  
para todo o propósito debaixo do céu.  
(Eclesiastes 3:1)

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) ocupa o terceiro lugar em incidência e segundo em mortalidade entre todos os cânceres do mundo, em ambos os sexos, tornando-se um grave problema de saúde pública. Estudos demonstraram que as fibras alimentares desencadeiam respostas benéficas no organismo, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e podem prevenir e reduzir processos inflamatórios no intestino. Dentre as fibras, destacam-se as fibras da linhaça marrom, da chia, da farinha de banana verde, da aveia e da quinoa. Além das fibras, a proteína texturizada de soja também pode auxiliar no aumento da produção de AGCC. Desta forma, o objetivo deste estudo foi formular um Produto Alimentício Natural Rico em Fibras (PANRiF) com linhaça marrom, chia, farinha de banana verde, aveia, quinoa e proteína texturizada de soja e avaliar efeitos na prevenção e tratamento do câncer colorretal em modelo pré-clínico. Após a formulação do PANRiF foram realizadas as análises químicas para avaliar o teor nutricional. Foram utilizados 78 ratos Wistar machos distribuídos em seis grupos experimentais: controle negativo (ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA), controle positivo (1,2-dimetilhidrazina DMH - 40 mg/Kg) e quatro grupos alimentados com 10% PANRiF + 1,2-dimetilhidrazina DMH- 40 mg/Kg: protocolo de pré-tratamento, tratamento simultâneo e protocolo pós-tratamento. Após 24h da última administração de EDTA ou DMH foram coletadas amostras de sangue dos animais para realização dos ensaios do cometa e micronúcleo. Antes da eutanásia foi realizada a coleta de sangue para as análises hematológicas, bioquímicas e de citocinas. Após a eutanásia, o intestino grosso dos animais foi coletado para análise de criptas aberrantes. Os dados de distribuição paramétrica foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste Tukey e não paramétrico Kruskal–Wallis seguida do teste Dunn. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . Como resultados o PANRiF mostrou ser uma boa fonte de fibras e não alterou parâmetros biométricos, bioquímicos, hematológicos, inflamatórios e não induziu sinais de toxicidade e genotoxicidade/carcinogenicidade. O PANRiF também exibiu efeito quimiopreventivo, em todos os protocolos, com redução de danos (% RD) de 75% no teste do cometa. Além disso, o PANRiF reduziu a incidência de focos de criptas aberrantes em 49,36% no protocolo pós-tratamento. Portanto, os resultados sugerem a aplicabilidade do PANRiF na dieta humana devido aos benefícios, possibilidade de produção em escala industrial e fácil aplicação tecnológica em diferentes produtos, uma vez que pode ser incorporado em alimentos sem alterar ou causar pequenas alterações nas características sensoriais do produto final.

Descritores: focos de criptas aberrantes; quimioprevenção; alimentos funcionais; fibras alimentares.

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) ranks third in incidence and second in mortality among all cancers in the world, in both sexes, making it a serious public health problem. Studies have shown that dietary fiber triggers beneficial responses in the body, such as the production of short-chain fatty acids (SCFA) and can prevent and reduce inflammatory processes in the gut. Among the fibers, the fibers of brown flaxseed, chia, green banana flour, oat and quinoa stand out. In addition to fiber, textured soy protein can also help increase SCFA production. Thus, the objective of this study was to formulate a Natural Food Product Rich in Fibers (NFRFP) with brown flaxseed, chia, green banana flour, oats, quinoa and textured soy protein and to evaluate the effects on the prevention and treatment of colorectal cancer in a model preclinical. After the formulation of the NFRFP, chemical analyzes were performed to assess the nutritional content. Seventy-eight male Wistar rats were divided into six experimental groups: negative control (ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA), positive control (1,2-dimethylhydrazine DMH - 40 mg/Kg) and four groups fed 10% NFRFP + 1, 2-dimethylhydrazine DMH- 40 mg/Kg: pre-treatment protocol, simultaneous treatment and post-treatment protocol. After 24 hours of administration of EDTA or DMH, blood samples were collected from the animals to perform the comet and micronucleus assays. Before euthanasia, blood was collected for hematological, biochemical and cytokine analyses. After euthanasia, the large intestine of the animals was collected for analysis of aberrant crypts. Parametric distribution data were analyzed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey test and non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn test. The significance level adopted was  $p < 0.05$ . As a result, NFRFP proved to be a good source of fiber and did not change biometric, biochemical, hematological, inflammatory parameters and did not induce signs of toxicity and genotoxicity/carcinogenicity. PANR if also exhibited a chemopreventive effect, in all protocols, with damage reduction (% RD) of 75% in the comet test. Furthermore, the NFRFP it reduced the incidence of aberrant crypt foci by 49.36% in the post-treatment protocol. Therefore, the results suggest the applicability of NFRFP in the human diet due to the benefits, possibility of production on an industrial scale and easy technological application in different products, since it can be incorporated into foods without altering or causing small changes in the sensory characteristics of the final product.

Descriptors: aberrant crypt foci; chemoprevention; functional food; dietary fiber.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Microscopia do colón de ratos.....	15
Figura 2 – Fases do desenvolvimento do câncer colorretal .....	15
Figura 3 – Delineamento experimental.....	25

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Tipos de indução esporádica do câncer colorretal (CCR).....	17
Tabela 2 – Composição química de componentes do Produto Alimentício Natural Rico em Fibras (PANRiF) em g / 100 g.....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: alanina aminotransferase

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

AOCS: *American Oil Chemists' Society*

AST: aspartato aminotransferase

CCR: câncer colorretal

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

DNA: ácido desoxirribonucleico

FA: fibra alimentar

FCA: focos de criptas aberrantes

i.p: via intraperitoneal

PANRiF/ NFRFP: Produto Alimentício Natural Rico em Fibras

p.c: peso corpóreo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 CÂNCER COLORRETAL (CCR) .....	14
2.2 MODELOS ANIMAIS DE CCR.....	16
2.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CCR.....	18
2.4 FIBRAS .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 AGENTE QUÍMICO .....	23
4.2 PREPARO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO EM FIBRAS .....	23
4.3 ANIMAIS E CONDIÇÕES AMBIENTAIS .....	23
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA RAÇÃO E DO PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO EM FIBRAS .....	25
4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	26
4.6.1 Ensaio do cometa .....	26
4.6.2 Ensaio de micronúcleo em sangue periférico .....	27
4.6.3 Ensaio de focos de criptas aberrantes.....	27
4.6.4 Cálculo da porcentagem de redução de danos (% DR).....	27
4.6.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos .....	28
4.6.6 Quantificação da expressão de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 e TNF- $\alpha$ .....	28
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXO A – Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA)</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As modificações ocorridas na estrutura da sociedade no século XX, por meio da rápida transição demográfica, epidemiológica e nutricional, apresentaram consequências sob o padrão de saúde da população. Essas mudanças acarretaram a redução de doenças infectocontagiosas e o aumento na expectativa de vida bem como de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (MCCRACKEN; PHILLIPS, 2017). Entre as DCNTs, destaca-se o câncer, com estimativa de 30,2 milhões de novos casos até 2040, pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comum e segundo em mortalidade entre todos os cânceres do mundo, em ambos os sexos, tornando-se um grave problema de saúde pública (BRAY et al., 2018). No Brasil, o CCR foi o segundo tipo de câncer que mais atingiu a população brasileira em 2020 (INCA, 2021a) e aproximadamente, 40 mil novos casos deste tipo de neoplasia são diagnosticados por ano, entre homens e mulheres, destes, 30% poderia ser evitado por meio de hábitos mais saudáveis (INCA, 2021b).

O CCR abrange tumores que acometem o cólon intestinal e o reto, sendo que a etiologia desse tipo de carcinoma inclui a interação entre fatores endógenos, como a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade avançada, além de fatores ambientais, como a dieta (INCA, 2021c).

Os componentes da dieta podem alterar a microbiota intestinal, que por sua vez interfere diretamente na homeostase intestinal. Assim, a composição da dieta tem papel fundamental na iniciação, progressão e prevenção do CCR desencadeando respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro (PARK et al., 2017; ALMEIDA, DE et al., 2019). Nesse sentido, estudos têm mostrado que alguns alimentos funcionais, como as fibras, desencadeiam respostas benéficas e podem prevenir e reduzir processos inflamatórios no intestino (HAENEN et al., 2013; PESARINI et al., 2013; NAVARRO et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2019; HULLINGS et al., 2020).

As fibras alimentares são componentes não digeríveis pelo organismo humano que contribuem para o aumento do bolo fecal, aceleração da passagem de produtos residuais, adsorção do conteúdo carcinogênico do cólon, redução da colonização do intestino por bactérias responsáveis pela metabolização e/ou liberação de pró-carcinógenos e carcinógenos, redução da adiposidade e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por meio da fermentação bacteriana (LATTIMER; HAUB, 2010; DHINGRA et al., 2012; PESARINI et al., 2013; SONG et al., 2015; DAI; CHAU, 2017). Por sua vez, os AGCC melhoram a saúde intestinal por meio de vários efeitos locais, que vão desde a manutenção da integridade da barreira intestinal,

produção de muco e proteção contra inflamação até a redução do risco de câncer colorretal (O'KEEFE, 2016; SILVA et al., 2020).

Dentre as fibras que possuem essa capacidade destacam-se as fibras da linhaça marrom (PAMPLONA-SILVA et al., 2018), da chia (TAMARGO et al., 2018), da farinha de banana verde (HAENEN et al., 2013; NAVARRO et al., 2015), da aveia (LIU et al., 2015) e da quinoa (Liu et al., 2018) que possuem quantidades consideráveis de  $\beta$ -glucana, amido resistente, mucilagens, ligninas, pectinas, hemicelulose e celulose ((RAMOS et al., 2010; REBELLO et al., 2016; SANG; CHU, 2017; LIU et al., 2018; SHAFIE et al., 2019). Além das fibras, as proteínas também tem ação positiva sobre o intestino, como é o caso da proteína texturizada de soja que apesar de não possuir grandes quantidades de fibras alimentares, esse alimento parece aumentar a produção de ácidos orgânicos no intestino grosso e conseqüentemente os AGCC, prevenindo o CCR (AN et al., 2014).

Considerando que o CCR é um grave problema de saúde pública com alta incidência (INCA, 2021a; WHO, 2021), é de extrema importância a formulação de novos produtos funcionais com ingredientes variáveis que forneçam diferentes tipos de fibras que possam ser usados na prevenção ou como coadjuvantes de tratamentos desse tipo de neoplasia. À vista disso, a presente pesquisa teve por objetivo formular um Produto Alimentício Natural Rico em Fibras (PANRiF) e avaliar os efeitos na prevenção e tratamento do câncer colorretal em modelo pré clínico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER COLORRETAL (CCR)

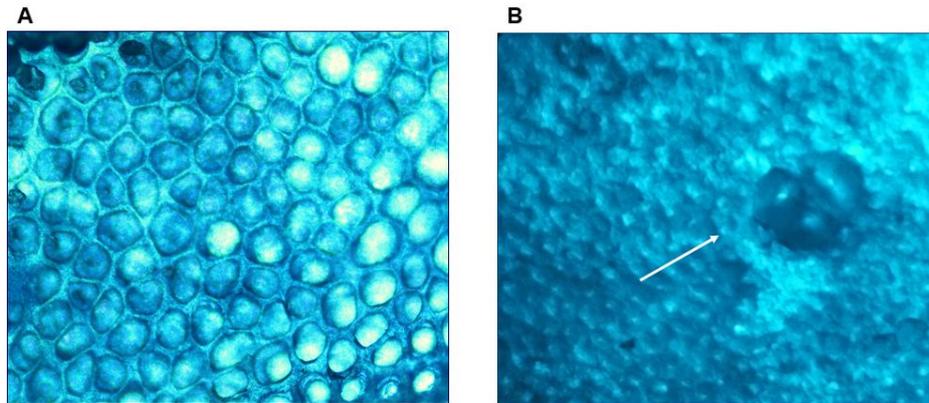
O CCR é um tipo de neoplasia muito agressiva, com alto potencial de propagação para outros órgãos, além de ser uma doença que afeta grande parte da população mundial. Estima-se que em 2020 a incidência de novos casos de CCR foi de 1.931,590 pessoas no mundo (BRAY et al., 2018). No Brasil, ele ocupa o segundo lugar em câncer mais incidente, com estimativa de 40.990 novos casos e 20.578 mortes em 2020 (INCA, 2021c).

A alta incidência do CCR está associada com os fatores de risco como pré disposição genética, inflamação intestinal crônica, mutagênicos ambientais, patógenos intestinais (TERZIC et al., 2010) e alimentação (THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Cerca de 90-95% dos casos desenvolvem-se devido a fatores ambientais e estilo de vida (ANAND et al., 2008; LI et al., 2015).

Em termos gerais, o câncer é definido como um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, cuja origem se dá por condições multifatoriais (INCA, 2020). Esse crescimento desordenado ocorre por meio de uma mutação genética no DNA da célula, que passa a receber instruções equivocadas e começam a dividir-se de forma contínua, gerando grandes massas de células, que denominam-se tumores. O processo de carcinogênese possuem fases que podem ser definidas como: iniciação, promoção, progressão e manifestação (INCA, 2021d).

O desenvolvimento do câncer no colón e reto inicia-se com a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), que são aglomerados de glândulas anormais resultante da transformação de uma célula intestinal normal em célula pré-neoplásica (BIRD, 1987). Os FCA são distintamente diferentes da criptas normais e podem ser identificados por microscopia (Figura 1), são encontradas principalmente na porção distal do cólon e possui alto grau de instabilidade genômica, cromossômica e morfológica (BIRD, 1987).

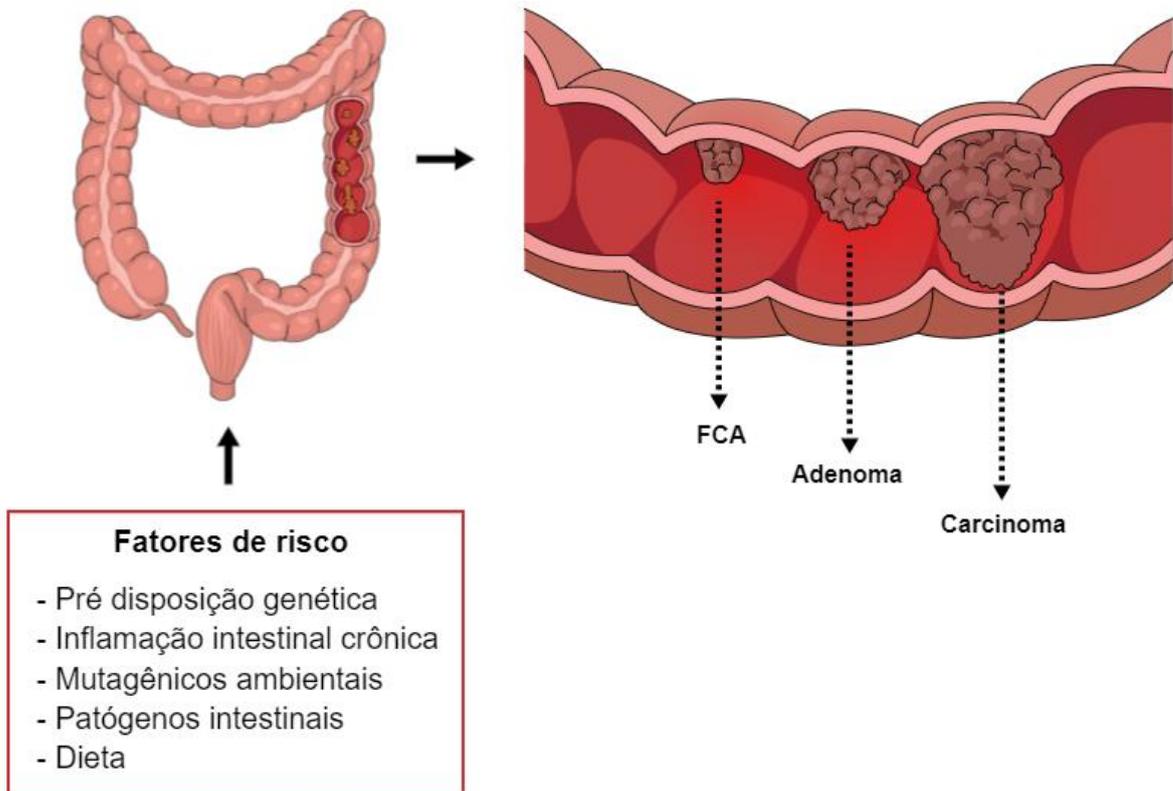
Figura 1 – Microscopia do colón de ratos



(A) Criptas normais (10 ×); (B) Foco de criptas aberrantes no cólon (10 ×) Corado com azul de metileno. Fonte: Autor, 2022.

Caso haja a continuidade do estímulo genético ou ambiental os FCA podem se tornar adenomas e desenvolver lesões pré-malignas não invasivas, caracterizando as fases de promoção e progressão. Essas lesões, a depender das alterações do microambiente, podem evoluir para um carcinoma de células epiteliais, chegando a fase de manifestação da carcinogênese (TERZIC et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Fases do desenvolvimento do câncer colorretal



FCA – focos de criptas aberrantes. Fonte: Autor, 2022.

