

Efecto aditivo *in vitro* de *Chlorella sorokiniana* en combinación con Vincristina sobre la inhibición del crecimiento de células de cáncer de colon HT-29

In vitro additive effect of *Chlorella sorokiniana* in combination with Vincristine on HT-29 colon cancer cells growth inhibition

Areli HERNÁNDEZ CHÁVEZ¹, Ricardo GOMEZ FLORES², Patricia TAMEZ GUERRA², Jesica María RAMÍREZ VILLALOBOS², Guadalupe GONZÁLEZ OCHOA³, Karla Selene MORAN SANTIBAÑEZ², Cristina RODRIGUEZ PADILLA², Adriana ORDOÑEZ VASQUEZ⁴, Adriana GARDUÑO ALANIS^{1,5}, César Iván ROMO SÁENZ^{1,2,6}

1 Universidad Internacional Iberoamericana, Campeche 24560, México.

2 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, México.

3 Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Navojoa 85880, México

4 Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 #40 – 62, Bogotá 111321, Colombia.

5 Centro de Investigación en Nutrición y Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, y Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología de México, México.

6 Universidad Emiliano Zapata. Avenida Rodrigo Gómez, Sector Heroico S/N, Monterrey 64260, Nuevo León, México.

Recibido: 15/agosto/2023. Aceptado: 31/octubre/2023.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de *Chlorella sorokiniana* con Vincristina contra el crecimiento de células de cáncer de colon HT-29.

Material y método: *Chlorella sorokiniana* se cultivó en medio López-Chuken. El efecto inhibitorio de la microalga sola y en combinación con Vincristina en el crecimiento tumoral se evaluó mediante la técnica de MTT, contra células de cáncer de colon humano HT-29, y se analizó mediante el software SynergyFinder 2.0.

Resultados: El crecimiento *Chlorella sorokiniana* fue constante al día 28 a una temperatura de 34 °C ± 3 °C. El efecto inhibitorio de Vincristina sobre células HT-29 fue del 60% a partir de 0.0037 µg/mL. La inhibición por *Chlorella sorokiniana* fue del 60% al 80% a las concentraciones de 10⁶-10⁸. Además, la combinación de Vincristina/*Chlorella* inhibió el crecimiento tumoral entre 70% y 90%, siendo la concentración

menor de *Chlorella* la que mostró un mejor efecto en combinación con Vincristina. El análisis de los resultados en SynergyFinder mostró un score de -0.708, determinando un efecto aditivo.

Conclusión: *Chlorella sorokiniana* presenta un efecto aditivo en combinación con Vincristina contra la línea de cáncer de colon humano HT-29. La suplementación de *C. sorokiniana* en la dieta de pacientes con cáncer de colon podría mejorar su tratamiento y por consecuencia su recuperación.

PALABRAS CLAVE

Chlorella sorokiniana, Vincristina, Cáncer de colon.

ABSTRACT

Objective: To evaluate *in vitro* the effect of the combination of *Chlorella sorokiniana* with vincristine on HT-29 colon cancer cells.

Material and method: *Chlorella sorokiniana* growth was constant on day 28 at a temperature of 34 °C ± 3 °C. *Chlorella sorokiniana* was cultured in López-Chuken medium. HT-29 cells growth inhibition by the microalga alone or in combination with vincristine was evaluated by the colorimetric reduction MTT assay, and analyzed using the SynergyFinder 2.0 software.

Correspondencia:

César Iván Romo Sáenz
cesar_ivan_romo@hotmail.com

Results: The inhibitory effect of Vincristine on HT-29 cells was 60% from 0.0037 µg/mL. Tumor cells growth inhibition by 10^6 to 10^8 *Chlorella sorokiniana* cells ranged from 60% to 80%. The combination of vincristine and *Chlorella* inhibited tumor cells growth from 70% to 90%, being the lower concentration of *Chlorella* the one that showed a better effect in combination with vincristine. The analysis of the results in SynergyFinder showed a score of -0.708, determining an additive effect.

Conclusion: *Chlorella sorokiniana* has an additive effect in combination with vincristine against the human colon cancer line HT-29. Supplementation of *C. sorokiniana* in the diet of patients with colon cancer may improve their treatment and recovery.