A inflamação intestinal crônica é um dos principais riscos do CCR, indivíduos que apresentam colite ulcerativa e doença de Crohn, têm maior risco de desenvolver CCR em comparação com a população geral (JESS et al., 2012). Haslam et al. (2017) mostraram em seu estudo uma associação entre um maior índice inflamatório dietético, desenvolvido para avaliar o potencial inflamatório da dieta de um indivíduo, e um aumento da prevalência de adenomas colorretais, reforçando que a inflamação seja ela derivada de uma doença prévia ou de má alimentação contribui para a formação do CCR.

Na fase de progressão do CCR é possível observar que a inflamação intestinal continua e os fatores que impulsionam essa resposta são complexos e, portanto, não claros, mas estão relacionados à interação entre as células neoplásicas e o microambiente tumoral circundante, envolvendo células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasculatura. Enquanto as células tumorais podem expressar variavelmente diferentes citocinas e quimiocinas, células imunes e fibroblastos são capazes de produzir muitos desses fatores em níveis muito mais altos (FUKUYAMA et al., 2007; TAO et al., 2017; GUERRIERO, 2018)

## 2.2 MODELOS ANIMAIS DE CCR

Como o CCR é causado principalmente por fatores ambientais e estilo de vida (ANAND et al., 2008; LI et al., 2015) vários estudos tem surgido a fim de buscar alternativas de prevenção e tratamento dos tumores de cólon e reto (NAVARRO et al., 2015; LIMEIRAS; OLIVEIRA; et al., 2017; LIMEIRAS; OGO; et al., 2017; MOURA, DE et al., 2019; LI et al., 2019; CHIU et al., 2020). Para alcançar os objetivos dos estudos e mimetizar todas as fases do CCR que ocorre em humanos, tem sido utilizados modelos experimentais com roedores.

Os modelos experimentais buscam reproduzir uma situação carcinogênica em humanos, dessa forma os modelos para CCR são divididos em hereditários e esporádicos. A forma hereditária está relacionada com síndromes familiares e a esporádica com processos inflamatórios intestinais, ambiente e estilo de vida. A escolha é realizada de acordo com a finalidade do estudo (DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018). A Tabela 1 mostra os principais tipo de indução do CCR esporádico.

Tabela 1 – Tipos de indução esporádica do câncer colorretal (CCR)

<b>Indução</b>	<b>Tipo</b>	<b>Descrição do método</b>
Dietética	Dieta hiperlipídica	Utiliza uma dieta hiperlipídica para promover a obesidade e a longo prazo a indução da carcinogênese no intestino delgado, ceco e cólon proximal, esse modelo é pouco utilizado devido a poucos animais desenvolverem o CCR e longo período de experimentação.
Química	1,2 Dimetilhidrazina (DMH)	Utiliza o agente químico DMH para a indução de adenomas e adenocarcinomas, com capacidade de induzir metástases. Esse agente é um indutor indireto, apresenta alto grau de especificidade para o intestino e promove a toxicidade hepática.
	Azoximetano (AOM)	Utiliza o agente químico AOM para indução de adenomas e adenocarcinomas. Este agente é um indutor direto, apresenta alto grau de especificidade para o intestino e promove a toxicidade hepática, porém o custo é maior que o DMH.
Geneticamente modificado	P53	Utiliza animais com mutação no gene P53, a alteração nesse gene potencializa a ação de outros genes ou indutores de tumor. Necessita de outro método associado para induzir a carcinogênese colorretal.
	K-ras	Utiliza animais com mutação no gene K-ras, a mutação nesse gene promove hiperplasia e surgimento de FCA. Neste modelo os animais não desenvolvem tumores, sendo necessário a associação de outro tipo de indução.

Fonte: adaptado de De-Souza e Costa-Casagrande (2018).

O principal método utilizado na literatura é a indução química, principalmente utilizando o agente DMH (ROSENBERG et al., 2009; NAVARRO et al., 2015; MACHADO et al., 2016; LIMEIRAS; OLIVEIRA; et al., 2017; LIMEIRAS; OGO; et al., 2017; MOURA, DE et al., 2019; LI et al., 2019; CHIU et al., 2020). O DMH e seu precursor metabólico o

metilazoximetanol são procarcinógenos que requerem ativação metabólica para formar produtos reativos ao DNA. O efeito carcinogênico do DMH ocorre após uma única injeção ou por meio de uma série de injeções semanais nos animais, a manifestação da lesão maligna pode ser encontrada 4-30 semanas após a administração (MACHADO et al., 2016).

### 2.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CCR

O CCR tem sido alvo de vários estudos na busca da prevenção e novos tratamentos, nesse sentido como estratégia mais barata e eficaz em direção ao objetivo de redução da mortalidade por este tipo de neoplasia, a quimioprevenção tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica e do público em geral (UMEZAWA et al., 2019).

A quimioprevenção é estabelecida como a ingestão de substâncias sintéticas ou naturais para conter a indução, prevenir ou retardar a progressão do câncer, ou reverter a carcinogênese em um estágio pré-maligno (SPORN; SUH, 2002). Como o CCR apresenta um longo estágio de iniciação a quimioprevenção tem sido estudada como oportunidade de interferir antes que os adenomas se transformem em câncer (LI et al., 2015). No entanto, encontrar uma substância de quimioprevenção eficaz para o CCR não é uma tarefa fácil, apenas um pequeno número de agentes de quimioprevenção do câncer foi aprovado pela Food and Drug Administration (RABADI, AL; BERGAN, 2017).

Há alguns requisitos importantes devem ser considerados ao avaliar potenciais agentes quimiopreventivos, pois, essa substância será administrada por longo período de tempo. Assim os agentes quimiopreventivos devem apresentar baixa toxicidade, poucos ou nenhum efeito colateral, ser de fácil administração e baixo custo (UMEZAWA et al., 2019). Dessa forma, os compostos bioativos derivados da dieta são candidatos potenciais para esse propósito.

É amplamente aceito que uma dieta rica em frutas, vegetais, especiarias e cereais possui efeitos benéficos no intestino, particularmente no cólon (TAN et al., 2014; LI et al., 2015; KATONA; WEISS, 2020). As fibras presentes nesses alimentos são capazes de contribuir na prevenção do CCR pois aceleram o trânsito intestinal, reduzem a adsorção de xenobióticos e produção de AGCC, como acetato, propionato e butirato, que são formados após a fermentação das fibras pela microbiota intestinal ao longo do trato do cólon (TAN et al., 2014; WU et al., 2018).

## 2.4 FIBRAS

A fibra alimentar (FA) pode ser definida pelo *Codex Alimentarius* como “polímeros de carboidratos com dez ou mais unidades monoméricas, que não são hidrolisados pelas enzimas endógenas no intestino delgado dos humanos” (ZIELINSKI et al., 2013). O *Codex Alimentarius* ainda indica que pelas diversas discussões sobre a inclusão de carboidratos de 3-9 graus de polimerização como FA a decisão de incluí-las ou não deve ser tomada pelas autoridades de cada país. Essa discordância não advém da reconhecida indegistibilidade, mas por não se verificarem os efeitos característicos de FA (MENEZES, et al., 2013).

Dessa forma, a FA consiste num grupo extremamente heterogêneo de compostos. Todos os constituintes, à exceção da lenhina, são polissacarídeos pertencentes ao grupo dos glúcidos como pectinas, mucilagens, hemiceluloses, gomas, celulose e em alguns casos também os oligossacarídeos, amido resistente e polissacarídeos não vegetais são contemplados na definição de FA (LUNN; BUTTRISS, 2007; GIBNEY et al., 2009).

A FA pode ser classificada em dois grupos: a) as fibras insolúveis que não são solúveis em água, portanto não formam géis, e sua fermentação é limitada, elas contribuem para o aumento do volume fecal, reduzindo o tempo de trânsito intestinal, a absorção de glicose e retardo da hidrólise do amido, neste grupo estão a lignina, celulose e algumas hemiceluloses; b) as fibras solúveis que dissolvem-se em água, formando géis viscosos, não são digeridas no intestino delgado e são facilmente fermentadas pela microflora do intestino grosso, elas aumentam a viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a atividade de certas enzimas digestivas, influenciando diretamente na taxa de digestão e absorção de nutrientes, fazem parte deste grupo as pectinas, as glucanas, as gomas, as mucilagens e algumas hemiceluloses. A maioria dos alimentos que contêm fibras é constituída de um terço de fibras solúveis e dois terços de insolúveis (WONG; JENKINS, 2007; MIRA et al., 2009).

Sabe-se que o consumo da FA está relacionado com a redução do risco de CCR (BRADBURY et al., 2014; LUO et al., 2015; GIANFREDI et al., 2018), esse efeito protetor é derivado da produção de AGCC a partir da fermentação das fibras pela microbiota intestinal (WU et al., 2018).

Dentre os AGCC, o butirato destaca-se quanto à sua eficácia protetora contra o CRC, seu efeito inibitório contra a proliferação de células de câncer de cólon humano foi mostrado superior em comparação com acetato e propionato (ZENG et al., 2020).

O butirato pode exercer seu papel antiproliferativo por diversos mecanismos, o primeiro deles é a redução da expressão de neuropilina-1, um receptor do fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF) que regula a angiogênese, a regulação negativa exerce um efeito inibitório na expansão das células cancerígenas do cólon (YU et al., 2011). Além disso, o butirato induz apoptose e suprime a proliferação e invasão e também promove a redução da motilidade de células cancerosas, impedindo o potencial metastático do CCR (HU et al., 2015; HAN et al., 2016; LI et al., 2017).

Diferente do que se espera, o butirato atua de forma distintas nos colonócitos normais em comparação com aqueles cancerosos, essa situação foi denominada “paradoxo do butirato” onde esse AGCC estimula o crescimento celular de colonócitos saudáveis e em contrapartida exerce um efeito antiproliferativo em colonócitos cancerosos, enfatizando as vantagens da ingestão de fibra alimentar (DONOHOE et al., 2012; KAIKO et al., 2016; HAN et al., 2016).

Conforme discutido acima, o efeito protetor da FA pode ser amplamente atribuído à produção de butirato. Dessa forma, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um Produto Alimentício Natural Rico em Fibras (PANRiF) que apresenta potencial para ser um bom quimiopreventivo. Os constituintes do PANRiF foram escolhidos de acordo com estudos já realizados em modelo de câncer colorretal, dessa forma, buscamos formular um produto que apresenta-se alto teor de fibras e proteínas. O PANRiF é constituído pelos seguintes alimentos: linhaça marrom (PAMPLONA-SILVA et al., 2018), chia (TAMARGO et al., 2018), farinha de banana verde (HAENEN et al., 2013; NAVARRO et al., 2015), aveia (LIU et al., 2015), quinoa (LIU et al., 2018) e proteína de soja texturizada.

O componentes do PANRiF possuem diferentes fibras, como a aveia que possui quantidades consideráveis de  $\beta$ -glucana, a farinha da banana verde amido resistente, a chia as mucilagens, a linhaça as ligninas, e a quinoa pectinas, hemicelulose e celulose (RAMOS et al., 2010; REBELLO et al., 2016; SANG; CHU, 2017; LIU et al., 2018; SHAFIE et al., 2019). Este produto contém uma mistura de fibras insolúveis e solúveis, o que pode estar relacionado com a produção de AGCC e conseqüentemente com maior proteção contra o CCR.

Um estudo recente mostrou que a dieta com fibra insolúvel aumentou a concentração de acetato, enquanto a dieta com fibra solúvel aumentou a concentração de AGCC totais (acetato, propionato e butirato) (CHEN et al., 2019), assim acredita-se que a escolha destes ingredientes abrange as características de um produto promissor.

Como fonte de proteínas, o produto possui como ingrediente a proteína texturizada de soja que recentemente demonstrou aumento da produção de ácidos orgânicos no intestino grosso em um estudo com ratos (AN et al., 2014), os autores atribuem o aumento desses ácidos ao longo tempo de trânsito intestinal que eleva os níveis de degradação de proteínas e fermentação de aminoácidos, contribuindo para o aumento de AGCC em comparação com

outras fontes proteicas como a caseína. A tabela 2 representa a composição química dos componentes do PANRiF.

Tabela 2 – Composição química de componentes do Produto Alimentício Natural Rico em Fibras (PANRiF) em g / 100 g

<b>Alimento</b>	<b>Umidade</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lipídios</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Fibras</b>	<b>Calorias</b>
					<b>Totais</b>		
Linhaça	6,68	3,67	14,10	32,30	43,30	33,50	386,30
Chia	5,80	4,80	16,50	30,70	42,10	34,40	373,10
Amido resistente*	3,30	2,59	4,50	0,68	87,92	1,01	371,76
Aveia	9,80	1,30	14,90	7,00	67,00	10,3	349,40
Quinoa	13,30	2,37	14,10	6,07	64,2	7,00	339,83
Proteína texturizada de soja **	73,1	-	52,4	1,24	30,51	-	342,80

Amido resistente\* (farinha da banana verde): Fonte: BORGES; PEREIRA; LUCENA (2009).  
 Proteína texturizada de soja \*\* – Fonte: PHILIPPI, 2015.  
 Demais ingredientes: Fonte: USP, 2019.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos de um Produto Alimentício Natural Rico em Fibras na prevenção e tratamento do câncer colorretal em modelo pré clínico.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Formular o Produto Alimentício Natural Rico em Fibras.

Avaliar a composição química do Produto Alimentício Natural Rico em Fibras e da ração oferecido em diferentes momentos aos animais do ensaio pré-clínico;

Avaliar a atividade (anti)genotóxica, (anti)mutagênica e (anti)carcinogênica do Produto Alimentício Natural Rico em Fibras em modelo pré-clínico;

Avaliar a ação do Produto Alimentício Natural Rico em Fibras sobre o perfil hematológico, bioquímico e inflamatório em modelo pré-clínico

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AGENTE QUÍMICO

Para a indução dos FCA foi usado o agente químico DMH (marca Sigma®, USA, CAS Nº 306-37-6), na dose de 40 mg/Kg de peso corpóreo (p.c.), diluído em solução aquosa de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - 0,37 mg/mL, com correção de pH para 6,5 por meio da adição de NaOH 0,1 N (PARK et al., 1997), por via intraperitoneal (i.p.), com modificação de Limeiras et al. (2017), Navarro et al. (2015), Pamplona-Silva et al. (2018) e Pesarini et al. (2013). Foram administradas duas doses por semana durante duas semanas (CAETANO et al., 2018; MOURA, DE et al., 2018, 2019; RAMOS CAETANO et al., 2020).

### 4.2 PREPARO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO EM FIBRAS

O PANRiF trata-se de uma mistura de linhaça marrom (Natubom®; Lote 2502), chia (Natubom®; Lote 1902), farinha de banana verde (Natubom®; Lote 0701), aveia (Natubom®; Lote 1412), quinoa (Natubom®; Lote 0101) e proteína texturizada de soja (Natubom®; Lote 702), adquiridos comercialmente na cidade de Campo Grande, MS, Brasil. Todos os ingredientes foram triturados e misturados na mesma proporção. Em seguida, PANRiF foi acrescentado à ração comercial (Nuvilab®), triturada, na proporção de 10%. Após homogeneizada, a ração modificada foi umedecida com água filtrada, peletizada e seca em estufa com circulação de ar a 35° por 12 a 14 horas.

### 4.3 ANIMAIS E CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Foram utilizados 78 ratos Wistar machos, em idade reprodutiva, aproximadamente 10-12 semanas, distribuídos em seis grupos experimentais (n = 13 animais/grupo) provenientes do Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. Os animais passaram por um período de adaptação de 7 dias.

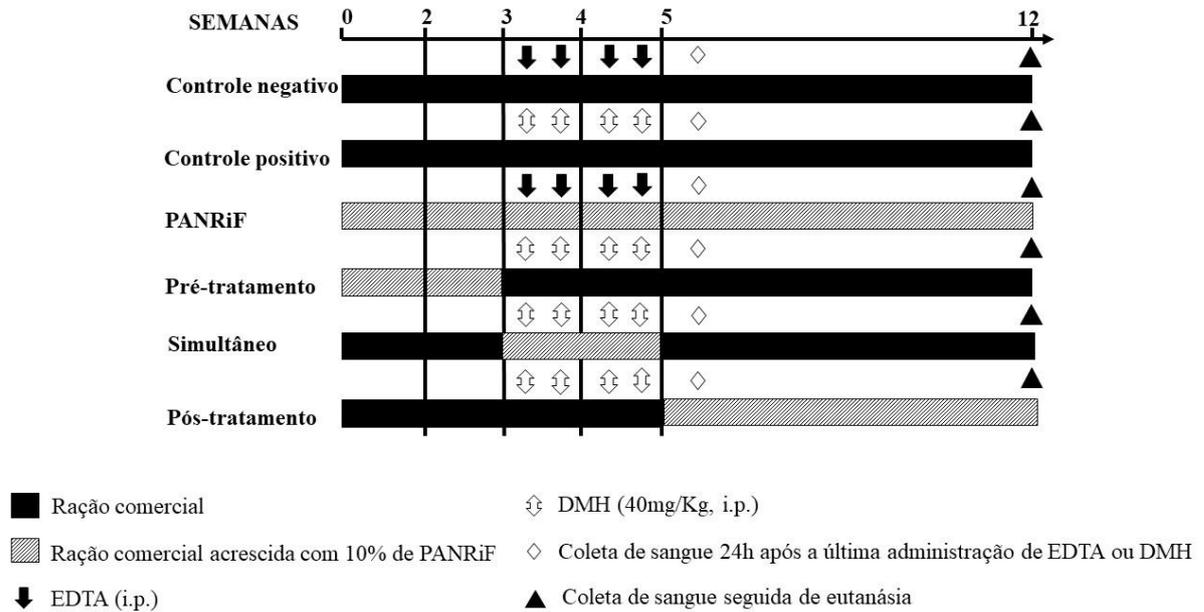
Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno recobertas com maravalha autoclavada, em duplas ou trios. A luminosidade e a temperatura foram controladas (12 horas de claro: 12 horas de escuro) com temperatura mantendo-se em torno de 22°C±2 e umidade 55%±5. A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial (Nuvilab®) ou ração comercial (Nuvilab®) acrescida de 10% de PANRiF, *ad libitum*.

O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul sob o parecer nº 1.000/2018 (ANEXO A).

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais do grupo Controle Negativo receberam ração comercial durante doze semanas e na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas receberam duas doses de solução aquosa de EDTA (0,37 mg/mL) na proporção de 1mL/100g de (p.c.; i.p.). Os animais do grupo Controle Positivo foram tratados da mesma forma que o controle negativo. No entanto, o EDTA foi substituído por uma solução de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) na dose de 40 mg/kg (p.c.; i.p.). Os animais do grupo PANRiF foram tratados como o controle negativo. No entanto, a ração comercial foi substituída pela ração acrescida com 10% de PANRiF. Os animais do grupo Pré-tratamento receberam a ração comercial acrescida com 10% de PANRiF por duas semanas (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas). Em seguida, passaram a receber ração comercial (3<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semanas). Na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas receberam duas doses/semana de DMH (40 mg/Kg, p.c., i.p.). Os animais do grupo Simultâneo receberam ração comercial na 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas e depois da 5<sup>a</sup> à 12<sup>a</sup> semanas. Na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas os animais receberam duas doses/semana de DMH (40 mg/Kg, p.c., i.p.) e foram alimentados com ração acrescida de 10% de PANRiF. Os animais do grupo Pós-tratamento receberam ração comercial da 1<sup>a</sup> à 4<sup>a</sup> semana e depois passaram a receber a ração acrescida de 10% de PANRiF da 5<sup>a</sup> à 12<sup>a</sup> semana. Na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas os animais receberam duas doses/semana de DMH (40 mg/Kg, p.c., i.p.) (Figura 3).

Figura 3 – Delineamento experimental.



PANRiF – Produto Alimentício Natural Rico em Fibras; EDTA - ácido etilendiamino tetraacético; DMH - 1,2-dimetilhidrazina; p.c. – peso corporal; i.p. – intraperitoneal. Fonte: Autor, 2022.

O peso corporal individual e consumo de alimentos foram quantificados duas vezes por semana durante o período experimental.

Vinte e quatro horas após a última administração de EDTA ou DMH foi coletada uma amostra de 20 µL de sangue periférico, por punção da veia caudal, para a realização do ensaio do cometa e 20 µL para a realização do ensaio do micronúcleo (Figura 3).

No final da 12<sup>a</sup> semana, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano para a coleta de sangue por punção retro-orbital. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose do mesmo anestésico. Posteriormente, os animais foram submetidos à torcotomia e laparotomia para a coleta de órgãos e, em especial, o intestino para avaliação dos FCA.

#### 4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA RAÇÃO E DO PRODUTO ALIMENTÍCIO NATURAL RICO EM FIBRAS

A umidade foi determinada em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 2011). As cinzas foram determinadas em mufla (550°C) (AOAC, 2011). Os lipídios totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959). As proteínas foram avaliadas por meio do

teor de nitrogênio total da amostra, pelo método Kjeldahl, determinado ao nível semimicro (AOAC, 2011). Utilizou-se o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25. O teor de fibra alimentar total foi avaliado pelo método AOAC 985.29 (AOAC, 2011). A determinação de carboidratos foi realizada por cálculo teórico (por diferença) pela fórmula % Carboidratos =  $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ fibra alimentar})$ . O valor calórico total (kcal) foi calculado utilizando-se os seguintes valores: lipídios (9,03 kcal/g), proteína (4,27 kcal/g) e carboidratos (3,82 kcal/g) (MERRILL; WATT, 1973). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 4.6.1 Ensaio do cometa

O ensaio foi conduzido segundo Singh et al. (1988) com modificações de Navarro et al. (2014). Vinte microlitros de sangue periférico foram homogeneizados com 120 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (Low melting point – LMP – 1,5%), a 37°C. Em seguida, essa mistura foi depositada em uma lâmina pré-coberta com agarose normal (5%) e recoberta por lamínula de vidro. Resfriou-se a 4°C por 20 minutos e retirou-se as lamínulas. As lâminas foram imersas em solução de lise (89,0mL de estoque de lise (2,5M NaCl, 100,0mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido, 890,0 mL de água destilada e 1% de laurilsarcosinato de sódio), 1,0 mL de Triton X -100 e 10,0 mL de DMSO) por 1h. Após, as lâminas foram transferidas para o tampão de eletroforese para desnaturação (300,0mM NaOH e 1,0mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10,0N e EDTA 200,0mM pH10,0) por 20 minutos e, posteriormente, foi realizada a eletroforese com tampão pH>13 a 4°C por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com 15,0 mL de solução de neutralização (0,4M Tris e 950mL água deionizada - pH 7,5) por 15 minutos e secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos. As lâminas foram coradas com 100  $\mu$ l de brometo de etídio. Os nucleóides foram fotografados em microscópio de fluorescência (Leica, DMi8) com uma ampliação de 200x. Posteriormente, foram analisados 200 nucleóides/animal no programa CometScore 2.0.0.38 TriTek. Os parâmetros utilizados foram a porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda.

Foi realizado um controle interno do teste com células B16F10 tratadas por 3 horas com doxorubicina (5 $\mu$ M). O cultivo das células foi realizado segundo Navarro et al. (2018). As lâminas submetidas à mesma corrida de eletroforese das lâminas de sangue periférico.

#### 4.6.2 Ensaio de micronúcleo em sangue periférico

Foi realizado pelo método descrito por Hayashi et al. (1990) e modificado por Navarro et al. (2014). Para tanto, uma lâmina recoberta com 20 µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) recebeu 20 µL de sangue periférico da veia caudal. A lâmina foi recoberta por lamínula e acondicionada em freezer (-20 °C) por um período mínimo de sete dias. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®), no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm. Foram analisadas 2.000 células/animal.

#### 4.6.3 Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA)

Após as eutanásias, foram coletados os intestinos grossos. Esses foram abertos pela linha mesentérica e fixados em isopor. Posteriormente, os intestinos foram fixados em solução tamponada de formalina 10%, por um período mínimo de 24 horas. No momento da análise, cada segmento do cólon foi corado com solução de azul de metileno 10% por 10 minutos e depositado em uma lâmina com a mucosa voltada para cima. A análise foi realizada em microscópio óptico de campo claro em aumento de 10x. Toda a mucosa foi avaliada para a identificação e quantificação dos FCA. A identificação dos FCA foi baseada nos critérios utilizados por Bird (1987): (I) foco constituído de uma única cripta - a cripta aberrante apresenta revestimento por camada epitelial espessa, com abertura luminal elíptica e de tamanho superior (ao menos 2x) aos das criptas normais circunvizinhas; (II) foco com duas ou mais criptas - as criptas aberrantes formam blocos distintos e ocupam uma área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas de morfologia normal. Não há presença de criptas normais separando as criptas aberrantes dentro desses focos. Os FCA foram analisados de acordo com a ocorrência de 1 a 3 criptas/foco, 4 a 8 criptas/foco e mais de 9 criptas/foco. Para análise estatística considerou-se o número total de FCA, de criptas aberrantes por focos e a relação cripta/foco (BIRD; GOOD, 2000).

#### 4.6.4 Cálculo da porcentagem de redução de danos (% DR)

A porcentagem de redução de danos do PANRiF em lesões induzidas pelo DMH foi calculada segundo Manoharan & Banerjee (1985), com modificações de Pesarini et al. (2013):

$$\%DR = \frac{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do controle negativo}} \times 100$$

#### 4.6.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

As análises hematológicas foram realizadas em unidade de automação KX-21 (Sysmex®), segundo recomendações do fabricante, e revisadas em lâmina por meio de contagem diferencial (leucócitos) (BAIN et al., 2016) e observação de morfologia/coloração celular (BAIN et al., 2016).

O sangue periférico coletado por punção retro-orbital foi acondicionado em tubo com gel separador (BD®, CAT: 367986, lote: 6305645-2017-10-31). Em seguida, foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos (Megafuge™ 16 Centrifuge Series - Thermo Fisher Scientific). O soro foi separado para as análises bioquímicas realizadas no Cobas C111 por meio de kits comerciais (Roche®; Lote: aspartato aminotransferase – AST 41777901, alanina aminotransferase – ALT 42120501, proteína total 3824560, albumina 38244901, uréia sérica 42549401, creatinina 38184001, ácido úrico 34263401, glicose 40900901,  $\alpha$ -amilase 42941601, colesterol 41613201, HDL colesterol 39303201 e triglicerídeos 40929901 de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.6.6 Quantificação da expressão de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 e TNF- $\alpha$

O sangue periférico coletado por punção retro-orbital foi acondicionado em tubo com gel separador (BD®, CAT: 367986, lote: 6305645-2017-10-31). Em seguida foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos (Megafuge™ 16 Centrifuge Series - Thermo Fisher Scientific). O soro foi separado para a quantificação das citocinas, usando o Kit Cytometric Beads Array - CBA (CAT: 552364, Lote: 8171797; BD®), seguindo as instruções do fabricante, em citômetro de fluxo Cytotflex Beckman Coulter®. Para tanto, incubou-se 50  $\mu$ L de soro de cada animal com 50  $\mu$ L de marcador (Mouse Inflammation PE Detection Reagent) juntamente com as esferas de capturas marcadas (Capture Beads) por 2 horas. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi homogeneizados com 1mL de tampão de lavagem (Wash buffer) e procedeu-se nova centrifugação e descarte do sobrenadante. Ao final, o precipitado foi ressuspendido em 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e 10.000 esferas foram avaliadas em citômetro de fluxo Cytotflex Beckman Coulter para a determinação da quantidade de cada citocina. Os dados foram calculados utilizando cálculo de regressão linear simples em curva padrão para se obter os valores em pg/mL.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises químicas foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e os demais em média  $\pm$  erro padrão. Os dados com distribuição paramétrica foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste Tukey e os não paramétricos por Kruskal–Wallis seguida do teste Dunn. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com o proposto nos objetivos foi realizado um experimento pré-clínico em ratos suplementados com 10% de PANRif. Os resultados desse experimento estão apresentados a seguir, na forma de artigo intitulado “The use of Natural Fiber-Rich Food Product is safe and reduces aberrant crypt foci in a pre-clinical model”, publicado no periódico NUTRIENTS da editora MDPI, qualis/CAPES A1 na área interdisciplinar (fator de impacto 4,171).

## Article

# The Use of Natural Fiber-Rich Food Product Is Safe and Reduces Aberrant Crypt Foci in a Pre-Clinical Model

Luane Aparecida do Amaral <sup>1,2</sup>, Taina da Silva Fleming de Almeida <sup>3</sup>, Gabriel Henrique Oliveira de Souza <sup>4</sup>, Adrivanio Baranoski <sup>1,2</sup>, Rafael Souza Maris <sup>5</sup>, Felipe Francisco Bittencourt Junior <sup>5</sup>, Bruna Paola Murino Rafacho <sup>3,4,6</sup>, Antonio Carlos Duenhas Monreal <sup>7</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya <sup>8</sup>, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva <sup>1,2</sup>, Elisvânia Freitas dos Santos <sup>2,3,4</sup> and Rodrigo Juliano Oliveira <sup>1,2,6,\*</sup>



**Citation:** do Amaral, L.A.; da Silva Fleming de Almeida, T.; Oliveira de Souza, G.H.; Baranoski, A.; Souza Maris, R.; Bittencourt Junior, F.F.; Murino Rafacho, B.P.; Duenhas Monreal, A.C.; Leite Kassuya, C.A.; Milan Brochado Antonioli-Silva, A.C.; et al. The Use of Natural Fiber-Rich Food Product Is Safe and Reduces Aberrant Crypt Foci in a Pre-Clinical Model. *Nutrients* **2021**, *13*, 2708. <https://doi.org/10.3390/nu13082708>

Academic Editor: Stefano Realdon

Received: 28 May 2021

Accepted: 10 July 2021

Published: 6 August 2021

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



**Copyright:** © 2021 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/>).

- <sup>1</sup> Center for Studies in Stem Cells, Cell Therapy and Toxicological Genetics—CeTroGen, University Hospital Maria Aparecida Pedrossian, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79080-190, Brazil; luapamaral@hotmail.com (L.A.d.A.); adrivaniobaranoski@yahoo.com.br (A.B.); andrea@corporesanosade.com.br (A.C.M.B.A.-S.)
- <sup>2</sup> Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; elisvania@gmail.com
- <sup>3</sup> Postgraduate Program in Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; tainaafleming@gmail.com (T.d.S.F.d.A.); brunapaola@gmail.com (B.P.M.R.)
- <sup>4</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; g.henrique99@hotmail.com
- <sup>5</sup> Clinical Analysis Laboratory, University Center of Grande Dourados, Dourados 79824-900, Brazil; rafaelsoouza\_maris@hotmail.com (R.S.M.); fb\_biomed@hotmail.com (F.F.B.J.)
- <sup>6</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil
- <sup>7</sup> Três Lagoas Pedagogical Center, Federal University of Mato Grosso do Sul, Três Lagoas 79600-080, Brazil; monreal.tocarlo@gmail.com
- <sup>8</sup> Faculty of Health Sciences, University of Grande Dourados, Dourados 79825-900, Brazil; candida2005@gmail.com
- \* Correspondence: rjo.rodrigojulianooliveira@gmail.com; Tel.: +55-67-984346510

**Abstract:** Background: Colorectal cancer is a highly prevalent disease, requiring effective strategies for prevention and treatment. The present research aimed to formulate a natural fiber-rich food product (NFRFP) and to evaluate its safety, toxicogenetics, and effects on aberrant crypt foci induced by 1,2-dimethyl-hydrazine in a preclinical model. Methods: A total of 78 male Wistar rats were distributed in six experimental groups: negative control, positive control (1,2-Dimethylhydrazine—40 mg/Kg), and four groups fed with 10% NFRFP: NFRFP, pre-treatment protocol, simultaneous treatment, and post-treatment protocol. Results: The NFRFP was shown to be a good source of fibers and did not change biometric, biochemical, hematological, and inflammatory parameters, and did not induce signs of toxicity and genotoxicity/carcinogenicity. NFRFP exhibited a chemopreventive effect, in all protocols, with damage reduction (% DR) of 75% in the comet test. NFRFP reduced the incidence of aberrant crypt outbreaks by 49.36% in the post-treatment protocol. Conclusions: The results suggest the applicability of NFRFP in the human diet due to potential production at an industrial scale and easy technological application in different products, since it could be incorporated in food without altering or causing small changes in final product sensory characteristics.

**Keywords:** chemoprevention; 1,2-dimethylhydrazine; aberrant crypt foci; functional foods; dietary fibers

## 1. Introduction

Colon cancer exhibits high metastatic potential and it is an important public health issue as it ranks third in incidence and second in mortality among all cancers in the world,

in both sexes [1]. Lifestyle and eating habits directly influence the risk and/or prevention of the development of this disease [2].

The Western diet, rich in red and processed meat, and low in fruits and vegetables [3], changes the intestinal microbiota and can trigger inflammatory processes that are associated with the development of cancer [4]. Whole cereals and grains, which are common in the Mediterranean diet, are good sources of dietary fiber associated with reduced risk of colorectal cancer [5–7].

Dietary fibers are non-digestible components that contribute to: (1) acceleration of the passage of metabolic waste products through the body; (2) adsorption of toxins; (3) maintaining the integrity of the digestive tract; (4) substrate for synthesis of short-chain fatty acids that provide energy for colonocytes; and (5) reduction of intestinal colonization by bacteria responsible for metabolizing and/or releasing pro-carcinogens and carcinogens [6,8–10]. Among the fibers possessing this capacity, those present in brown flaxseed [11], chia [12], and green banana flour [13,14], oats [15], and quinoa [16] stand out. Although textured soy protein does not have large amounts of dietary fiber, this food is resistant to digestion and absorption in the small intestine due to its protein constitution, which in turn can modulate the effects of prebiotics on the intestinal microbiota and prevent colorectal cancer [17].