KEYWORDS

Chlorella sorokiniana, Vincristine, Colon cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon representa un problema de salud mundial, representando la segunda causa de muerte a nivel mundial¹. La inflamación crónica en el colon desempeña un papel importante en su desarrollo, por lo que se han estudiado diversas sustancias antiinflamatorias y antioxidantes para prevenir o tratar esta enfermedad². Actualmente, se ha documentado que la alimentación representa un punto importante en la prevención o el desarrollo del cáncer de colon, es poca la evidencia en relación al uso de prebióticos como adyuvantes en el tratamiento para el cáncer de colon, sin embargo una microbiota intestinal saludable beneficia la prognosis de esta patología³⁻⁴. *Chlorella* es un género de microalgas verdes que se han utilizado como prebióticos y por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales⁵. En particular, *C. sorokiniana* ha sido empleada como suplemento en la dieta, debido a la presencia de diversos compuestos bioactivos los cuales se han relacionado con la reducción de la inflamación del colon y su protección del daño oxidativo, presentando un efecto contra este tipo de cáncer⁶⁻⁸. Hoy por hoy, sabemos que la quimioterapia y la radioterapia son esenciales para el tratamiento de este tipo de enfermedades, sin embargo, estos se relacionan directamente en generar disbiosis en la microbiota intestinal, la cual impacta directamente en el paciente de manera negativa⁹. Con base en esto, el uso suplementario de *C. sorokiniana* durante los tratamientos quimioterapéuticos podría mejorar el estado de salud del paciente, así como generar mayor efecto en el control o eliminación de esta enfermedad. Por lo tanto, en el presente estudio, buscamos sentar las bases para futuros estudios que se enfocados en elucidar el efecto del uso de microalgas como *C. sorokiniana* como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de colon.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas

Chlorella sorokiniana fue obtenida del cepario de células del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. El crecimiento de la microalga se realizó en medio López-Chuken (KNO₃ 5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, Ca(NO₃)₂·4H₂O 6.25 mM, H₃BO₃ 46 µM, MnCl₂·4H₂O 9.15 µM, ZnSO₄·7H₂O 765 nM, CuSO₄·5H₂O 320 nM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 15 nM, FeSO₄·7H₂O 20 µM y Na₂EDTA 20 µM) a temperatura ambiente (34 °C ± 3 °C) con agitación manual cada 24 horas durante 28 días. La biomasa obtenida se lavó dos veces con PBS estéril, se suspendió en medio DMEM F12 (Life Technologies, Rockville, MD), conteniendo solución antibiótico-antimicótico al 1% (Life Technologies) y se almacenó a 4 °C hasta su uso¹⁰.

Cultivo de células tumorales

Se obtuvieron células tumorales humanas derivadas de adenocarcinoma de colon (HT-29; ATCC® HTB-38) del banco de células del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Estas células se mantuvieron en medio DMEM F12, suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; Life Technologies) y solución antibiótico-antimicótico al 1% y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂¹¹.

Evaluación del efecto citotóxico de la combinación de *C. sorokiniana* y Vincristina en células HT-29

Las células HT-29 se incubaron en placas de 96 pozos Corning® a una densidad de 10,000 células por pozo por 48 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Para la determinación del efecto citotóxico de *C. sorokiniana* sobre células HT-29, las microalgas se centrifugaron a 8000 rpm/15min, se suspendieron en medio DMEM F12/SFB 10%/ solución antibiótica-antimicótica al 1 % y se ajustaron a una concentración de entre 1x10⁶ a 1x10⁸ células/mL en un volumen final de 200 µL. Por otro lado, la Vincristina se ajustó a concentraciones de entre 0.00093 µg/mL a 0.48 µg/mL en medio DMEM F12/SFB 10%/ solución antibiótica-antimicótica al 1% en un volumen final de 200 µL. La combinación de ambos tratamientos se realizó mezclando cada concentración de *C. sorokiniana* con las diluciones de Vincristina en un volumen final de 200 µL. Las células con los diferentes tratamientos y células sin tratamiento (control de crecimiento) se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Una vez pasado el tiempo de incubación, el medio fue retirado y se realizaron dos lavados para retirar la microalga con PBS, agregando 200 µL de medio de cultivo. Posteriormente, se adicionaron 15 µL de bro-

muro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración de 5 mg/mL en cada pocillo y se incubó por 4 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ después de lo cual se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para disolver los cristales de formazán formados, mediante agitación por 5 min a temperatura ambiente. Las densidades ópticas se determinaron con un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570 nm¹¹.

Análisis de sinergia de la combinación de *C. sorokiniana* y Vincristina

La respuesta de combinación de los tratamientos se basa en la desviación de la respuesta observada y esperada, clasificándose la combinación de los tratamientos como sinérgica (es decir, el efecto de la combinación es mayor de lo esperado) o antagonista (es decir, el efecto de la combinación es menor de lo esperado). Se realizó una matriz de dosis-respuesta basándose en la concentración de los fármacos y su porcentaje de citotoxicidad. El efecto de la combinación se determinó según el puntaje obtenido por el análisis del software SynergyFinder 2.0, en donde las puntuaciones determinan el efecto obtenido¹². Los puntajes representan lo siguiente¹³:

Menos de -10: es probable que la interacción entre dos fármacos sea antagónica;

De -10 a 10: es probable que la interacción entre dos fármacos sea aditiva;

Mayor que 10: es probable que la interacción entre dos fármacos sea sinérgica.