Considering the high prevalence of colorectal cancer [1], new formulations based on products rich in fibers used in the prevention or as adjuvant treatments of this type of neoplasia are of paramount need. Thus, this research aimed to formulate a natural fiber-rich food product (NFRFP) and to evaluate its safety, toxicogenetics, and effects on aberrant crypt foci induced by 1,2-dimethyl-hydrazine in a pre-clinical model.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemical Agent

For the induction of aberrant crypt foci (ACF), chemical agent 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA, CAS No. 306-37-6) was used at a dose of 40 mg/kg of body weight (BW), diluted in aqueous solution of ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA—0.37 mg/mL), with pH correction to 6.5 by adding 0.1 N NaOH [18], intraperitoneally (ip), with modification by Limeiras et al. [19], Navarro et al. [14], Pamplona-Silva et al. [11], and Pesarini et al. [10]. Two doses were administered per week for two weeks [20–23].

### 2.2. Preparation of Natural Fiber-Rich Food Product

The natural fiber-rich food product (NFRFP) is a mixture of brown flaxseed (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 2502), chia (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 1902), green banana flour (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 0701), oats (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 1412), quinoa (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 0101) and textured soy protein (Natubom<sup>®</sup>, Campo Grande, Brazil, Lot 702), acquired in commercial establishments in the city of Campo Grande, MS, Brazil. All ingredients were ground and mixed in the same proportion. Next, NFRFP was added to crushed commercial chow (Nuvilab<sup>®</sup>, Colombo, Brazil) in the proportion of 10%. After homogenization, the modified chow was moistened by adding filtered water, pelleted, and dried in an oven with air circulation at 35 °C for 12–14 h.

### 2.3. Animals and Environmental Conditions

Seventy-eight male Wistar rats of reproductive age, i.e., approximately 10–12 weeks old, from the Central Vivarium of the Biosciences Institute of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, were distributed in six experimental groups ( $n = 13$  animals/group) after an adaptation period of 7 days.

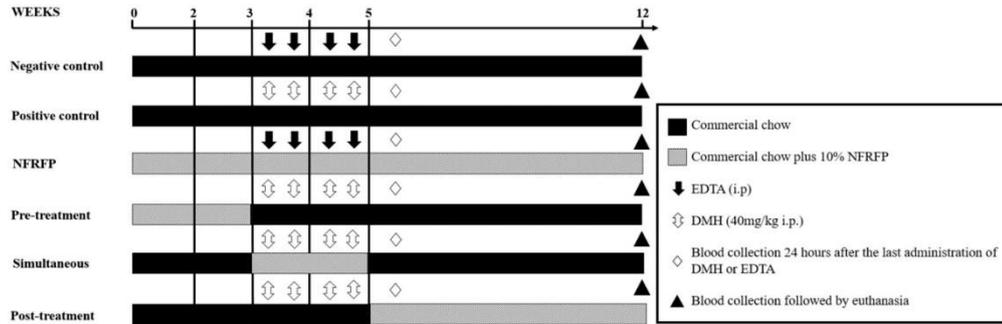
Animals were kept in pairs or trios in polypropylene boxes covered with autoclaved shavings. Luminosity and room temperature were controlled (12 h of light: 12 h of dark) around 22 °C  $\pm$  2 and 55%  $\pm$  5 of humidity. Animal feeding consisted of filtered water and

commercial chow (Nuvilab<sup>®</sup>, Colombo, Brazil) or commercial chow (Nuvilab<sup>®</sup>, Colombo, Brazil) plus 10% NFRFP, ad libitum.

The experiment was carried out in accordance with the Ethical Principles in Animal Research and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Mato Grosso do Sul under opinion n<sup>o</sup> 1000/2018.

#### 2.4. Experimental Design

Animals in the Negative Control group received commercial chow for twelve weeks and in the 3rd and 4th weeks received two doses of aqueous EDTA solution (0.37 mg/mL) in the proportion of 1 mL/100 g of (BW; i.p.). Animals in the Positive Control group were treated in the same way as the negative control, replacing EDTA with 40 mg/kg 1,2-dimethylhydrazine (DMH) solution (BW; i.p.). Animals in the NFRFP group were treated as the negative control but were fed with 10% NFRFP chow. Animals in the Pretreatment group received commercial chow plus 10% NFRFP for two weeks (1st and 2nd weeks). Then, they started to receive commercial chow (3rd to 12th week). In the 3rd and 4th weeks, they received two doses/week of DMH (40 mg/Kg, BW, i.p.). Animals in the Simultaneous group received commercial chow in the 1st and 2nd weeks, then in the 5th to 12th weeks. In the 3rd and 4th weeks, the animals received two doses/week of DMH (40 mg/Kg, BW, i.p.) and were fed with a 10% NFRFP chow. Animals in the Post-treatment group received commercial chow from the 1st to the 4th week and then started to receive chow plus 10% NFRFP from the 5th to the 12th week. At the 3rd and 4th weeks, the animals received two doses/week of DMH (40 mg/Kg, BW, i.p.) (Figure 1).



**Figure 1.** Experimental design. NFRFP—Natural Food Product Rich in Fiber; EDTA—ethylenediamine tetra-acetic acid; DMH—1,2-dimethylhydrazine; i.p.—intraperitoneal.

The present experimental design is common in the field area [14,19,21,24–26] as it might indicate the mechanism of action of dietary fiber in the prevention and/or repair of DNA damage and other biomarkers for cancer. Thus, pre-treatment and simultaneous treatment protocols suggest a preferentially demutagenic effect and the post-treatment protocol a bioantimutagenesis effect [27–30].

Individual body weight and food consumption were quantified twice a week during the experimental period. Twenty-four hours after the last administration of EDTA or DMH, a sample of 20  $\mu$ L of peripheral blood was collected, by puncture of the caudal vein, to perform the comet assay and 20  $\mu$ L to perform the micronucleus assay (Figure 1).

At the end of the 12th week, animals were subjected to inhaled anesthesia with isoflurane to collect blood by retro-orbital puncture. Then, the animals were euthanized by overdose of the same anesthetic. Subsequently, animals were submitted to thoracotomy and laparotomy for the collection of organs and, in particular, the intestine for evaluation of the ACF (Figure 1).

### 2.5. Chemical Analysis of Feed and Natural Fiber-Rich Food Product

Humidity was determined in an oven at 105 °C until constant weight (AOAC, 2011). Ashes were determined in a muffle furnace (550 °C) [31]. Total lipids were determined by the method of Bligh & Dyer [32]. Proteins were evaluated using the total nitrogen content of the sample, assessed using the Kjeldahl method and determined at the semi-micro level [31]. Nitrogen to protein conversion factor of 6.25 was applied. Total dietary fiber content was assessed using the AOAC 985.29 method [31].

Carbohydrate content was assessed by theoretical calculation (by difference) using the formula % Carbohydrates = 100 – (% moisture + % protein + % lipids + % ash + % dietary fiber). The total caloric value (kcal) was calculated using the following values: lipids (9.03 kcal/g), protein (4.27 kcal/g), and carbohydrates (3.82 kcal/g) [33]. All analyses were performed in triplicate.

### 2.6. Biological Tests

#### 2.6.1. Evaluation of Genotoxicity and Antigenotoxicity

##### Comet Assay

This assay was conducted according to Singh et al. (1988) with modifications by Navarro et al. [34]. Twenty microliters of peripheral blood were homogenized with 120 µL of low melting point agarose (Low melting point—LMP—1.5%) at 37 °C. Then, this mixture was deposited on a slide pre-covered with normal agarose (5%) and covered by a glass coverslip. Slides were cooled to 4 °C for 20 min and the coverslips were removed. Slides were immersed in a lysis solution (89.0 mL of lysis stock (2.5 M NaCl, 100.0 mM EDTA, 10.0 mM Tris, pH 10.0 corrected with solid NaOH, 890.0 mL of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosinate), 1.0 mL of Triton X-100 and 10.0 mL of DMSO) for 1 h. Afterwards, slides were transferred to the electrophoresis buffer for denaturation (300.0 mM NaOH and 1.0 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10.0 N NaOH and EDTA 200.0 mM pH10.0) for 20 min and, subsequently, electrophoresis was performed with buffer pH > 13 at 4 °C for 20 min. After electrophoresis, slides were neutralized with 15.0 mL of neutralization solution (0.4 M Tris and 950 mL deionized water—pH 7.5) for 15 min and dried in open air and fixed in absolute ethyl alcohol for 10 min. Slides were stained with 100 µL of ethidium bromide. The nucleoids were photographed under a fluorescence microscope (Leica®, DMi8, Wetzlar, Germany) with a magnification of 200×. Subsequently, 200 nucleoids/animal were analyzed in the CometScore 2.0.0.38 TriTek program. The parameters used were the percentage of DNA in the tail and the moment of the tail.

An internal test control was performed with B16F10 cells treated with doxorubicin (5 µM) for 3 h. Cell cultivation was performed according to Navarro et al. [35]. The slides were submitted to the same electrophoresis run as the peripheral blood slides.

##### Peripheral Blood Micronucleus Assay

The peripheral blood micronucleus assay was carried out as described by Hayashi et al. [36] and modified by Navarro et al. [34]. For this purpose, a slide covered with 20 µL of Acridine Orange (1.0 mg/mL) received 20 µL of peripheral blood from the caudal vein. The slide was covered by a coverslip and stored in a freezer (−20 °C) for a minimum period of seven days. The analysis was performed in an epifluorescence microscope (Motic®, BA410 FL, Vancouver, BC, Canada), at 40× magnification, with excitation filter 420–490 nm and barrier filter 520 nm. A total of 2000 cells/animal were analyzed.

#### 2.6.2. Testing of Aberrant Crypt Foci

After euthanasia, large intestines were collected. These were opened by the mesenteric line and fixed in styrofoam. Subsequently, the intestines were fixed in a 10% formalin buffered solution for a minimum period of 24 h. At the time of analysis, each segment of the colon was stained with 10% methylene blue solution for 10 min and deposited on a slide with the mucosa facing upwards. The analysis was performed using a 10× magnification bright field optical microscope. The entire mucosa was evaluated for the identification

and quantification of ACF. The identification of ACF was based on the criteria used by Bird [37]: (1) focus consisting of a single crypt—the aberrant crypt is covered by a thick epithelial layer, with an elliptical luminal opening and of a larger size (at least  $2\times$ ) than those of the surrounding normal crypts; (2) focus with two or more crypts—the aberrant crypts form separate blocks and occupy an area larger than that occupied by an equivalent number of crypts of normal morphology. There is no presence of normal crypts separating aberrant crypts within these foci. The ACF were analyzed according to the occurrence of 1–3 crypts/outbreak, 4–8 crypts/outbreak, and more than 9 crypts/outbreak. For statistical analysis, the total number of ACF, of aberrant crypts by foci, and the crypt/focus ratio were considered [38].

#### 2.6.3. Calculation of Damage Reduction Percentage (% DR)

The percentage of NFRFP damage reduction in DMH-induced injuries was calculated according to Manoharan and Banerjee [39], with modifications by Pesarini et al. [10], as follows:

$$\%DR = \frac{\text{Average of the positive control} - \text{Average of the associated group}}{\text{Average of the positive control} - \text{Average of the negative control}} \times 100$$

#### 2.6.4. Hematological and Biochemical Parameters

Hematological analyzes were carried out in a KX-21 automation unit (Sysmex®), according to the manufacturer's recommendations, and revised on a slide by means of differential counting (leukocytes) [40] and observation of cell morphology/staining [40].

Peripheral blood collected by retro-orbital puncture was placed in a tube with separating gel (BD®, Curitiba, Brazil, CAT: 367986, lot: 6305645-2017-10-31). Then, it was centrifuged at 2000 rpm for 10 min (Fanem®, Excelsa 3, São Paulo, Brazil). Serum was separated for biochemical analyses performed on Cobas C111 using commercial kits (Roche®, Mannheim, Germany, Batch: aspartate aminotransferase—AST 41777901, alanine aminotransferase—ALT 42120501, total protein 3824560, albumin 38244901, serum urea 42549401, creatinine 38184001 uric 34263401, glucose 40900901,  $\alpha$ -amylase 42941601, cholesterol 41613201, HDL cholesterol 39303201 and triglycerides 40929901) according to the manufacturer's recommendations.

The parameters evaluated included total cholesterol, HDL cholesterol, glucose,  $\alpha$ -amylase, lipase, markers of liver function (ALT and AST), markers of renal function (urea, creatinine, and uric acid), and protein profile (albumin and total proteins).

#### 2.6.5. Quantification of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 and TNF- $\alpha$ Cytokine Expression

Peripheral blood collected by retro-orbital puncture was placed in a tube with separating gel (BD®, CAT: 367986, lot: 6305645-2017-10-31). Then, it was centrifuged at 2000 rpm for 10 min (Fanem®, Excelsa 3, São Paulo, Brazil). The serum was separated for cytokine quantification, using the Cytometric Beads Array Kit—CBA (CAT: 552364, Lot: 8171797; BD®), following the manufacturer's instructions, using a Cytoflex Beckman Coulter® flow cytometer. For this purpose, 50  $\mu$ L of serum from each animal was incubated with 50  $\mu$ L of marker (Mouse Inflammation PE Detection Reagent) together with the marked capture spheres (Capture Beads) for 2 h. Subsequently, the mixture was centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The supernatant was discarded. The precipitate was homogenized with 1 mL of wash buffer (Wash buffer) and a new centrifugation and supernatant disposal were performed. At the end, the precipitate was resuspended in 300  $\mu$ L of wash buffer and 10,000 spheres were evaluated in a Cytoflex Beckman Coulter flow cytometer to determine the amount of each cytokine. The data were calculated using simple linear regression calculation on a standard curve to obtain the values in pg/mL.

### 2.7. Statistical Analysis

Chemical analysis results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and other variables as mean  $\pm$  standard error. Parametric distribution data were analyzed by ANOVA/Tukey and non-parametric Kruskal–Wallis/Dunn. The level of significance adopted was  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Chemical Analysis of Diets and Evaluation of Food Intake

Chemical analysis of commercial chow and commercial chow plus 10% NFRFP showed that the addition of NFRFP reduces ( $p < 0.05$ ) the moisture and amount of carbohydrates by 19.45% and 7.7%. The amount of dietary fiber increased by 20.94%. Ashes, protein, lipids, and calories did not change significantly ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** Chemical analysis of commercial chow, chow plus 10% NFRFP and NFRFP.

Parameters	Commercial Chow Nuvilab <sup>®</sup>	Commercial Chow Plus 10% NFRFP	NFRFP
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Humidity (g/100 g)	9.47 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	7.14 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	7.60 $\pm$ 0.16
Ashes (g/100 g)	7.00 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	6.96 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	3.44 $\pm$ 0.06
Protein (g/100 g)	20.14 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	21.19 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	17.65 $\pm$ 0.30
Lipids (g/100 g)	3.80 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.74 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	11.81 $\pm$ 0.13
Carbohydrates (g/100 g) *	42.20 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	38.95 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	40.76 $\pm$ 0.76
Calories (kcal/100 g)	281.57 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	282.06 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	337.72 $\pm$ 1.27
Total food fiber (g/100 g)	17.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	21.02 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	18.75 $\pm$ 0.62

NFRFP—Natural Fiber-Rich Food Product; SD: Standard Deviation. Data expressed on wet basis. Different letters in the same line indicate statistically significant differences (Statistical Test: Student's *t*;  $p < 0.05$ ). \* Calculated by difference.

Chemical analysis of NFRFP showed that it contains 7.60  $\pm$  0.16 g/100 g of moisture, 3.44  $\pm$  0.06 g/100 g of ashes, 17.65  $\pm$  0.30 g/100 g of protein, 11.81  $\pm$  0.13 g/100 g of lipids, 40.76  $\pm$  0.76 g/100 g of carbohydrates, 337.72  $\pm$  1.27 g/100 g of calories and 18.75  $\pm$  0.62 g/100 g of total fiber (Table 1).

Average food intake did not differ among the experimental groups ( $p > 0.05$ ). The lowest food intake was observed in the simultaneous treatment group (19.83  $\pm$  2.61) and the highest was observed in the negative control (24.53  $\pm$  0.91) (Supplementary Figure S1).

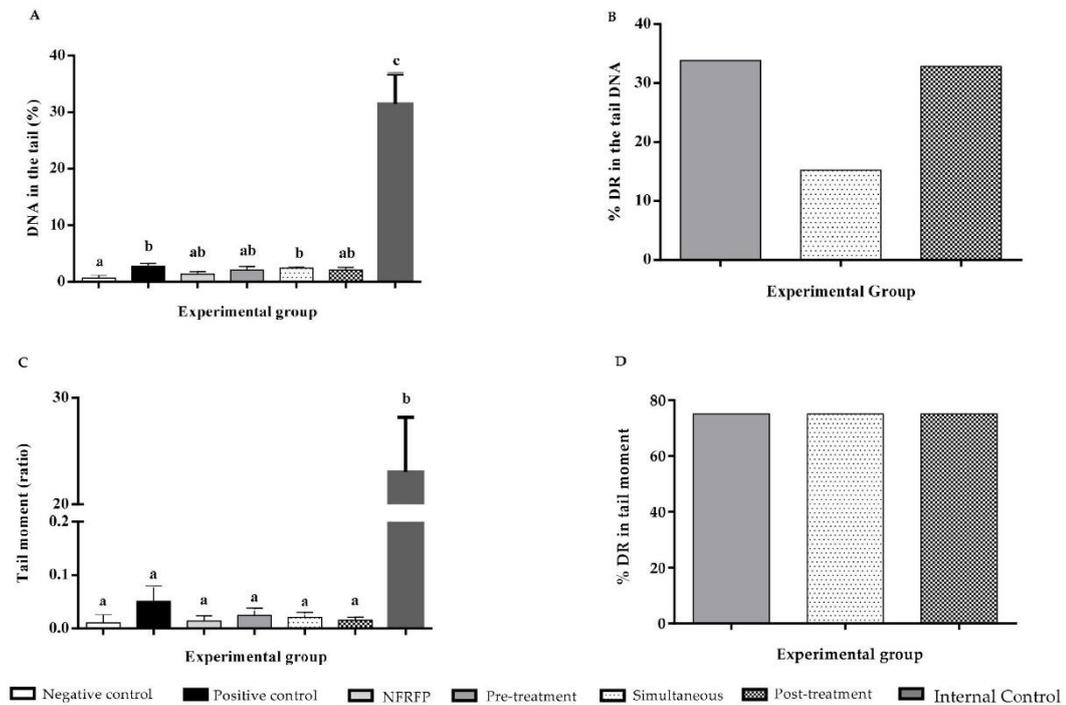
### 3.2. Effects of Feed Plus 10% NFRFP and Feeding Protocols on Biometric Parameters

Animals started the experiment period with similar body weights ( $p > 0.05$ ). Final body weight and weight gain did not show statistically significant differences among the experimental groups regardless of diet and treatment protocol ( $p > 0.05$ ). Absolute and relative weights of heart, lung, liver, spleen, kidneys, right epididymis, and right testicle did not present significant differences when compared to the negative control group ( $p > 0.05$ ) (Supplementary Table S1).

### 3.3. Genotoxicity Tests

The Comet test showed that DMH is capable of increasing the frequency of genomic lesions. Thus, there was an increase of 4.09 $\times$  in % tail DNA and 5 $\times$  in moment of the tail ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A,C).

NFRFP did not cause changes ( $p > 0.05$ ) in the frequency of % tail DNA or in the moment of the tail when compared to the negative control ( $p > 0.05$ ) (Figure 2C).

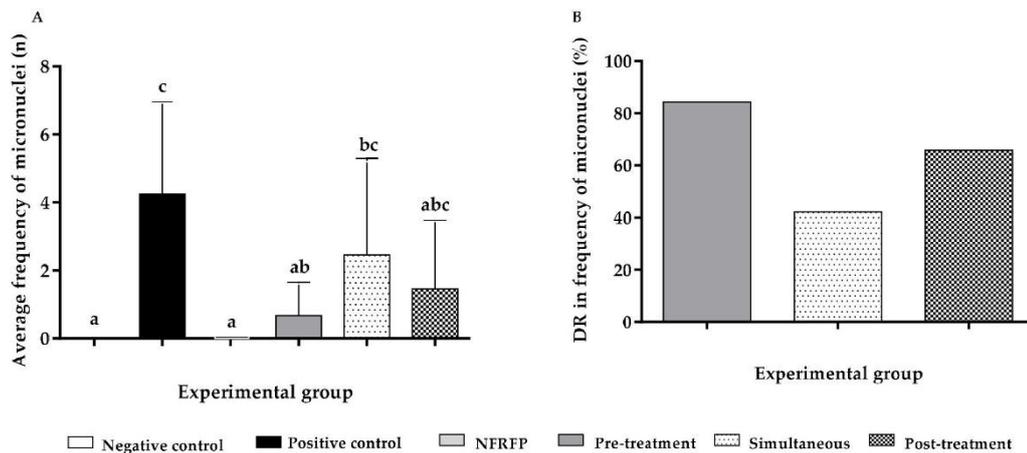


**Figure 2.** Chemopreventive action of Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP), by the comet assay, in different protocols for inducing DNA damage by 1,2-Dimethylhydrazine. (A) % DNA in the tail; (B) % Reduction of DNA damage in the tail DNA; (C) Moment of the tail; (D) % Reduction of damage in tail moment. Internal Control—was performed with B16F10 cells treated with doxorubicin (5  $\mu$ M). Different letters indicate statistically significant differences (Statistical Test: ANOVA/Tukey;  $p < 0.05$ ).

The association protocols demonstrated that NFRFP exhibits a chemopreventive effect ( $p < 0.05$ ). The % DR in % tail DNA was 33.81%, 15.24%, and 32.86% for pre-treatment, simultaneous treatment, and post-treatment, respectively (Figure 2B). Regarding % DR for the tail moment, results showed 75% for all protocols analyzed ( $p < 0.05$ ) (Figure 2D).

Figure 2A,C show (in the last bar of the histogram) values of % DNA in the tail and Tail Moment for an internal control of the test, performed with B16F10 cells treated with Doxorubicin (5  $\mu$ M), which presented the values of  $31.44 \pm 5.33$  and  $23.03 \pm 5.12$ , respectively.

The frequency of micronuclei in the positive control increased ( $p < 0.05$ ) by 4.25 times in relation to the negative control. The NFRFP did not induce an increase in the frequency of micronuclei ( $p > 0.05$ ) (Figure 3A). The chemopreventive effect was observed only for the pre-treatment protocol ( $p < 0.05$ ) (Figure 3A) with % DR of 84.31% (Figure 3B). The simultaneous and post-treatment protocols did not show chemopreventive activity ( $p > 0.05$ ) (Figure 3A) and the % DR were 42.24% and 65.76%, respectively (Figure 3B).



**Figure 3.** Chemopreventive action of the Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP), by the micronucleus assay, in different protocols for inducing DNA damage by 1,2-Dimethylhydrazine. (A) Average frequency of micronuclei; (B) DNA Damage Reduction Percentage. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical Test: Kruskal-Wallis/Dunn;  $p < 0.05$ ).

### 3.4. Aberrant Crypt Foci

DMH increased ( $p < 0.05$ ) the frequency of foci by  $72.80 \times$  ( $p < 0.05$ ) (Table 2). NFRFP did not increase the frequency of AFC when compared to the negative control group ( $p > 0.05$ ) (Table 2).

**Table 2.** Effect of consumption of Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP) on the frequency of aberrant crypts foci and reduction of damage to the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH).

Group/Treatment	ACF Number			Total ACF Number	%DR
	1–3 Crypts	4–9 Crypts	$\geq 9$ Crypts		
Negative Control	$1.00 \pm 0.46^a$	$0.25 \pm 0.18^a$	$0.00 \pm 0.00^a$	$1.25 \pm 0.52^a$	–
Positive Control	$50.27 \pm 10.42^c$	$36.82 \pm 5.65^b$	$3.91 \pm 1.15^b$	$91.00 \pm 15.82^c$	–
NFRFP	$3.08 \pm 1.04^a$	$1.69 \pm 0.58^a$	$0.15 \pm 0.15^a$	$4.92 \pm 1.62^a$	–
Pre-treatment	$28.20 \pm 4.61^b$	$37.30 \pm 7.30^b$	$2.90 \pm 1.32^{ab}$	$58.40 \pm 11.45^{bc}$	25.18
Simultaneous	$33.44 \pm 4.49^{bc}$	$27.33 \pm 5.11^b$	$1.22 \pm 0.43^{ab}$	$62.00 \pm 9.07^{bc}$	32.31
Post-treatment	$24.20 \pm 3.67^b$	$21.50 \pm 3.18^b$	$1.00 \pm 0.39^{ab}$	$46.70 \pm 5.70^b$	49.36

NFRFP—Natural Fiber-Rich Food Product; % DR—Percentage of Damage Reduction. Different letters indicate statistically significant differences (Statistical Test: ANOVA/Tukey;  $p < 0.05$ ).

The chemoprotective effect of NFRFP was observed, significantly, for pre- and post-treatment in the occurrence of 1–3 crypts/foci ( $p < 0.05$ ). Regarding 4–8 crypts/foci, all protocols tested were chemopreventive ( $p < 0.05$ ). For the occurrence of more than nine crypts, none of the protocols demonstrated chemoprevention ( $p > 0.05$ ) (Table 2). A general analysis allows us to infer that only the post-treatment protocol was efficient in reducing the AFC induced by DMH and % DR was 49.36%. However, pre-treatment and simultaneous treatment protocols did not show a significant effect, with % DR of 25.18% and 32.31%, respectively.

### 3.5. Evaluation of Biochemical and Hematological Parameters

Hematological analysis showed that platelet concentration was lower than reference values for Wistar rats (CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008; DANTAS et al., 2006)

in the negative control group, NFRFP and pretreatment groups. RDW was lower than the reference value for the pre-treatment group. Statistical analysis demonstrated that there were no significant differences between the experimental groups and the negative control regarding the number of leukocytes, neutrophils, and eosinophils, hemoglobin concentration, and RDW ( $p > 0.05$ ). The simultaneous treatment group showed an increase ( $p < 0.05$ ) in the concentration of erythrocytes. Simultaneous and post-treatment groups showed an increase ( $p < 0.05$ ) for hematocrit, platelets, and monocytes. The post-treatment group showed a reduction ( $p < 0.05$ ) in the frequency of lymphocytes in relation to the negative control (Table 3).

**Table 3.** Effect of consumption of Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP) on hematological parameters in rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH).

Parameters	Experimental Groups						Reference Value
	Negative Control	Positive Control	NFRFP	Pre-Treatment	Simultaneous	Pos-Treatment	
Leucocytes ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8.34 ± 0.78 <sup>a</sup>	10.94 ± 1.11 <sup>a</sup>	9.11 ± 0.45 <sup>a</sup>	9.82 ± 0.90 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.74 <sup>a</sup>	10.32 ± 1.00 <sup>a</sup>	3.41–13.7 <sup>1</sup>
Erythrocytes ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5.91 ± 0.51 <sup>a</sup>	6.20 ± 0.27 <sup>a</sup>	6.59 ± 0.08 <sup>ab</sup>	6.43 ± 0.20 <sup>ab</sup>	7.74 ± 0.30 <sup>b</sup>	7.20 ± 0.40 <sup>ab</sup>	5.4–8.5 <sup>2</sup>
Hemoglobin (g/dL)	11.59 ± 0.82 <sup>a</sup>	11.94 ± 0.58 <sup>a</sup>	12.75 ± 0.09 <sup>a</sup>	12.37 ± 0.31 <sup>a</sup>	13.57 ± 0.97 <sup>a</sup>	12.35 ± 1.16 <sup>a</sup>	10.2–17.8 <sup>1</sup>
Hematocrit (%)	34.37 ± 2.48 <sup>a</sup>	35.84 ± 1.12 <sup>ab</sup>	38.05 ± 0.34 <sup>abc</sup>	36.66 ± 0.94 <sup>abc</sup>	43.00 ± 1.37 <sup>c</sup>	40.58 ± 1.52 <sup>bc</sup>	23.8–51.9 <sup>1</sup>
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	635.40 ± 59.47 <sup>a</sup>	786.80 ± 38.78 <sup>ab</sup>	712.00 ± 16.33 <sup>a</sup>	684.20 ± 42.43 <sup>a</sup>	981.60 ± 58.60 <sup>b</sup>	938.90 ± 89.64 <sup>b</sup>	727–1351 <sup>1</sup>
Neutrophils (%)	12.92 ± 1.55 <sup>ab</sup>	16.18 ± 2.43 <sup>ab</sup>	9.77 ± 0.44 <sup>a</sup>	16.30 ± 1.67 <sup>ab</sup>	13.11 ± 2.15 <sup>ab</sup>	19.10 ± 3.24 <sup>b</sup>	NF
Lymphocytes (%)	83.45 ± 1.43 <sup>b</sup>	79.73 ± 2.59 <sup>ab</sup>	86.35 ± 0.47 <sup>b</sup>	79.33 ± 1.79 <sup>ab</sup>	81.99 ± 2.27 <sup>ab</sup>	75.12 ± 2.71 <sup>a</sup>	43.1–93.7 <sup>1</sup>
Monocytes (%)	2.08 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.31 <sup>ab</sup>	2.39 ± 0.14 <sup>ab</sup>	3.00 ± 0.21 <sup>ab</sup>	3.33 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.40 ± 0.31 <sup>b</sup>	1–15.2 <sup>1</sup>
Eosinophils (%)	1.08 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.31 <sup>a</sup>	0–3.6 <sup>1</sup>
Basophils (%)	0.58 ± 0.45 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.99 <sup>a</sup>	0–3 <sup>1</sup>
RDW (%)	13.84 ± 0.99 <sup>a</sup>	14.86 ± 2.02 <sup>a</sup>	13.14 ± 0.21 <sup>a</sup>	12.80 ± 0.30 <sup>a</sup>	13.31 ± 0.17 <sup>a</sup>	15.22 ± 1.33 <sup>a</sup>	13–18.4 <sup>3</sup>

RDW: Red cell distribution width. NF—not found. Different letters on the same line indicate statistically significant differences. <sup>1</sup> Lima et al., 2014; <sup>2</sup> Lapchik, et al., 2009; <sup>3</sup> Melo et al., 2012. (Statistical test: ANOVA/Tukey  $p < 0.05$ ).

Biochemical tests demonstrated that albumin level was higher than reference values for Wistar rats (CHARLES RIVER LABORATORIES, 2008; DANTAS et al., 2006) in NFRFP and pretreatment groups. Cholesterol was lower than the reference value for the NFRFP group. HDL cholesterol was higher than the reference values in the negative control, pretreatment, and simultaneous treatment groups. Triglyceride concentrations were lower than the reference values for the NFRFP groups, pre-treatment, and simultaneous treatment. Statistical analysis showed that there were no differences among the experimental groups and the negative control group, except for the significant reduction in AST observed in the pre-treatment and post-treatment groups and for the reduction of cholesterol for the NFRFP group ( $p < 0.05$ ) (Table 4).

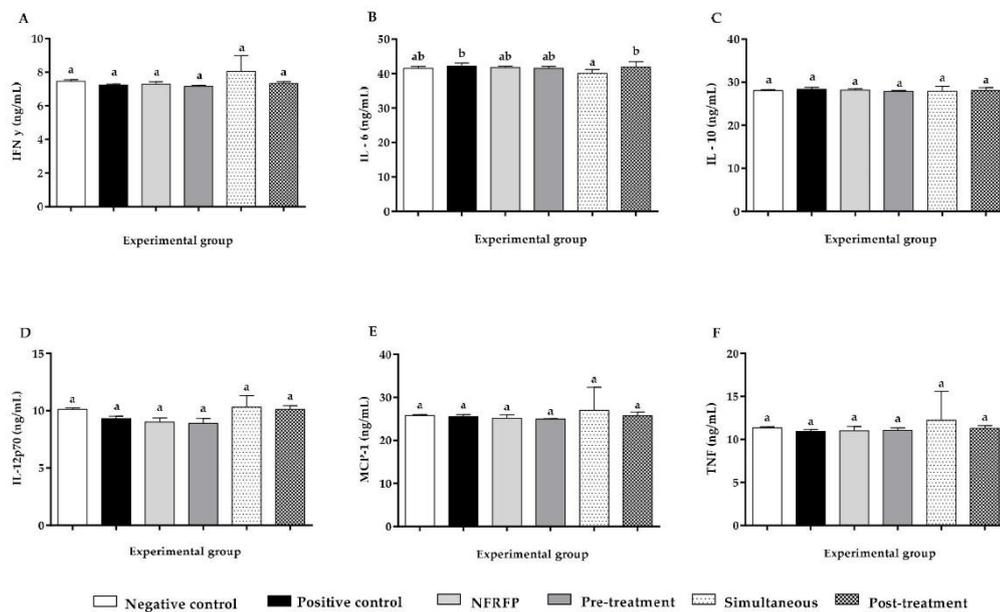
**Table 4.** Effect of consumption of Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP) on biochemical parameters in rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH).