Análisis estadísticos

Los resultados se sometieron a la prueba *t* de Student y al análisis de varianza. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento con tres experimentos independientes. Se utilizó el paquete estadístico ad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

RESULTADOS

Producción de *C. sorokiniana* en condiciones ambientales

Para obtener la mayor producción de *C. sorokiniana* se realizó por triplicado en medio López-Chuken con agitación manual cada 24 horas a temperatura ambiente en volúmenes de 400 mL. El monitoreo de la microalga se realizó mediante conteo en cámara de Neubauer durante un mes obteniendo un crecimiento de hasta 13 veces más al día 28 de la producción, a una temperatura máxima promedio de 34 °C ± 3 °C.

Inhibición del crecimiento de células HT-29 por *C. sorokiniana*

Obtenidas las microalgas, se procedió a identificar el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células de cáncer de colon humano HT-29 en un tiempo de 48 h por exposición a células de *C. sorokiniana* fue evaluado mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT a formazán. En la Figura 1 se muestra el efecto de inhibición de crecimiento de las células de cáncer de colon humano, donde las concentraciones de la microalga mostraron un efecto continuo en la inhibición del crecimiento dependiente de concentración que va un 60% a un 80%.

Curva de inhibición del crecimiento de células HT-29 por el antineoplásico Vincristina

La curva del efecto inhibitorio del antineoplásico Vincristina se realizó mediante la técnica colorimétrica de reducción de MTT a formazán durante un tiempo de exposición de las células de cáncer de colon humano HT-29 durante 48 h en un rango de concentración en dilución 1:2 a partir de 0.48 µg/mL. En la Figura 2 se muestra que a partir de la concentración de 0.00370 µg/mL en adelante el porcentaje de inhibición del crecimiento se mantuvo alrededor de un 60%.

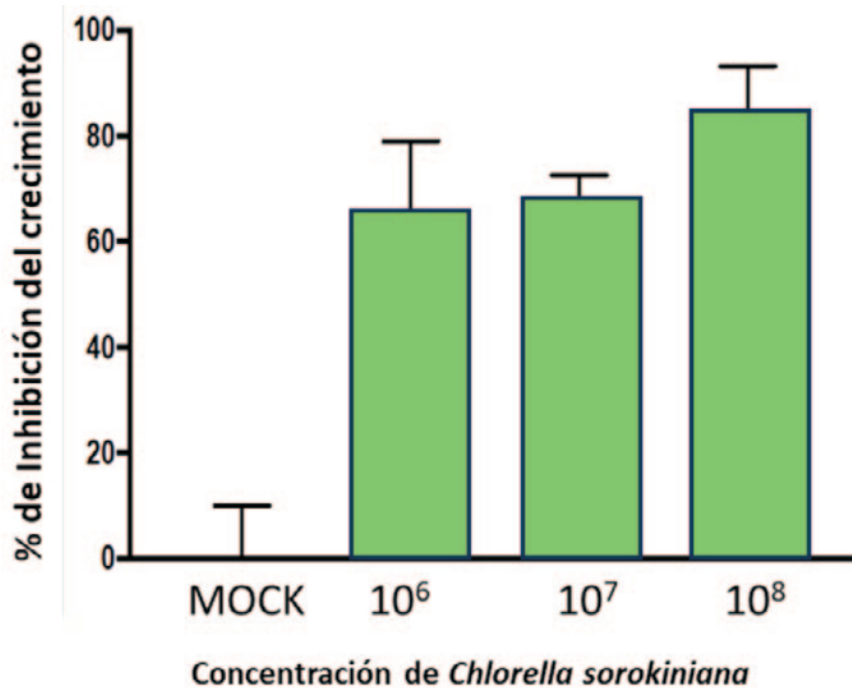
Efecto combinado de Vincristina y *C. sorokiniana* en la Inhibición del crecimiento de células HT-29

Identificado el porcentaje de inhibición en el crecimiento de las células de cáncer de colon, se procedió a mezclar las células de *C. sorokiniana* y diferentes concentraciones de la quimioterapia para observar el efecto combinado de Vincristina con *C. sorokiniana* se determinó mediante la técnica colorimétrica de MTT, combinando las concentraciones de la microalga con las diferentes concentraciones del antineoplásico durante 48 h. El efecto combinado mostró un aumento el porcentaje de inhibición del crecimiento de hasta un 90% en la concentración más baja de las células (Fig. 3). Una vez obtenidos los diferentes porcentajes de la inhibición de las diferentes combinaciones, se desarrolló una matriz combinada en el software SynergyFinder 2.0, obteniendo en el análisis un mapa de calor que mostró un score de -0.708 el cual se determinó como efecto aditivo según la escala del software (Fig. 4).