Parameters	Experimental Groups						Reference Value
	Negative Control	Positive Control	NFRFP	Pre-Treatment	Simultaneous	Pos-Treatment	
AST (U/L) <sup>1</sup>	127.90 ± 8.89 <sup>b</sup>	108.00 ± 6.22 <sup>ab</sup>	97.08 ± 3.45 <sup>a</sup>	110.80 ± 9.10 <sup>ab</sup>	111.50 ± 5.63 <sup>ab</sup>	89.45 ± 4.56 <sup>a</sup>	18–267 <sup>a</sup>
ALT (U/L) <sup>1</sup>	45.50 ± 3.52 <sup>a</sup>	54.48 ± 4.75 <sup>a</sup>	42.29 ± 2.94 <sup>a</sup>	57.33 ± 5.15 <sup>a</sup>	58.29 ± 5.56 <sup>a</sup>	46.27 ± 4.21 <sup>a</sup>	34–83 <sup>a</sup>
Total protein (g/dL) <sup>1</sup>	6.26 ± 0.15 <sup>a</sup>	5.91 ± 0.27 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.39 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.25 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.14 ± 0.19 <sup>a</sup>	5.5–10.4 <sup>b</sup>
Albumine (g/dL) <sup>2</sup>	4.19 ± 0.09 <sup>ab</sup>	3.85 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.11 <sup>ab</sup>	4.34 ± 0.05 <sup>ab</sup>	4.19 ± 0.11 <sup>ab</sup>	4.11 ± 0.18 <sup>b</sup>	3.5–4.2 <sup>a</sup>
Serum urea (mg/dL) <sup>1</sup>	40.40 ± 1.31 <sup>a</sup>	38.23 ± 1.39 <sup>a</sup>	39.15 ± 1.86 <sup>a</sup>	39.95 ± 1.46 <sup>a</sup>	39.61 ± 2.46 <sup>a</sup>	36.56 ± 1.69 <sup>a</sup>	26–58 <sup>c</sup>
Creatinine (mg/dL) <sup>1</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.24–1.2 <sup>b</sup>
Uric acid (mg/dL) <sup>1</sup>	2.04 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.13 <sup>a</sup>	1–3.2 <sup>b</sup>
Glycose (mg/dL) <sup>1</sup>	133.0 ± 10.83 <sup>a</sup>	109.7 ± 8.01 <sup>a</sup>	124.3 ± 6.96 <sup>a</sup>	121.6 ± 7.58 <sup>a</sup>	129.2 ± 10.08 <sup>a</sup>	119.5 ± 7.27 <sup>a</sup>	72–193 <sup>b</sup>
α-amylase (U/L) <sup>1</sup>	1972 ± 87.57 <sup>a</sup>	2110 ± 74.16 <sup>a</sup>	1968 ± 75.71 <sup>a</sup>	1997 ± 74.98 <sup>a</sup>	2029 ± 114.00 <sup>a</sup>	1852 ± 87.03 <sup>a</sup>	NF
Cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	68.95 ± 4.59 <sup>b</sup>	66.10 ± 3.78 <sup>ab</sup>	52.28 ± 2.69 <sup>a</sup>	70.41 ± 1.90 <sup>b</sup>	62.51 ± 4.97 <sup>ab</sup>	56.51 ± 4.53 <sup>ab</sup>	68.9–105.1 <sup>c</sup>
HDL cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	65.93 ± 4.10 <sup>ab</sup>	57.92 ± 4.92 <sup>ab</sup>	52.71 ± 2.42 <sup>a</sup>	68.92 ± 2.28 <sup>b</sup>	60.25 ± 3.97 <sup>ab</sup>	51.72 ± 3.22 <sup>a</sup>	36.6–59.4 <sup>c</sup>
Triglycerides (mg/dL) <sup>1</sup>	65.56 ± 7.93 <sup>a</sup>	96.83 ± 34.67 <sup>a</sup>	38.88 ± 3.11 <sup>a</sup>	50.51 ± 5.41 <sup>a</sup>	52.88 ± 8.44 <sup>a</sup>	65.25 ± 27.08 <sup>a</sup>	57.27–106.7 <sup>c</sup>
Lipase (U/L) <sup>2</sup>	23.64 ± 15.34 <sup>a</sup>	29.51 ± 19.36 <sup>a</sup>	10.26 ± 3.48 <sup>a</sup>	17.01 ± 10.92 <sup>a</sup>	2.99 ± 0.22 <sup>a</sup>	4.21 ± 0.91 <sup>a</sup>	NF

AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine aminotransferase; NF—not found. Different letters on the same line indicate statistically significant differences. <sup>a</sup> Charles River Laboratories, 2008; <sup>b</sup> De Lima, 2018; <sup>c</sup> Dantas et al., 2006. (Statistical Test: <sup>1</sup> ANOVA/Tukey, <sup>2</sup> Kruskal-Wallis/Dunn;  $p < 0.05$ ).

### 3.6. Quantification of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 and TNF- $\alpha$ Cytokine Expression

The evaluation of the systemic inflammatory process demonstrated that there were no variations in the concentration of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, and TNF- $\alpha$  among different experimental groups, except for IL-6 levels among positive control and post-treatment groups compared to the simultaneous group. However, none of these groups differ from the negative control (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of consumption of the Natural Fiber Rich Food Product (NFRFP) on the expression of the cytokines IFN- $\gamma$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-12p70 (D), MCP-1 (E) and TNF- $\alpha$  (F) in rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Different letters indicate statistically significant differences (Statistical Test: ANOVA/Tukey;  $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

According to the Brazilian National Health Surveillance Agency [41], high fiber content products are those containing  $\geq 6$  g/100 g. NFRFP presented 18.55 g/100 g. Therefore, it is considered a good source of fiber, representing a natural food product to be included in the human diet. The average recommended daily fiber intake for adults, of both sexes, aged 19–50 years, is 31.5 g/day [42]. Therefore, the consumption of a 50 g portion of NFRFP supplies 59.52% of the daily dietary fiber requirements.

Regarding humidity, commercial chow and chow plus 10% NFRFP were statistically different ( $p < 0.05$ ). Such a difference may have occurred due to the drying process of NFRFP chow. Elias et al. [43] reported that the moisture content is related to drying methods, binomial time/temperature, and storage period.

ANVISA [44] determines that flours might contain a maximum of 15 g/100 g of moisture, aiming to prevent the proliferation of microorganisms and increase the durability of the product. Thus, NFRFP chow displayed 7.60 g/100 g of moisture and it can be considered a flour. It was observed that the addition of NFRFP did not change the content of ashes (mineral residue), lipids, and proteins between the analyzed diets.

Regarding protein content, a food might be considered as a protein source if it presents at least 6 g of protein/100 g of prepared product or portion. Food can be considered as

high in protein as long as it contains at least 12 g of protein per 100 g of prepared product or portion [41]. Thus, NFRFP might be labeled as a high protein product and might be used a complementary ingredient in food products in order to increase protein value.

The addition of NFRFP in the diet reduced the amount of chow carbohydrates by 7.7%. This characteristic is desirable since evidence showed that diets rich in carbohydrates are responsible for the development of chronic diseases, such as obesity [45,46] and cancer [47,48]. Furthermore, NFRFP increased chow total dietary fiber by 20.94%, a desired characteristic since dietary fibers may be associated with decreased incidence of colorectal cancer. Diet fiber exerts beneficial effects such as increasing fecal volume, regulating intestinal flora, and promoting the dilution and/or adsorption of possible carcinogens [6,8,9,11].

Another interesting fact is that the addition of NFRFP to the chow did not change food intake of experimental groups. Thus, it is suggested that the product is palatable, with easy technological application in different products, as it can be incorporated without changing sensory characteristics of the final product. The absence of weight change, including absolute and relative weight of organs, also allows us to infer that NFRFP did not show signs of toxicity. No changes in hematological and biochemical parameters also suggest an absence of toxicity.

Regarding biochemical evaluation, platelet counts observed were below reference values (Lima et al., 2014) for the negative control, NFRFP, and pre-treatment groups. The RDW also presented values below the reference values [49] in the pre-treatment group, as well as the plasma triglyceride concentrations. Albumin concentration was above the reference values [50] in the NFRFP and pre-treatment groups. The same was observed for HDL cholesterol in the pretreatment and simultaneous treatment groups. Taken together, it was not possible to establish any relationship between the intake of NFRFP and concentration of platelets and HDL cholesterol since variations were also observed in the control group that did not ingest NFRFP. Thus, we infer that these findings represent normal variation in rats used in the present study.

Significant differences were observed among the control and treatment groups, such as an increase in the amount of erythrocytes in the simultaneous group; increased hematocrit in the simultaneous and post-treatment groups; increase in platelets in the simultaneous and post-treatment groups; increase of monocytes in the simultaneous and post-treatment groups; reduction of lymphocytes in the post-treatment; and reduction of AST and ALT in the pre-treatment and post-treatment groups. Those changes can be considered within the reference values, not related with NFRFP ingestion nor biologically relevant. However, it is important to notice that plasma cholesterol concentration was lower in the NFRFP group compared to the control group and below the reference value for rats [51]. Thus, we suggest that NFRFP may have a hypocholesterolemic effect if consumed for 12 consecutive weeks. This conclusion is corroborated by findings in the post-treatment group, who ingested NFRFP for seven weeks and presented a tendency towards reducing plasma cholesterol concentration, and in pre-treatment and simultaneous treatment groups that presented no changes in cholesterol concentration after ingestion of NFRFP for two weeks.

Dietary fibers can reduce cholesterol by increasing intestinal transit, which prevents part of the absorption of fats [52], by assisting the capture of lipids that are more easily integrated into the fecal bolus [52,53], and by producing important metabolites such as short-chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate) [54,55] after fermentation by specific groups of bacteria, such as lactobacilli and bifidobacteria [56]. The main short-chain fatty acid is butyrate, which is responsible for colonocyte nutrition and exhibits anticarcinogenic and anti-inflammatory potential. Butyrate acts on the intestinal epithelial barrier and modulates oxidative stress [54,57,58]. In addition, according to Anderson et al. [59], short-chain fatty acids, mainly propionic acid, decrease cholesterol synthesis in the liver, leading to cholesterol reduction in the bloodstream. Thus, we infer that the presented mechanism is implied in the hypocholesterolemic action of NFRFP for 12 weeks.

Despite the statistical analysis showing that the positive controls caused DNA damage in the comet assay (% tail DNA) and micronucleus tests, the values found have no biological

relevance. This can be explained by the fact that DHM is a compound with low initiation and associated with strong promotion of colorectal carcinogenesis [60,61]. Another fact that can explain this finding is that the spleen of rats is very proficient in sequestering cells with DNA damage (genomic damage—comet; chromosomal damage—micronuclei) [62] compared to mice, for example. These data are corroborated by studies carried out with mice that demonstrated that DMH was capable of causing genotoxic damage [10,11,14,19,24]. The study by Pesarini et al. [10] demonstrated that DMH (30 mg/Kg) caused an average frequency of  $99.60 \pm 0.22$  injured cells for every 100 cells analyzed. The micronucleus frequency in this same study was  $28.20 \pm 0.75$  in every 2000 cells analyzed. Thus, we infer that the detection of DNA damage can vary according to the experimental model used to induce aberrant crypts as well as the dose of DMH used. We suggest that genotoxic damage can be better evaluated in studies with mice. However, the rat model is the best for evaluating aberrant crypt foci.

These results were already expected by our research group. Thus, to avoid doubts as to whether the techniques were well standardized, we simultaneously treated a negative control group and a positive control group with DHM, in the Swiss mouse model (data not shown) and ran the slides together with the slides of the present study. In Swiss mice, the frequency of genetic damage in the positive control was at least  $2\times$  more than the frequency of the negative control, a condition necessary for a compound to be considered positive [24,63,64]. This fact may occur because, according to Rabello-gay et al. [65], the spleen of rats and humans are more efficient at sequestering cells with DNA damage compared to the capacity of mice. Therefore, this may be the explanation for the lesions being observed in mouse models and not in rats.

Despite the low capacity of DMH to induce detectable DNA damage measured by comet and micronucleus techniques, this compound was an efficient promoter of intestinal chemical carcinogenesis since it increased the frequency of aberrant crypt foci in Wistar rats by  $72.8\times$ . The frequency of foci in the negative control group and NFRFP did not differ, which reinforces the safety of using this compound in the diet. In addition, NFRFP was able to significantly reduce the frequency of aberrant crypt foci in the post-treatment group (% DR = 49.36). Furthermore, a tendency was found in reducing lesions in the pre-treatment and simultaneous treatment groups with % DR rates of 25.18 and 32.31. Despite the absence of significant differences, these values are interesting in the cancer prevention context and can be reevaluated in other studies, including other experimental models.

The pre-treatment and simultaneous treatment protocols are indicative of which substances can act by desmutagenesis, meaning a compound or products of its metabolism that can act directly on the damage inducer by chelation or enzymatic inactivation [10,11,19,24,27–29,66,67]. This mechanism is described for different foods or food components [10,11,14,19,21,24–26,28] and fibers [10,11,14,19,20,24,26,29]. The post-treatment protocol, on the other hand, allows the evaluation of compounds with bioantimutagenic actions that are capable of modulating repair enzymes favoring the correction of DNA damage [27–30,68].

NFRFP acts by bioantimutagenesis since it prevented the occurrence of aberrant crypts foci in the post-treatment protocol. In this case, the crypts were induced for two consecutive weeks, with applications of DMH, and, at the end of the induction, animals started receiving NFRFP. This result suggests that this compound or its metabolites are capable of modulating cellular repair machinery in order to reverse DNA damage and, even partially, the development of aberrant colorectal cancer foci crypts. Thus, we demonstrate the pioneering and original nature of the NFRFP.

Fiber-rich compounds, such as NFRFP, can exhibit chemopreventive effect. The chemopreventive properties of dietary compounds involve multiple molecular and biochemical mechanisms that lead to the inhibition of cell growth, tumor initiation, adhesion, migration, angiogenesis, apoptosis, interaction with the intestinal microbiota, regulation of cell signal transduction pathways and xenobiotic metabolizing enzymes [69]. Thus, it is inferred that NFRFP can act in this line by promoting the prevention, suppression, or reversal of carcinogenesis in its early stages.

It is known that ACF are induced by an inflammatory response. In summary, DMH is hydrolyzed in the liver to produce methylazoxymethane, which conjugates with  $\beta$ -glucuronic acid and is carried to the intestinal lumen. In the intestinal lumen, bacterial  $\beta$ -glucuronidase releases the active metabolite of DMH, azoxymethane [70]. This metabolite triggers a mild inflammatory reaction that increases cell proliferation in the colon mucosa. When administered chronically, this drug leads to continuous proliferation and the induction of GC  $\rightarrow$  AT transitions in genes, such as  $\beta$ -catenin and Kras, triggering the induction of colorectal carcinogenesis [71].

Based on the previous concept, the profile of some cytokines that are involved in the inflammatory process and its resolution, cell proliferation, and differentiation were evaluated. However, our results showed that, according to the present protocol, cancer induction with DMH and/or NFRFP consumption does not modify serum concentrations of IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, and TNF- $\alpha$ . The consulted literature presented few data that correlated the cytokine dosage in this model of induction of aberrant crypt foci by DMF. However, Li et al. [72] demonstrated that germinated brown rice is capable of reducing IL-6 (<0.25 ng/mL) and TNF- $\alpha$  (<0.35 ng/mL), in contrast with the findings of the present study. Thus, further research might clarify these observations.

Taking into account the benefits of NFRFP, we believe that it might be of industrial interest by adding fiber sources to foods and beverages without modifying or causing major modifications to the organoleptic characteristics, with potential use for healthy individuals and for those affected by colorectal cancer. In addition, NFRFP presents a low cost and is derived from foods already part of the human diet.

## 5. Conclusions

NFRFP does not cause toxicity and/or genotoxicity/carcinogenicity, nor changes in the biochemical, hematological, and inflammatory profiles (isolated or in association with DMH), except for the reduction of cholesterol when consumed for at least 12 consecutive weeks. This formulation presented a chemopreventive effect and reduced the progression of aberrant crypt foci in the post-treatment protocol. These results open avenues to studying the applicability of NFRFP in the human diet due to the possibility of production on an industrial scale and easy technological application in different products. NFRFP can be incorporated into food without altering sensory characteristics of the final product.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13082708/s1>, Figure S1: Average food intake (g) of different experimental groups over twelve weeks. NFRFP—Natural Fiber-Rich Food Product. Table S1: Effect of consumption of the Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP) on the weight development of animals submitted to different treatment protocols.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.A.d.A. and R.J.O.; data curation, T.d.S.F.d.A., G.H.O.d.S., A.B., E.F.d.S. and R.J.O.; formal analysis, L.A.d.A.; investigation, L.A.d.A. and R.J.O.; methodology, L.A.d.A., R.S.M. and F.F.B.J.; project administration, R.J.O.; resources, A.C.D.M., C.A.L.K., A.C.M.B.A.-S. and R.J.O.; software, A.B.; supervision, E.F.d.S. and R.J.O.; writing—original draft, L.A.d.A. and T.d.S.F.d.A.; writing—review & editing, B.P.M.R., E.F.d.S. and R.J.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The Foundation of Support for the Development of Education, Science and Technology of the state of Mato Grosso do Sul (FUNDECT/PRONEM), grant number 076/2015. To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) by the Productivity Fellowships, number: 311281/2016-8 and 310923/2017-4. The Coordination of Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES)—Finance Code 001 and support from Federal University of Mato Grosso of the South (UFMS).

**Institutional Review Board Statement:** The experiment was carried out in accordance with the Ethical Principles in Animal Research and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Mato Grosso do Sul under opinion n $^{\circ}$  1000/2018.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The Foundation of Support for the Development of Education, Science and Technology of the state of Mato Grosso do Sul (FUNDECT), to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES) and support from Federal University of Mato Grosso of the South (UFMS).

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

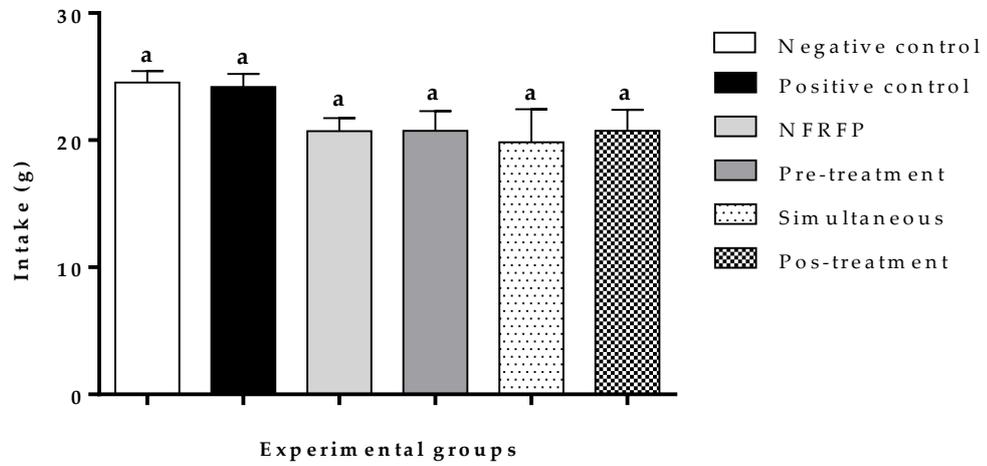
## References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; 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*, 394–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, S.Y.; Boushey, C.J.; Wilkens, L.R.; Haiman, C.A.; Le Marchand, L. High-Quality Diets Associate With Reduced Risk of Colorectal Cancer: Analyses of Diet Quality Indexes in the Multiethnic Cohort. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 386–394.e2. [\[CrossRef\]](#)
- Farinetti, A.; Zurlo, V.; Manenti, A.; Coppi, F.; Mattioli, A.V. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition* **2017**, *43–44*, 83–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hold, G.L. Gastrointestinal Microbiota and Colon Cancer. *Dig. Dis.* **2016**, *34*, 244–250. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Haslam, A.; Robb, S.W.; Hébert, J.R.; Huang, H.; Ebell, M.H. Greater adherence to a Mediterranean diet is associated with lower prevalence of colorectal adenomas in men of all races. *Nutr. Res.* **2017**, *48*, 76–84. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lattimer, J.M.; Haub, M.D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* **2010**, *2*, 1266–1289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sivaprakasam, S.; Prasad, P.D.; Singh, N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* **2016**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dai, F.J.; Chau, C.F. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *J. Food Drug Anal.* **2017**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dhingra, D.; Michael, M.; Rajput, H.; Patil, R.T. Dietary fibre in foods: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2012**. [\[CrossRef\]](#)
- Pesarini, J.R.; Zaninetti, P.T.; Mauro, M.O.; Carreira, C.M.; Dichi, J.B.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S.; Oliveira, R.J. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 1646–1659. [\[CrossRef\]](#)
- Pamplona-Silva, M.T.; Morandi, W.V.; Bernardi, L.; Tura, B.B.; de Oliveira, D.D.M.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; de Oliveira Mauro, M.; Oliveira, R. Brown Flaxseed Prevents DNA Damage Induced by 1,2-Dimethylhydrazine in a Pre-Clinical Model. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2018**. [\[CrossRef\]](#)
- Tamargo, A.; Cueva, C.; Laguna, L.; Moreno-Arribas, M.V.; Muñoz, L.A. Understanding the impact of chia seed mucilage on human gut microbiota by using the dynamic gastrointestinal model simgi®. *J. Funct. Foods* **2018**, *50*, 104–111. [\[CrossRef\]](#)
- Haenen, D.; Zhang, J.; Souza da Silva, C.; Bosch, G.; van der Meer, I.M.; van Arkel, J.; van den Borne, J.J.G.C.; Pérez Gutiérrez, O.; Smidt, H.; Kemp, B.; et al. A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine. *J. Nutr.* **2013**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Navarro, S.D.; Mauro, M.O.; Pesarini, J.R.; Ogo, F.M.; Oliveira, R.J. Resistant starch: A functional food that prevents DNA damage and chemical carcinogenesis. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 1679–1691. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, B.; Lin, Q.; Yang, T.; Zeng, L.; Shi, L.; Chen, Y.; Luo, F. Oat  $\beta$ -glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice. *Food Funct.* **2015**, *6*, 3454–3463. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, W.; Zhang, Y.; Qiu, B.; Fan, S.; Ding, H.; Liu, Z. Quinoa whole grain diet compromises the changes of gut microbiota and colonic colitis induced by dextran Sulfate sodium in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14916. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- An, C.; Kuda, T.; Yazaki, T.; Takahashi, H.; Kimura, B. Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 2779–2787. [\[CrossRef\]](#)
- Park, H.S.; Goodlad, R.A.; Wright, N.A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4507–4510.
- Limeiras, S.M.A.; Oliveira, B.C.; Pessatto, L.R.; Pesarini, J.R.; Kassuya, C.A.L.; Monreal, A.C.D.; Cantero, W.B.; Antonioli-Silva, R.; Antonioli-Silva, A.C.M.B.; Oliveira, M.E.A.; et al. Effects of Moquiniastrum polymorphum ssp floccosum ethnolic extract on colorectal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16*. [\[CrossRef\]](#)
- Caetano, B.F.R.; Tablas, M.B.; Pereira, N.E.F.; de Moura, N.A.; Carvalho, R.F.; Rodrigues, M.A.M.; Barbisan, L.F. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *338*, 93–102. [\[CrossRef\]](#)
- Ramos Caetano, B.F.; Baptista Tablas, M.; Ribeiro Romualdo, G.; Marchesan Rodrigues, M.A.; Barbisan, L.F. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute responses to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. *Toxicol. Lett.* **2020**, *329*, 67–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- de Moura, N.A.; Caetano, B.F.R.; Bidinotto, L.T.; Rodrigues, M.A.M.; Barbisan, L.F. Dietary hemin promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2019**, *846*, 403076. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- de Moura, N.A.; Caetano, B.F.R.; de Moraes, L.N.; Carvalho, R.F.; Rodrigues, M.A.M.; Barbisan, L.F. Enhancement of colon carcinogenesis by the combination of indole-3 carbinol and synbiotics in hemin-fed rats. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *112*, 11–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Limeiras, S.M.A.; Ogo, F.M.; Genez, L.A.L.; Carreira, C.M.; Oliveira, E.J.T.; Pessatto, L.R.; Neves, S.C.; Pesarini, J.R.; Schweich, L.C.; Silva, R.A.; et al. Prevention of DNA damage and anticarcinogenic activity of activia® in a preclinical model. *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16*. [[CrossRef](#)]
25. Bazo, A.P.; Rodrigues, M.A.M.; Sforzin, J.M.; de Camargo, J.L.V.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, *22*, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. da Silva Almeida, A.P.; Avi, C.M.; Barbisan, L.F.; de Moura, N.A.; Caetano, B.F.R.; Romualdo, G.R.; Sivieri, K. *Yacon* (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce the early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. *Food Res. Int.* **2015**, *74*, 48–54. [[CrossRef](#)]
27. Kada, T.; Shimoi, K. Desmutagens and bio-antimutagens—Their modes of action. *BioEssays* **1987**, *7*, 113–116. [[CrossRef](#)]
28. Oliveira, R.J. *Mecanismos de Ação e Efeito Protetor de Danos no DNA do Polissacarídeo β-Glucana em Testes In Vitro e In Vivo*; Universidade Estadual de Londrina: Londrina, Brasil, 2006.
29. Oliveira, R.J.; Baise, É.; de Oliveira Mauro, M.; Pesarini, J.R.; Matuo, R.; da Silva, A.F.; Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 120–124. [[CrossRef](#)]
30. Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.; Brockman, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1990**, *238*, 57–85. [[CrossRef](#)]
31. AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*; AOAC: Rockville, MD, USA, 2011.
32. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**. [[CrossRef](#)]
33. Merrill, A.L.; Watt, B.K. Energy values of food: Basis and derivation. In *Agriculture Handbook No. 74*; Human Nutrition Research Branch, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture: Beltsville, MD, USA, 1973.
34. Navarro, S.D.; Beatriz, A.; Meza, A.; Pesarini, J.R.; Gomes, R.D.S.; Karaziack, C.B.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.D.; Romão, W.; Lacerda Júnior, V.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**. [[CrossRef](#)]
35. Navarro, S.D.; Pessatto, L.R.; Meza, A.; de Oliveira, E.J.T.; Auharek, S.A.; Vilela, L.C.; de Lima, D.P.; de Azevedo, R.B.; Kassuya, C.A.L.; Cáceres, O.I.A.; et al. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. *Life Sci.* **2018**, *209*, 300–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* **1990**. [[CrossRef](#)]
37. Bird, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* **1987**. [[CrossRef](#)]
38. 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](#)]
39. Manoharan, K.; Banerjee, M.R. β-Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**. [[CrossRef](#)]
40. Bain, B.J.; Bates, I.; Laffan, M.A.; Lewis, S.M. *Dacie and Lewis Practical Haematology*; Elsevier Health Sciences: Oxford, UK, 2016; ISBN 9780702050251.
41. ANVISA. *Dispõe sobre o Regulamento Técnico Sobre Informação Nutricional Complementar (Resolução nº 54, de 12 de Novembro de 2012)*; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ed.; Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, Brasil, 2012.
42. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2005; ISBN 030908525X.
43. Elias, M.C.; Lopes, V.; Gutkoski, L.C.; Oliveira, M.; Mazzutti, S.; Dias, A.R.G. Umidade de colheita, métodos de secagem e tempo de armazenamento na qualidade tecnológica de grãos de trigo (cv. 'Embrapa 16'). *Cienc. Rural* **2009**, *39*, 25–30. [[CrossRef](#)]
44. ANVISA. *Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos (Resolução nº 263, de 22 de Setembro de 2005)*; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ed.; Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, Brasil, 2005.
45. Seid, H.; Rosenbaum, M. Low carbohydrate and low-fat diets: What we don't know and why we should know it. *Nutrients* **2019**, *11*, 2749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Van Dam, R.M.; Seidell, J.C. Carbohydrate intake and obesity. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2007**, *61*, S75–S99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Doaei, S.; Gholamalazadeh, M.; Akbari, M.E.; Akbari, S.; Feradova, H.; Rahimzadeh, G.; Jarrahi, A.M. Dietary carbohydrate promotes cell survival in cancer via the up-regulation of fat mass and obesity-associated gene expression level. *Malays. J. Med. Sci.* **2019**, *26*, 8–17. [[CrossRef](#)]
48. Sartorius, B.; Sartorius, K.; Aldous, C.; Madiba, T.E.; Stefan, C.; Noakes, T. Carbohydrate intake, obesity, metabolic syndrome and cancer risk? A two-part systematic review and meta-analysis protocol to estimate attributability. *BMJ Open* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
49. Melo, M.G.D.; Dória, G.A.A.; Serafini, M.R.; Araújo, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci. Plena* **2014**, *10*, 2014.
50. Charles River Laboratories Wistar Rats Biochemistry. Available online: [https://www.criver.com/sites/default/files/resources/rm\\_d\\_Wistar\\_Rat.pdf](https://www.criver.com/sites/default/files/resources/rm_d_Wistar_Rat.pdf) (accessed on 8 September 2020).
51. Dantas, J.A.; Ambiel, C.R.; Cuman, R.K.N.; Baroni, S.; Bersani-Amado, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná. *Acta Sci.* **2006**, *28*, 633–636. [[CrossRef](#)]

52. Soliman, G.A. Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients* **2019**, *11*, 1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sima, P.; Vannucci, L.; Vetvicka, V.  $\beta$ -glucans and cholesterol (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 1799–1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hamer, H.M.; Jonkers, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F.J.; Brummer, R.J. Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J. AOAC Int.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Roberfroid, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.* **2002**, *34*. [[CrossRef](#)]
57. Liljeberg Elmståhl, H. Resistant starch content in a selection of starchy foods on the Swedish market. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Wächtershäuser, A.; Stein, J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur. J. Nutr.* **2000**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Anderson, J.W.; Baird, P.; Davis, R.H.; Ferreri, S.; Knudtson, M.; Koraym, A.; Waters, V.; Williams, C.L. Health benefits of dietary fiber. *Nutr. Rev.* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Perše, M.; Cerar, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Serrano Campelo DE-SOUZA, A.; Andrade COSTA-CASAGRANDE, T. MODELOS ANIMAIS DE CARCINOGENESE COLOR-RETAL Animal models for colorectal cancer. *ABCD Arq Bras. Cir. Dig.* **2018**, *31*, 1369. [[CrossRef](#)]
62. Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. *Mutagênese Ambiental*; ULBRA: Rio Grande do Sul, Brazil, 2003.
63. Kirkland, D.J.; Henderson, L.; Marzin, D.; Müller, L.; Parry, J.M.; Speit, G.; Tweats, D.J.; Williams, G.M. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: An appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *588*, 88–105. [[CrossRef](#)]
64. Richards, T.C. The effects of the carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine, on turnover 3H-thymidine labeled cells from mucosal glands of mouse colon. *Anat. Rec.* **1981**, *200*, 299–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Rabello-Gay, M.; Rodrigues, M.A.L.R.; Montelone-Neto, R. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação*; Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, Brazil, 1991.
66. Ferguson, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1994**, *307*, 395–410. [[CrossRef](#)]
67. Hartman, P.E.; Shankel, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* **1990**, *15*, 145–182. [[CrossRef](#)]
68. Kada, T.; Inoue, T.; Namiki, M. Environmental mutagenesis and plant biology. In *Environmental Desmutagens and Antimutagens*; Kiekowski, E.J., Jr., Ed.; Praeger: New York, NY, USA, 1982.
69. Liskova, A.; Stefanicka, P.; Samec, M.; Smejkal, K.; Zubor, P.; Bielik, T.; Biskupska-Bodova, K.; Kwon, T.K.; Danko, J.; Büsselberg, D.; et al. Dietary phytochemicals as the potential protectors against carcinogenesis and their role in cancer chemoprevention. *Clin. Exp. Med.* **2020**, *20*, 173–190. [[CrossRef](#)]
70. LaMont, T.; Gorman, T. Experimental colon cancer. *Gastroenterology* **1978**, *75*, 1157–1169. [[CrossRef](#)]
71. Krutovskikh, V.; Turosov, V. Tumors of intestines. In *Pathology of Tumors in Laboratory Animals*; Yarc: Lyon, France, 1994.
72. Li, S.C.; Lin, H.P.; Chang, J.S.; Shih, C.K. Lactobacillus acidophilus-fermented germinated brown rice suppresses preneoplastic lesions of the colon in rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 2718. [[CrossRef](#)]

## Supplementary Materials



**Figure S1.** Average food intake (g) of different experimental groups over twelve weeks. NFRFP - Natural Fiber-Rich Food Product. Equal letters on the same line indicate absence statistically significant differences. (Statistical test: ANOVA,  $p > 0.05$ ).