DISCUSIÓN

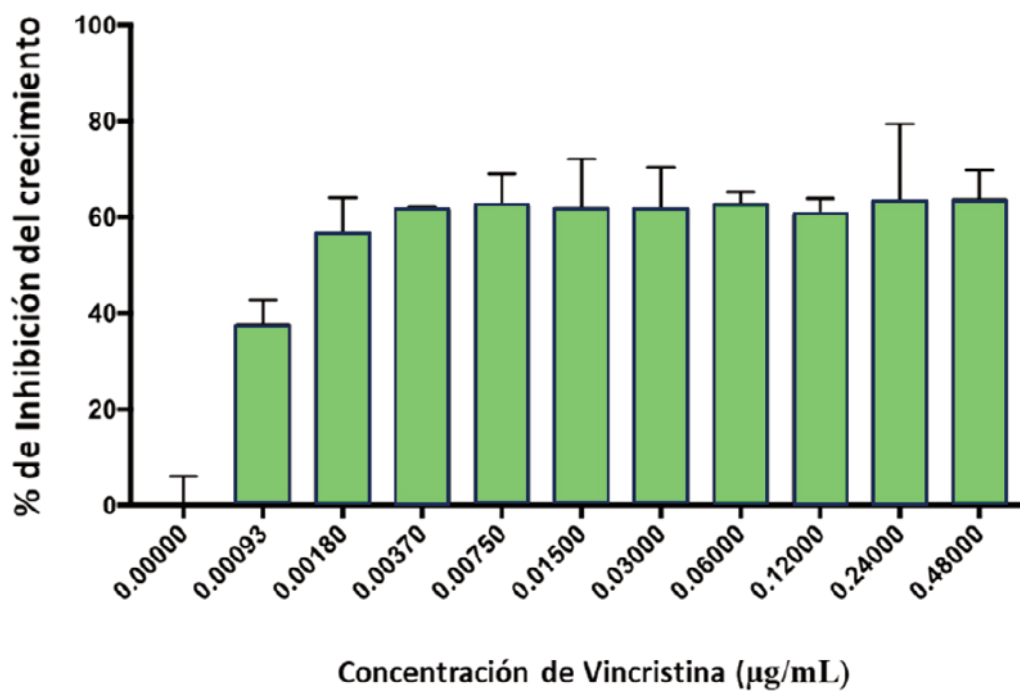
El cáncer es una enfermedad crónica de etiología multifactorial, la cual representa un problema grave en salud pública alrededor del mundo, dado que es una de las principales causas de muerte y de mayor morbilidad alrededor del mundo¹⁴⁻¹⁵.

Actualmente se estima que para el 2020 se registraron alrededor de 19.3 millones de nuevos casos de cáncer, con una tasa de mortalidad de 10 millones¹⁶. El cáncer de colon es



Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes.

Figura 1. Porcentaje de inhibición de *Clorella sorokiniana* en células de cáncer de colon HT-29



Los datos representan la media \pm SD de tres determinaciones repetidas de tres experimentos independientes.

Figura 2. Porcentaje de inhibición de Vincristina en células de cáncer de colon HT-29

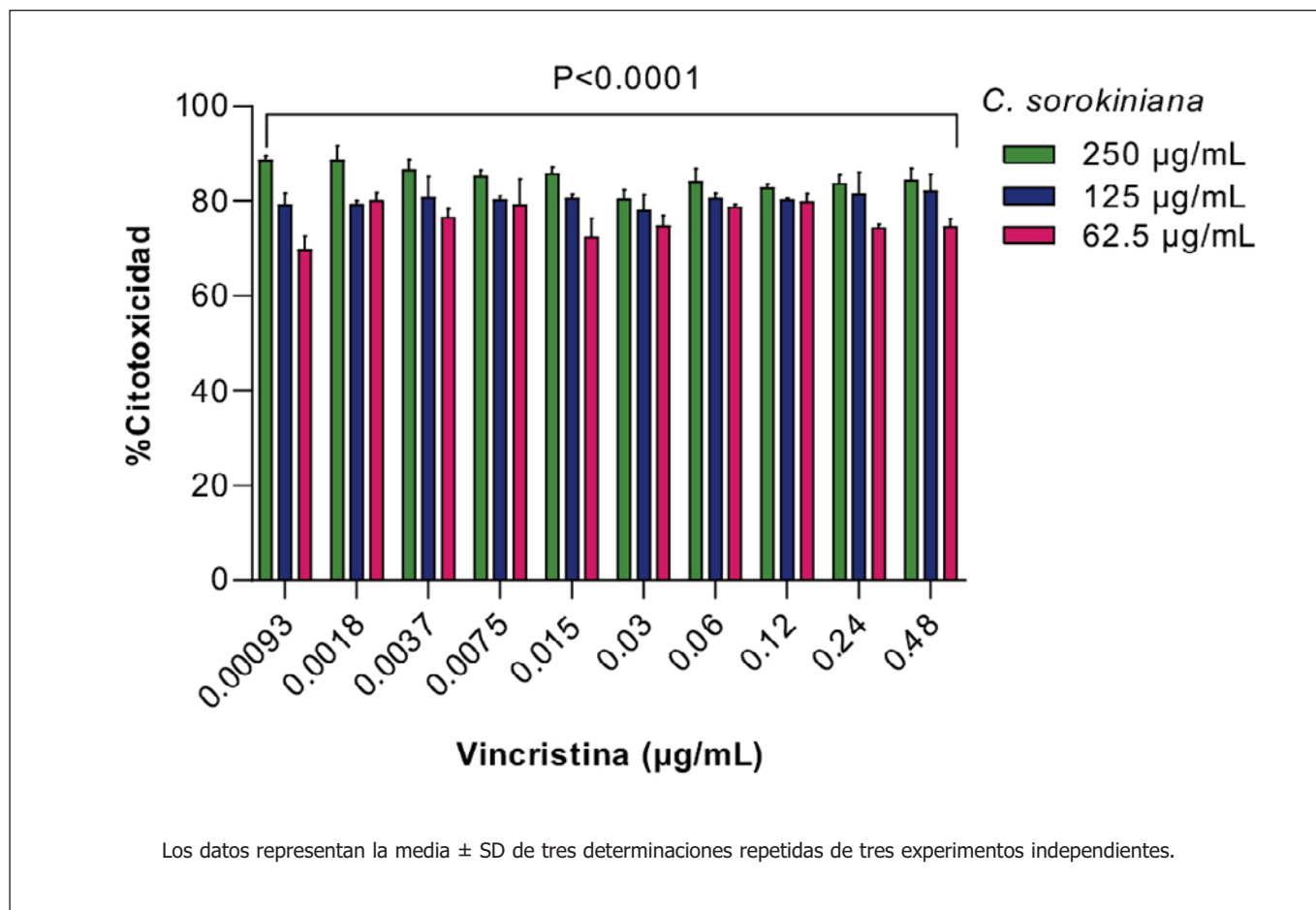


Figura 3. Porcentaje de inhibición del efecto combinado de Vincristina y *Chlorella sorokiniana* en células de cáncer de colon HT-29

diagnosticado como la tercera neoplasia de mayor frecuencia, representando la segunda causa de muerte de este tipo de enfermedades^{1,16}. Dada la naturaleza de este tipo de cáncer, se muestra una proyección de aumento considerable durante los próximos años, destacando alrededor de 1.93 millones de nuevos casos de los cuales 0.94 millones son reportados en el 2020 de muertes, esto representa alrededor de 9.4% del total de las muertes por neoplasias alrededor del mundo, identificándose según datos en los últimos años que 5.25 millones de personas viven con cáncer de colon¹⁷. Los factores de riesgo de esta neoplasia no se han identificado completamente, sin embargo, se han asociado algunos factores no modificables como la edad, sexo o factores hereditarios. No obstante, los factores modificables relacionados con el entorno del paciente han sido considerados como la principal causa del desarrollo de esta enfermedad¹⁸.

Diversos estudios demuestran que la dieta o la inflamación crónica representan un alto factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon, por lo cual los cambios en la alimentación han sido frecuentemente asociados al desarrollo y progresión de esta enfermedad¹⁹⁻²⁰.

Estudios demuestran que la quimioterapia y la radiación pueden generar efectos secundarios adversos en los pacientes, incluyendo la disbiosis en la microbiota intestinal al alterar la composición taxonómica y la capacidad metabólica. En general se ha observado una disminución en la diversidad microbiana y aumento en los géneros de bacterias patógenas oportunistas como *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Escherichia*^{21,22}.

A su vez la microbiota intestinal juega un papel muy importante en la respuesta del paciente a los tratamientos quimioterapéuticos, puede ser positiva o negativa dependiendo de la composición de la microbiota del hospedero así como del fármaco que se administre. Se sabe que son capaces de alterar la biodisponibilidad o actividad de las drogas, lo que puede disminuir el efecto del fármaco o generar subproductos tóxicos. Por otra parte, se ha reportado que son capaces de potenciar el efecto de las drogas mediante la modulación del sistema inmunológico y la liberación de especies reactivas de oxígeno. Así como ayudar a disminuir los efectos adversos de los fármacos al generar un efecto protector²³⁻²⁵.

Debido a la importancia de la microbiota en la protección contra agentes xenobióticos como los fármacos, actualmente

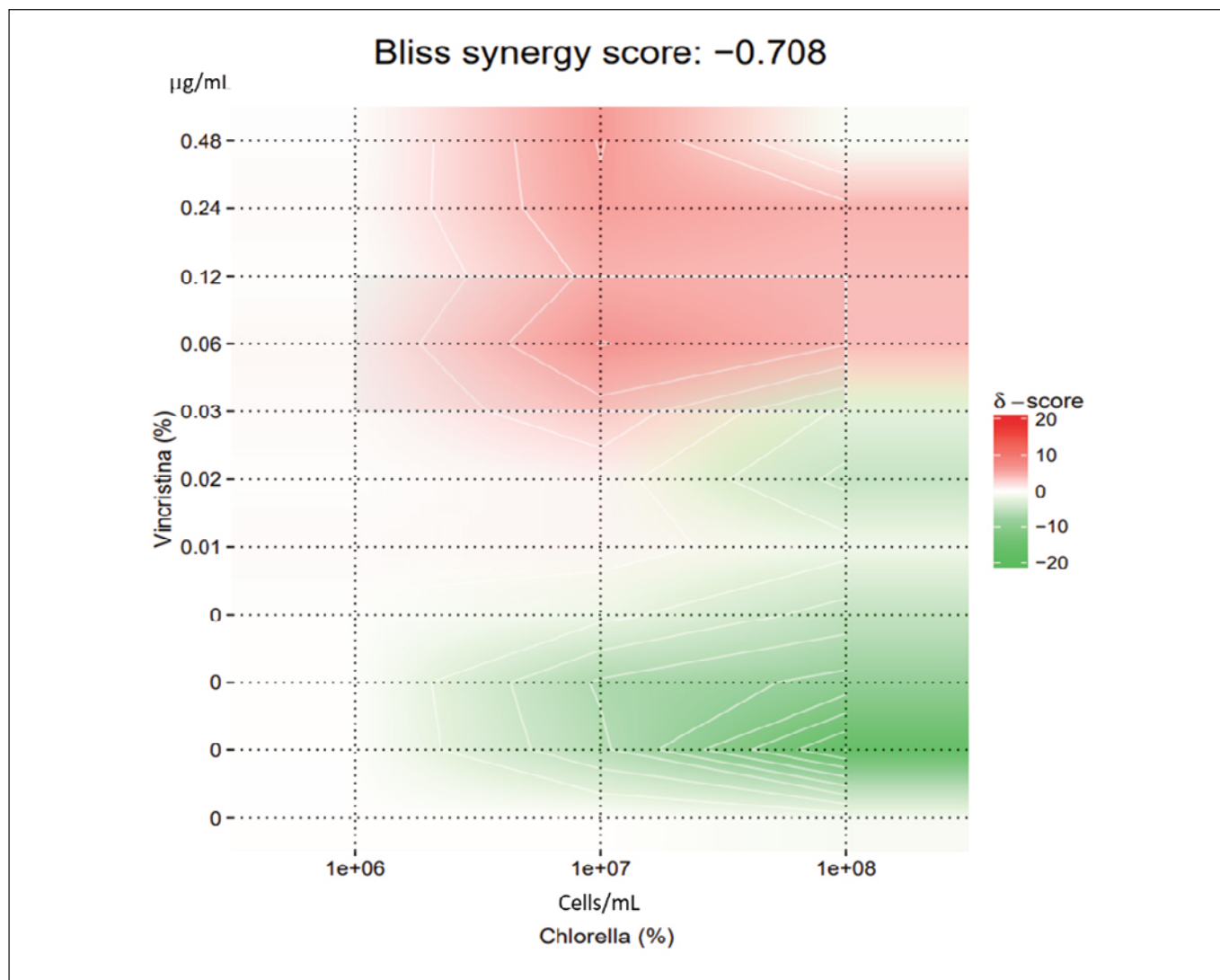


Figura 4. Mapa de sinergia 2D de la combinación del efecto en la inhibición del crecimiento de Vincristina y *C. sorokiniana* en células HT-29

se buscan tratamientos suplementarios a la quimioterapia como el uso de prebióticos que ayudan a estimular el crecimiento de los microorganismos benéficos del hospedero y que a la vez tengan efecto quimio protector para reducir los efectos adversos de las drogas²⁶. Por lo que, entre los prebióticos, las microalgas se han destacado como suplemento alimenticio por poseer diferentes funciones. Además de ser excelentes por ser fuente de fibra fermentable para los microorganismos intestinales, poseen una amplia gama de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antiobesidad, hipocolesterolémicas, anticancerígenas y quimio protectores²⁷.

Entre los géneros de microalgas más utilizados como suplemento alimenticio se encuentra el género *Chlorella*, el cual se ha reportado con actividad contra diferentes tipos de cáncer como el de mama, hígado, colon, pulmón, estómago, cérvix, linfoma y próstata. También se ha demostrado su efecto

quimio protector, identificando que extractos de *C. sorokiniana* pueden prevenir la apoptosis inducida por cisplatino en células mieloides a través de una vía de activación de caspasa dependiente de mitocondrias²⁸. En modelos *in vivo* se observó reducción de la toxicidad en la médula ósea en ratones expuestos al cisplatino, que fueron tratados con extractos de *C. sorokiniana*²⁹.

El efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral de *C. sorokiniana* y Vincristina fue evaluada individualmente y en combinación en un modelo *in vitro* de cáncer de colon humano. El efecto de inhibición por *C. sorokiniana* fue directamente proporcional al número de células usadas como tratamiento (Fig. 1). Las propiedades antitumorales de esta alga ya han sido reportadas previamente mediante un extracto metanólico por nuestro grupo de investigación en un modelo de linfoma murino³⁰. El efecto inhibitorio del antineoplásico Vincristina fue probado *in vitro* en el modelo de cáncer de colon, observando

un efecto dosis-respuesta, con una citotoxicidad de hasta 63.5% al usar la dosis más alta de Vincristina (0.48 µg/mL) recomendada para los pacientes con cáncer (Fig. 2). Estos resultados demuestran que la combinación de métodos tradicionales de quimioterapia para el control del cáncer con tratamientos suplementarios con prebióticos que fortalezcan la microbiota intestinal, así como aquellos que presentan individualmente un efecto antitumoral, podrían mejorar el tratamiento del cáncer, así como la calidad de vida del paciente durante el tratamiento (Fig. 3). Finalmente, el análisis de la combinación demuestra que el efecto es complementario y no influiría en el efecto del tratamiento quimioterapéutico, si no mejoraría el tratamiento del paciente.

Por lo cual, en conclusión, estos resultados representan una alternativa clave para el uso de tratamientos naturales para el control de cáncer de colon humano en combinación con quimioterapéuticos de primera línea, lo cual impactaría directamente ya sea en la disminución la dosis terapéutica mejorando tentativamente la calidad de vida del paciente al disminuir los efectos secundarios generados por el tratamiento.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación. Los recursos del proyecto fueron asumidos por los autores.

REFERENCIAS

- Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, Lim YM, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*. 2022; 14(7), 1732. doi:10.3390/cancers14071732.
- Wu Y, Zhang J, Yu S, Li Y, Zhu J, Zhang K, Zhang R. Cell pyroptosis in health and inflammatory diseases. *Cell Death Discov*. 2022; 8(1), 191. doi:10.1038/s41420-022-00998-3.
- Veettil SK, Wong TY, Loo YS, Playdon MC, Lai NM, Giovannucci EL, Chaiyakunapruk N. Role of diet in colorectal cancer incidence: umbrella review of meta-analyses of prospective observational studies. *JAMA network open*. 2021; 4(2), e2037341-e2037341. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.37341.
- Chen Y, Liao X, Li Y, Cao H, Zhang F, Fei B, Bao C, Cao H, Chen X, Gao X, Zhao W, Xu, J. Effects of prebiotic supplement on gut microbiota, drug bioavailability, and adverse effects in patients with colorectal cancer at different primary tumor locations receiving chemotherapy: study protocol for a randomized clinical trial. *Trials*. 2023; 24(1), 1-11. doi:10.1186/s13063-023-07137-y.
- Ferdous UT, Nurdin A, Ismail S, Yusof ZNB. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts from marine *Chlorella* sp. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2023; 47, 102551. doi:10.1016/j.bcab.2022.102551.
- Napolitano G, Fasciolo G, Salbitani G, Venditti P. *Chlorella sorokiniana* dietary supplementation increases antioxidant capacities and reduces ROS release in mitochondria of hyperthyroid rat liver. *Antioxidants*. 2020; 9(9), 883. doi: 10.3390/antiox9090883.
- Bito T, Okumura E, Fujishima M, Watanabe F. Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients*. 202; 12(9), 2524. doi: 10.3390/nu12092524.
- Chen W, Luo L, Han D, Long F, Chi Q, Hu Q. Effect of dietary supplementation with *Chlorella sorokiniana* meal on the growth performance, antioxidant status, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Phycol*. 2021; 33, 3113-3122. doi:10.1007/s10811-021-02541-w.
- González-Mercado VJ, Sarkar A, Penedo FJ, Pérez-Santiago J, McMillan S, Marrero SJ, Marrero-Falcón MA, Munro, C. L. Gut microbiota perturbation is associated with acute sleep disturbance among rectal cancer patients. *J Sleep Res*. 2020; 29(3), e12915. doi:10.1111/jsr.12915.
- López-Chuken UJ, Young SD, Guzmán-Mar JL. Evaluating a 'biotic ligand model' applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd²⁺ activity. *Environ Technol*. 2010; 31(3), 307-318. doi:10.1080/09593330903470685.
- Ramírez-Villalobos JM, Romo-Sáenz CI, Morán-Santibañez KS, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Orozco-Flores AA, Romero-Arguelles R, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores, R. (2021). *In vitro* tumor cell growth inhibition induced by *Lophocereus marginatus* (Dc.) S. Arias and Terrazas endophytic fungi extracts. *IJERPH*. 2021;18(18), 9917. doi:10.3390/ijerph18189917.
- Rodríguez-Garza NE, Quintanilla-Licea R, Romo-Sáenz, CI, Elizondo-Luevano JH, Tamez-Guerra P, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores, R. *In vitro* biological activity and lymphoma cell growth inhibition by selected Mexican medicinal plants. *Life*. 2023; 13(4), 958. doi:10.3390/life13040958.
- Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: An interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50, W739-W743.
- Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*. 2018; 9(1), 3490. doi: 10.1038/s41467-018-05467-z.
- Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis*. 2017; 9(3), 448.
- Andinata B, Bachtiar A, Oktamianti P, Partahi JR, Dini MSA. A comparison of cancer incidences between Dharmas Cancer Hospital and GLOBOCAN 2020: A Descriptive Study of Top 10 Cancer Incidences. *Indonesian Journal of Cancer*. 2023; 17(2), 119-122. doi: 10.33371/ijoc.v17i2.982.
- Xi Y, & Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021; 14(10), 101174. doi:10.1016/j.tranon.2021.101174.
- Lewandowska A, Rudzki G, Lewandowski T, Strykowska-Góra A, Rudzki S. Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Control*. 2022; 29, 10732748211056692. doi: 10.1177/10732748211056692.

19. Shivappa N, Godos J, Hébert JR, Wirth MD, Piuri G, Speciani AF, Grosso G. Dietary inflammatory index and colorectal cancer risk—a meta-analysis. *Nutrients*. 2017; 9(9), 1043. doi: 10.3390/nu9091043.
20. Thomas F, Rome S, Mery F, Dawson E, Montagne J, Biro PA, Beckmann C, Renaud F, Poulin R, Raymond M, Ujvari B. Changes in diet associated with cancer: An evolutionary perspective. *Evol Appl*. 2017;10(7), 651-657. doi: 10.1111/eva.12465.
21. Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith G A, Bruley des Varannes S, Massart S, Moreau P, Potel G, de La Cochetière MF, Batard E, Knights D. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Thera*. 2015; 42(5), 515-528. doi: 10.1111/apt.13302.
22. Gerassy-Vainberg S, Blatt A, Danin-Poleg Y, Gershovich K, Sabo E, Nevelsky A, Daniel S, Dahan A, Ziv O, Dheer R, Abreu MT, Koren O, Kashi Y, Chowers Y. Radiation induces proinflammatory dysbiosis: transmission of inflammatory susceptibility by host cytokine induction. *Gut*. 2018; 67(1), 97-107. doi: 10.1136/gutjnl-2017-313789.
23. Bashiardes S, Tuganbaev T, Federici S, & Elinav E. The microbiome in anti-cancer therapy. In *Semin Immunol*. 2017; 32:74-81. doi: 10.1016/j.smim.2017.04.001.
24. Ervin SM, Ramanan SV, Bhatt AP. Relationship between the gut microbiome and systemic chemotherapy. *Dig Dis Sci*. 2020; 65, 874-884. doi: 10.1007/s10620-020-06119-3.
25. Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complement Ther Med*. 2013; 21(6), 712-723. doi: 10.1016/j.ctim.2013.08.018.
26. Patel AK, Singhanian RR, Awasthi MK, Varjani S, Bhatia SK, Tsai ML, Hsieh SL, Chen CW, Dong CD. Emerging prospects of macro-and microalgae as prebiotic. *Microb Cell Factories*. 2021; 20(1), 112. doi: 10.1186/s12934-021-01601-7.
27. Abd El-Hack ME, Abdelnour S, Alagawany M, Abdo M, Sakr MA, Khafaga AF, Mahgoub SA, Elnesr SS, Gebriel MG. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomed Pharmacother*. 2019; 111, 42-50. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.069.
28. Lin SH, Li MH, Chuang KA, Lin NH, Chang CH, Wu HC, Chao YH, Lin CC, Pan IH, Perng MD, Wen SF. *Chlorella sorokiniana* extract prevents cisplatin-induced myelotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 7353618. doi: 10.1155/2020/7353618.
29. Adzahar NS, Basri DF, Latif ES, Sallehudin NJ. *In vitro* and *in vivo* cytotoxic effects of chlorella against various types of cancer. *IJUM Med J Malays*. 2021; 20(1). doi:10.31436/imjm.v20i1.1765.
30. Reyna-Martinez R, Gomez-Flores R, López-Chuken U, Quintanilla-Licea R, Caballero-Hernandez D, Rodríguez-Padilla C, Beltrán-Rocha JC, Tamez-Guerra P. Actividad antitumoral de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus* sp. microalgas originarias del estado de Nuevo León, México. *PeerJ*. 2018; e4358. doi: 10.7717/peerj.4358