**Table S1.** Effect of consumption of the Natural Fiber-Rich Food Product (NFRFP) on the weight development of animals submitted to different treatment protocols:

Experimental Groups	Negative Control	Positive Control	NFRFP	Pre-treatment	Simultaneous	Pos-treatment
N	12	11	13	10	9	9
Initial Weight 1	300.6±8.00 <sup>a</sup>	301±9.14 <sup>a</sup>	304.3±7.88 <sup>a</sup>	306.2±8.91 <sup>a</sup>	300.7±8.19 <sup>a</sup>	306.9±9.62 <sup>a</sup>
Final weight <sup>1</sup>	426.8±14.83 <sup>a</sup>	414.5±10.14 <sup>a</sup>	437.8±8.19 <sup>a</sup>	428.6±13.15 <sup>a</sup>	411.9±17.13 <sup>a</sup>	417.6±10.1 <sup>2a</sup>
Weight gain <sup>1</sup>	126.2±19.09 <sup>a</sup>	113.5±15.47 <sup>a</sup>	133.5±11.88 <sup>a</sup>	119.0±16.81 <sup>a</sup>	111.2±15.86 <sup>a</sup>	110.7±13.6 <sup>8a</sup>
Absolute weight						
Heart <sup>1</sup>	1.14±0.05 <sup>a</sup>	1.14±0.03 <sup>a</sup>	1.15±0.03 <sup>a</sup>	1.14±0.05 <sup>a</sup>	1.19±0.05 <sup>a</sup>	1.17±0.03 <sup>a</sup>
Lungs <sup>1</sup>	1.70±0.07 <sup>ab</sup>	1.71±0.05 <sup>ab</sup>	1.72±0.05 <sup>ab</sup>	1.64±0.07 <sup>a</sup>	1.62±0.05 <sup>a</sup>	1.93±0.07 <sup>b</sup>
Liver <sup>1</sup>	13.20±0.47 <sup>a</sup>	14.29±0.82 <sup>a</sup>	14.17±0.35 <sup>a</sup>	13.81±0.50 <sup>a</sup>	13.92±0.87 <sup>a</sup>	13.64±0.67 <sup>a</sup>
Spleen <sup>2</sup>	0.75±0.06 <sup>a</sup>	0.98±0.26 <sup>a</sup>	0.77±0.03 <sup>a</sup>	0.74±0.04 <sup>a</sup>	0.83±0.10 <sup>a</sup>	0.96±0.25 <sup>a</sup>
Kidneys <sup>2</sup>	2.88±0.12 <sup>a</sup>	2.94±0.08 <sup>a</sup>	3.05±0.08 <sup>a</sup>	2.93±0.12 <sup>a</sup>	2.85±0.17 <sup>a</sup>	3.32±0.66 <sup>a</sup>
Right epididymis <sup>1</sup>	0.42±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.13 <sup>a</sup>	0.50±0.04 <sup>a</sup>	0.48±0.05 <sup>a</sup>	0.58±0.10 <sup>a</sup>	0.49±0.04 <sup>a</sup>
Right testicle <sup>1</sup>	1.72±0.07 <sup>a</sup>	1.53±0.12 <sup>a</sup>	1.74±0.03 <sup>a</sup>	1.68±0.06 <sup>a</sup>	1.51±0.16 <sup>a</sup>	1.59±0.05 <sup>a</sup>
Relative weight						
Liver <sup>1</sup>	3.10±0.05 <sup>a</sup>	3.51±0.31 <sup>a</sup>	3.24±0.05 <sup>a</sup>	3.25±0.06 <sup>a</sup>	3.38±0.14 <sup>a</sup>	3.27±0.15 <sup>a</sup>
Heart <sup>1</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>
Lungs <sup>1</sup>	0.40±0.02 <sup>ab</sup>	0.42±0.02 <sup>ab</sup>	0.39±0.01 <sup>a</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	0.39±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>b</sup>
Kidneys <sup>2</sup>	0.67±0.01 <sup>a</sup>	0.71±0.02 <sup>a</sup>	0.70±0.01 <sup>a</sup>	0.69±0.02 <sup>a</sup>	0.69±0.02 <sup>a</sup>	0.79±0.15 <sup>a</sup>
Spleen <sup>2</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.25±0.08 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.03 <sup>a</sup>	0.23±0.06 <sup>a</sup>
Right epididymis <sup>1</sup>	0.43±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.13 <sup>a</sup>	0.50±0.04 <sup>a</sup>	0.48±0.05 <sup>a</sup>	0.58±0.10 <sup>a</sup>	0.49±0.04 <sup>a</sup>
Right testicle <sup>1</sup>	1.85±0.38 <sup>a</sup>	1.785±0.49 <sup>a</sup>	1.43±0.12 <sup>a</sup>	1.69±0.24 <sup>a</sup>	1.57±0.31 <sup>a</sup>	1.66±0.22 <sup>a</sup>

NFRFP - Natural Food Product Rich in Fiber. Different letters on the same line indicate statistically significant differences (Statistical Test: 1ANOVA / Tukey, 2Kruskal-Wallis / Dunn,  $p > 0.05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, permite-se concluir que:

- 1) O PANRiF é uma boa fonte de fibras e proteínas que pode ser inserido na dieta, agregando valor nutricional.
- 2) O PANRiF não causa toxicidade e/ou genotoxicidade/carcinogenicidade, nem alterações nos perfis bioquímico, hematológico e inflamatório (isolado ou associado ao DMH), exceto pela redução do colesterol quando consumido por pelo menos 12 semanas consecutivas em ratos.
- 3) Esta formulação apresentou efeito quimiopreventivo e reduziu a progressão de focos de criptas aberrantes no protocolo pós-tratamento.
- 4) Esses resultados abrem caminhos para estudar a aplicabilidade do PANRiF na dieta humana devido à possibilidade de produção em escala industrial e fácil aplicação tecnológica em diferentes produtos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. V. DE; CAMARGO, M. R. DE; RUSSO, E.; AMEDEI, A. Role of diet and gut microbiota on Colorectal cancer immunomodulation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 151–162, 2019.
- AN, C.; KUDA, T.; YAZAKI, T.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2779–2787, 2014.
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097, 2008.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 2011.
- BAIN, B. J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A.; LEWIS, S. M. **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Elsevier Health Sciences UK, 2016.
- BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. **Cancer Letters**, 1987.
- BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*. **Anais...** v. 112–113, p.395–402, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, 1959.
- BORGES, A. DE M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. DE. Caracterização da farinha de banana verde. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 333–339, 2009.
- BRADBURY, K. E.; APPLEBY, P. N.; KEY, T. J. Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **The American journal of clinical nutrition**, v. 100 Suppl, n. SUPPL. 1, 2014.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; 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**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CAETANO, B. F. R.; TABLAS, M. B.; PEREIRA, N. E. F.; et al. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 338, p. 93–102, 2018.
- CHEN, T.; CHEN, D.; TIAN, G.; et al. Soluble Fiber and Insoluble Fiber Regulate Colonic Microbiota and Barrier Function in a Piglet Model. **BioMed Research International**, 2019.
- CHIU, H.-F.; HAN, Y.-C.; SHEN, Y.-C.; et al. Chemopreventive and Chemotherapeutic Effect of Propolis and Its Constituents: A Mini-review. **Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 2, p. 70–78, 2020.
- DAI, F. J.; CHAU, C. F. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2017.
- DE-SOUZA, A. S. C.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. ANIMAL MODELS FOR COLORECTAL CANCER. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 31, n. 2, p. 1369, 2018.
- DHINGRA, D.; MICHAEL, M.; RAJPUT, H.; PATIL, R. T. Dietary fibre in foods: A review. **Journal of Food Science and Technology**, 2012.
- DONOHUE, D. R.; COLLINS, L. B.; WALI, A.; et al. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. **Molecular cell**, v. 48, n. 4, p. 612–626, 2012.
- FERNÁNDEZ, J.; LEDESMA, E.; MONTE, J.; et al. Traditional Processed Meat Products

- Re-designed Towards Inulin-rich Functional Foods Reduce Polyps in Two Colorectal Cancer Animal Models. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- FUKUYAMA, T.; ICHIKI, Y.; YAMADA, S.; et al. Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro. **Cancer science**, v. 98, n. 7, p. 1048–1054, 2007.
- GIANFREDI, V.; MORETTI, M.; NUCCI, D.; REALDON, S. Is dietary fibre truly protective against colon cancer? A systematic review and meta-analysis. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 69, n. 8, p. 904–915, 2018.
- GIBNEY, M. J.; LANHAM-NEW, S. A.; CASSIDY, A.; VORSTER, H. H. **Introduction to Human Nutrition Second Edition Edited on behalf of The Nutrition Society** by. Singapore: Wiley-BrackWell, 2009.
- GUERRIERO, J. L. Macrophages: The Road Less Traveled, Changing Anticancer Therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 24, n. 5, p. 472–489, 2018.
- HAENEN, D.; ZHANG, J.; SOUZA DA SILVA, C.; et al. A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine. **The Journal of Nutrition**, 2013.
- HAN, R.; SUN, Q.; WU, J.; ZHENG, P.; ZHAO, G. Sodium Butyrate Upregulates miR-203 Expression to Exert Anti-Proliferation Effect on Colorectal Cancer Cells. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1919–1929, 2016.
- HASLAM, A.; WAGNER ROBB, S.; HÉBERT, J. R.; et al. The association between Dietary Inflammatory Index scores and the prevalence of colorectal adenoma. **Public health nutrition**, v. 20, n. 9, p. 1609–1616, 2017.
- HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, 1990.
- HU, S.; LIU, L.; CHANG, E. .; WANG, J. .; RAUFMAN, J. . Butyrate inhibits pro-proliferative miR-92a by diminishing c-Myc-induced miR-17-92a cluster transcription in human colon cancer cells. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, 2015.
- HULLINGS, A. G.; SINHA, R.; LIAO, L. M.; et al. Whole grain and dietary fiber intake and risk of colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 112, n. 3, p. 603–912, 2020.
- INCA. O que é câncer? . Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 12/8/2021.
- INCA. Estatísticas de câncer: Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 28/6/2021a.
- INCA. Tendência de aumento do número de casos de câncer de intestino exige estratégias de prevenção. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/noticias/tendencia-de-aumento-do-numero-de-casos-de-cancer-de-intestino-exige-estrategias-de>>. .
- INCA. Tipos de câncer: Câncer de intestino. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>>. Acesso em: 28/6/2021c.
- INCA. Como surge o câncer? . Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 12/8/2021d.
- JESS, T.; RUNGOE, C.; PEYRIN-BIROULET, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 10, n. 6, p. 639–645, 2012.
- KAIKO, G. .; RYU, S. .; KOUES, O. .; et al. The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1708–1720, 2016.
- KATONA, B. W.; WEISS, J. M. Chemoprevention of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**,

v. 158, n. 2, p. 368, 2020.

LATTIMER, J. M.; HAUB, M. D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. **Nutrients**, 2010.

LI, Q.; DING, C.; MENG, T.; et al. Butyrate suppresses motility of colorectal cancer cells via deactivating Akt/ERK signaling in histone deacetylase dependent manner. **Journal of pharmacological sciences**, v. 135, n. 4, p. 148–155, 2017.

LI, S. C.; LIN, H. P.; CHANG, J. S.; SHIH, C. K. Lactobacillus acidophilus-fermented germinated brown rice suppresses preneoplastic lesions of the colon in rats. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2019.

LI, Y.-H.; NIU, Y.-B.; SUN, Y.; et al. Role of phytochemicals in colorectal cancer prevention. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 31, p. 9262, 2015.

LIMEIRAS, S. M. A.; OGO, F. M.; GENEZ, L. A. L.; et al. Prevention of DNA damage and anticarcinogenic activity of activia® in a preclinical model. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017.

LIMEIRAS, S. M. A.; OLIVEIRA, B. C.; PESSATTO, L. R.; et al. Effects of Moquiniastrium polymorphum ssp floccosum ethnolic extract on colorectal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017.

LIU, B.; LIN, Q.; YANG, T.; et al. Oat  $\beta$ -glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice. **Food and Function**, v. 6, n. 11, p. 3454–3463, 2015.

LIU, W.; ZHANG, Y.; QIU, B.; et al. Quinoa whole grain diet compromises the changes of gut microbiota and colonic colitis induced by dextran Sulfate sodium in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

LUNN, J.; BUTTRISS, J. L. Carbohydrates and dietary fibre. **Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 21–64, 2007.

LUO, W. .; FANG, Y. .; LU, M. .; et al. High consumption of vegetable and fruit colour groups is inversely associated with the risk of colorectal cancer: a case-control study. **The British journal of nutrition**, v. 113, n. 7, p. 1129–1138, 2015.

MACHADO, V. F.; FEITOSA, M. R.; ROCHA, J. J. R. DA; FÉRES, O. A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. **Journal of Coloproctology**, 1. Jan. 2016.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, 1985.

MCCRACKEN, K.; PHILLIPS, D. R. Demographic and Epidemiological Transition. **International Encyclopedia of Geography: People, the Earth, Environment and Technology**. p.1–8, 2017.

MENEZES, E. W. DE; GIUNTINI, E. B.; DAN, M. C. T.; SARDÁ, F. A. H.; LAJOLO, F. M. Codex dietary fibre definition – Justification for inclusion of carbohydrates from 3 to 9 degrees of polymerisation. **Food Chemistry**, v. 140, n. 3, p. 581–585, 2013.

MERRILL, A. L.; WATT, B. K. Energy Values of Food: Basis and Derivation. **Agricultural Handbook No. 74**, 1973.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CÂNDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 11–20, 2009.

MOURA, N. A. DE; CAETANO, B. F. R.; BIDINOTTO, L. T.; RODRIGUES, M. A. M.; BARBISAN, L. F. Dietary hemin promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats.

**Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 846, p. 403076, 2019.

MOURA, N. A. DE; CAETANO, B. F. R.; MORAES, L. N. DE; et al. Enhancement of colon carcinogenesis by the combination of indole-3 carbinol and synbiotics in hemin-fed rats.

**Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 11–18, 2018.

NAVARRO, S. D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014.

NAVARRO, S. D.; MAURO, M. O.; PESARINI, J. R.; OGO, F. M.; OLIVEIRA, R. J. Resistant starch: A functional food that prevents DNA damage and chemical carcinogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1679–1691, 2015.

NAVARRO, S. D.; PESSATTO, L. R.; MEZA, A.; et al. Resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. **Life Sciences**, v. 209, p. 300–312, 2018.

O'KEEFE, S. J. D. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2016 13:12, v. 13, n. 12, p. 691–706, 2016.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; MORANDI, W. V.; BERNARDI, L.; et al. Brown Flaxseed Prevents DNA Damage Induced by 1,2-Dimethylhydrazine in a Pre-Clinical Model. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2018.

PARK, H. S.; GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. **Cancer Research**, v. 57, n. 20, p. 4507–4510, 1997.

PARK, S. Y.; BOUSHEY, C. J.; WILKENS, L. R.; HAIMAN, C. A.; MARCHAND, L. LE. High-Quality Diets Associate With Reduced Risk of Colorectal Cancer: Analyses of Diet Quality Indexes in the Multiethnic Cohort. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 386- 394.e2, 2017.

PESARINI, J. R.; ZANINETTI, P. T.; MAURO, M. O.; et al. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1646–1659, 2013.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional**. 6 ed. ed. Barueri: MANOLE, 2015.

RABADI, AL, L.; BERGAN, R. A Way Forward for Cancer Chemoprevention: Think Local. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 10, n. 1, p. 14–35, 2017.

RAMOS CAETANO, B. F.; BAPTISTA TABLAS, M.; RIBEIRO ROMUALDO, G.; MARCHESAN RODRIGUES, M. A.; BARBISAN, L. F. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute responses to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. **Toxicology Letters**, v. 329, p. 67–79, 2020.

RAMOS, D.; LEONEL, M.; LEONEL, S. Amido resistente em farinhas de banana verde. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, 2010.

REBELLO, C. J.; O'NEIL, C. E.; GREENWAY, F. L. Dietary fiber and satiety: the effects of oats on satiety. **Nutrition reviews**, v. 74, n. 2, p. 131–147, 2016.

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

SANG, S.; CHU, Y. F. Whole grain oats, more than just a fiber: Role of unique phytochemicals. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 7, 2017.

SHAFIE, S. R.; WANYONYI, S.; PANCHAL, S. K.; BROWN, L. Linseed Components Are More Effective Than Whole Linseed in Reversing Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 25, 2020.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**,

v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SONG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244–1260.e16, 2015.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 7, p. 537–543, 2002.

TAMARGO, A.; CUEVA, C.; LAGUNA, L.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MUÑOZ, L. A. Understanding the impact of chia seed mucilage on human gut microbiota by using the dynamic gastrointestinal model simgi®. **Journal of Functional Foods**, v. 50, p. 104–111, 2018.

TAN, J.; MCKENZIE, C.; POTAMITIS, M.; et al. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. **Advances in Immunology**, 2014.

TAO, L.; HUANG, G.; SONG, H.; CHEN, Y.; CHEN, L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. **Oncology letters**, v. 14, n. 3, p. 2611–2620, 2017.

TERZIĆ, J.; GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; KARIN, M. Inflammation and Colon Cancer. **Gastroenterology**, 2010.

THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.

UMEZAWA, S.; HIGURASHI, T.; KOMIYA, Y.; et al. Chemoprevention of colorectal cancer: Past, present, and future. **Cancer Science**, v. 110, n. 10, p. 3018, 2019.

USP. **Brazilian Food Composition Table (TBCA)**. São Paulo: Food Research Center, 2019.

WHO. Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>>. Acesso em: 28/6/2021.

WONG, J. M. W.; JENKINS, D. J. A. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 11 Suppl, 2007.

WU, X.; WU, Y.; HE, L.; et al. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 14, p. 2510, 2018.

YU, D. .; BURY, J. .; TIERNAN, J.; et al. Short-chain fatty acid level and field cancerization show opposing associations with enteroendocrine cell number and neuropilin expression in patients with colorectal adenoma. **Molecular cancer**, v. 10, 2011.

ZENG, H.; HAMLIN, S. .; SAFRATOWICH, B. .; CHENG, W. .; JOHNSON, L. . Superior inhibitory efficacy of butyrate over propionate and acetate against human colon cancer cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis: linking dietary fiber to cancer prevention. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 83, p. 63–72, 2020.

ZIELINSKI, G.; DEVRIES, J. W.; CRAIG, S. A.; BRIDGES, A. R. Dietary Fiber Methods in Codex Alimentarius: Current Status and Ongoing Discussions. , 2013.

## ANEXO A – Protocolo de aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA)

SEI/UFMS - 0881794 - Certificado

[https://sei.ufms.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir](https://sei.ufms.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir)


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação dos efeitos de um composto alimentar bioativo na prevenção do câncer colorretal e no processo inflamatório”, registrada com o nº 1.000/2018, sob a responsabilidade de **Rodrigo Juliano Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 08/11/2018.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/02/2019 a 11/02/2022
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / albinus / Wistar
Nº de animais	420
Peso/Idade	250g / 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério - UT/INBIO/UFMS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 13 de novembro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **Joice Stein, Professor do Magisterio Superior**, em 19/11/2018, às 15:18, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0881794** e o código CRC 7586A4FF.

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS