



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Consumo de carnes procesadas y riesgo de cáncer colorrectal: Principales compuestos involucrados

Lucía Rizzolo Brime



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CONSUMO DE CARNES PROCESADAS Y RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL: Principales compuestos involucrados

Tesis doctoral presentada por

LUCÍA RIZZOLO BRIME

Para obtener el título de doctor por la Universidad de Barcelona

DIRECTOR: **PAULA JAKSZYN FILOSOF**

TUTOR: **VÍCTOR MORENO AGUADO**

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

Barcelona, Septiembre 2024



Tesis doctoral

CONSUMO DE CARNES PROCESADAS Y RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL: Principales compuestos involucrados

Memoria de tesis doctoral presentada por

LUCÍA RIZZOLO BRIME

para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Diciembre 2024

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad de Barcelona

Dirigida por **PAULA JAKSZYN FILOSOF**

Unidad de Nutrición y Cáncer. Programa de Investigación de Epidemiología del Cáncer.

Instituto Catalán de Oncología (ICO)

Grupo de Nutrición y Cáncer. Programa de Epidemiología, Salud Pública, Cáncer, Prevención y

Cuidados Paliativos. Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)

Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Facultad de Ciencias de la Salud, Blanquerna, Universidad Ramon Llull, Barcelona, España.

Tutor: **VÍCTOR MORENO AGUADO**

Programa de Prevención y Control del Cáncer. Instituto Catalán de Oncología (ICO).

Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España



PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Nutrición y Cáncer (UNAC), perteneciente al Programa de Investigación de Epidemiología del Cáncer (EPIC) del Instituto Catalán de Oncología y el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), entre el año 2021 y 2024, con la supervisión de la Dra. Paula Jakszyn Filosof. De los cuatro artículos que dan origen a esta tesis, tres de ellos han sido publicados en revistas internacionales de alto impacto. El último artículo se presenta actualmente como manuscrito no publicado. El objetivo principal de la tesis ha sido profundizar en el estudio del rol de los compuestos de las carnes procesadas y su relación con el cáncer colorrectal, principalmente mediante la determinación del nitrosilhemo y hierro hemo en más de 50 derivados cárnicos. Todos los artículos originales de esta tesis se desprenden del proyecto EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) y abordan la determinación del contenido de nitrosilhemo y hierro hemo en derivados cárnicos, la ingesta de estos compuestos en la población española y europea y su relación con el cáncer colorrectal.

El estudio EPIC es uno de los estudios de cohortes más grandes del mundo en relación a la nutrición y el cáncer, con más de medio millón de participantes reclutados en 10 países europeos, que incluyen un periodo de seguimiento de aproximadamente 20 años. Fue diseñado con el objetivo de investigar las relaciones entre la dieta, el estado nutricional, el estilo de vida y factores ambientales, el riesgo, y la supervivencia de cáncer y otras enfermedades crónicas.

El idioma de la tesis es en castellano, aunque hay secciones escritas en inglés (resumen general de la tesis, material/métodos/resultados y conclusión). La estructura de la tesis contempla las secciones de introducción, justificación e hipótesis, objetivos, metodología y resultados, discusión, conclusión y referencias bibliográficas.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos cuatro años, tuve el privilegio de contar con el apoyo imprescindible de numerosas personas que me ayudaron a completar esta tesis doctoral.

A mi familia, por estar siempre presentes y preguntar cómo voy, aún sin saber mucho de qué iba todo. Por enseñarme los valores del trabajo, el estudio y la perseverancia. Porque todo lo que se empieza, se acaba. Gracias por el inmenso apoyo durante todos estos años. Si estoy hoy acá es por y gracias a ustedes. Los quiero mucho.

A vos Agus, por estar desde el principio. Por ser un gran oyente y una súper compañía. Por creer en mí y por tu apoyo incondicional. Por hacerme reír y seguirme a donde sea. Sos el lugar donde quiero estar. Feliz de poder empezar una nueva etapa con vos. Te amo.

A mis compis de despacho y doctorado: Carlota, Mechi y Jaz, por los buenos días por la mañana, el cafecito y los mates a cualquier hora. Por el gran soporte en las mil situaciones que pasamos, las charlas (tan necesarias), la compañía y el sostén para seguir adelante. Gracias por las risas, las confidencias y el tiempo compartido. Por todas las presentaciones, congresos, cenas y actividades que hicimos. El camino es duro, pero también está lleno de momentos maravillosos. Y muchos de ellos, los construimos juntas. Orgullosa y feliz de poder decirles que del doctorado me llevo unas grandes amigas.

Al otro despachito, que no se queda corto. Mel, Sara y Nuria. Gracias por hacer los días más amenos, las risas, conversaciones y cafés que se nos alargaban alguna vez más de la cuenta. Por ser el despacho de las confidencias y de alguna que otra “lloradita”. También os agradezco el apoyo y el estar presente durante estos últimos años. Habéis sido un pilar fundamental en mi día a día. Vosotras también ocupáis una buena parte de mi corazón, amigas.

A todos los miembros del PREC, Pili, Xisca, Beas, Ainoa, Ion, Laura, Gema, Saras, Enrique, Vicki, Erik, Daniel, Maryam, Mireia, Luisa, Pauli, Nati, Diana, Jesús, Juanjo, por la ayuda y el apoyo, la compañía y las comidas en el ParqueICO que ayudaban a despejar la mente, desconectar y aprovechar la luz del sol durante un ratito. Gracias.

A las estadísticas de la unidad, Leila, Cati y Sara, por la paciencia infinita, el aprendizaje y el tiempo dedicado a ayudarme y enseñarme un mundo estadístico que entonces no conocía y, que sin vosotras, no hubiera podido llegar al final de este trabajo. Os lo agradezco muchísimo. Leila, especialmente a ti, por todas las horas invertidas en mí y en sacar el proyecto adelante. Mil gracias, de todo corazón.

A vos Paula, por darme las herramientas para llegar hoy donde estoy. Sin vos como directora de tesis, hoy no sería quien soy. Por ayudarme a superar desafíos. Por darnos cuenta de lo distintas que somos y, sin embargo, también conectar y compartir. Por hacerme seguir aprendiendo. Con el valor infinito que tiene eso. Gracias por ayudarme a alcanzar esta meta, tanto profesional como personal.

Andreu y Ricard, miembros del equipo, que sin vosotros esto no hubiera sido posible. Gracias por responder todas mis dudas con generosidad, y abrirme las puertas a vuestro conocimiento. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

Toni, a ti por permitirme empezar mi carrera profesional en tu grupo. Por transmitir tu sabiduría y hacer que la epidemiología sea un mundo aún más interesante.

A los demás IPs, Martas y Raul, porque ha sido una maravilla tener tan buenos profesionales alrededor durante todos estos años. Marta Crous, a ti por ser una persona con la que poder hablar. Gracias por escuchar, aconsejar y ser, a parte de una gran profesional, una maravillosa persona.

A todos mis amigos, que se han interesado en mi día a día y han celebrado mis logros. A los que han podido seguirme en primera persona y a los que me han acompañado desde lejos. Gracias por dejar una parte de nuestros ratitos juntos para escucharme y animarme a llegar al final de esta etapa.

Thank you very much to all the people I met in Plymouth: Raul, Patri, Lauren, Cansel, Rachel, Manura, Wai Ling, Mar, Diego, Juan, Mau, Massimo, Lau, Ola, and Nesch, who welcomed me as one of their own and made me feel at home. You are amazing. I owe this to you as well.

FINANCIAMIENTO

La entidad financiadora de este proyecto fue el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, España. Este apoyo fue posible gracias al Fondo Europeo de Desarrollo Regional bajo el lema "Una manera de construir Europa", Unión Europea.

Lucía Rizzolo Brime: la participación de LR-B en el proyecto fue respaldado por una beca de *Contratos Predoctorales para Formación en Investigación en Salud (FI20/00006)* del Ministerio de Salud de España, Instituto de Salud Carlos III (Cofinanciado por el Fondo Social Europeo (FSE), invirtiendo en tu futuro). Una parte de esta tesis fue realizada en la Universidad de Plymouth, gracias al apoyo financiero de las *Ayudas para la movilidad del personal investigador (Modalidad M-AES) (MV23/00033)* del Ministerio de Salud de España, Instituto de Salud Carlos III.

Proyecto: “Consumo de carnes procesadas y riesgo de cáncer colorrectal: Principales compuestos involucrados”. *Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS PI19/00817* con la Dra. Paula Jakszyn Filosof como Investigadora Principal.



Estudio EPIC

Este estudio forma parte del Estudio EPIC. Este proyecto ha recibido apoyo financiero del *Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Salud de España, Instituto de Salud Carlos III* a través del proyecto *PI19/00817* (cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), una manera de construir Europa).

La coordinación de EPIC está respaldada financieramente por la Comisión Europea (DG-SANCO) y la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y por el Departamento de Epidemiología y Bioestadística, Escuela de Salud Pública, Imperial College London, que cuenta con apoyo adicional de infraestructura proporcionado por el Centro Biomédico de Investigación Imperial del NHIR (BRC). Las cohortes nacionales

cuentan con el apoyo de: Sociedad Danesa del Cáncer (Dinamarca); Liga Contra el Cáncer, Instituto Gustave Roussy, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Instituto Nacional de la Salud y la Investigación Médica (INSERM) (Francia); Sociedad Alemana del Cáncer, Centro Alemán de Investigación del Cáncer (DKFZ), Instituto Alemán de Nutrición Humana Potsdam-Rehbruecke (DIfE), Ministerio Federal de Educación e Investigación (BMBF) (Alemania); Asociación Italiana para la Investigación del Cáncer-AICR-Italia, Compagnia di San Paolo y Consejo Nacional de Investigación (Italia); Ministerio de Salud, Bienestar y Deporte de los Países Bajos (VWS), Registro Holandés de Cáncer (NKR), Fondos de Investigación LK, Fondos de Prevención Holandeses, ZON Holandés (Zorg Onderzoek Nederland), Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer (WCRF), Oficina Central de Estadística de los Países Bajos (CBS) (Países Bajos); Fondo de Investigación en Salud (FIS)—Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Gobiernos Regionales de Andalucía, Asturias, País Vasco, Murcia y Navarra, y el Instituto Catalán de Oncología—ICO (España); Sociedad Sueca del Cáncer, Consejo de Investigación Sueco y Consejos del Condado de Skåne y Västerbotten (Suecia); Cancer Research UK (14136 para EPIC-Norfolk; C8221/A29017 para EPIC-Oxford), Medical Research Council (1000143 para EPIC-Norfolk; MR/M012190/1 para EPIC-Oxford) (Reino Unido). Los financiadores de este estudio no tuvieron ningún papel en las decisiones sobre el análisis o interpretación de los datos, o la preparación, revisión o aprobación del manuscrito. Además, parte de esta tesis pertenece al estudio EPIC-España. La cohorte EPIC-España fue apoyada por el Fondo de Investigación en Salud (FIS) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), los Gobiernos Regionales de Andalucía, Asturias, Guipúzcoa, Murcia y Navarra, y el Instituto Catalán de Oncología (ICO).



El proyecto contó con el respaldo fundamental del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), cuya colaboración fue fundamental para llevar a cabo el contrato de investigación de cuatro años y para la ejecución del proyecto. La investigación se desarrolló en la Unidad de Nutrición y Cáncer del Programa de Investigación en Epidemiología del Cáncer en el Instituto Catalán de Oncología, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet De Llobregat, Barcelona, con el apoyo del Departamento de Salud de la Generalitat de Catalunya. Parte de esta tesis se realizó en la Facultad de Salud de la Universidad de Plymouth, donde la colaboración con otros profesionales especializados en el estudio de nitratos y nitritos fue fundamental para el aprendizaje profesional de LR-B y desarrollo del trabajo. Estas experiencias podrían ser valiosas para fortalecer la colaboración futura entre el grupo de investigación del EPIC y este equipo.



UNIVERSITY OF
PLYMOUTH



ÍNDICE

PRESENTACIÓN DE LA TESIS	11
AGRADECIMIENTOS	13
FINANCIAMIENTO	15
ÍNDICE	19
LISTA DE TABLAS	21
LISTA DE FIGURAS	22
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	23
ENUMERACIÓN ARTÍCULOS DE LA TESIS	24
ABSTRACT	27
RESUMEN	31
1. INTRODUCCIÓN	35
1.1 CÁNCER COLORRECTAL	37
1.1.1 Aspectos generales de la enfermedad	37
1.1.2 Patogénesis y causas	37
1.1.3 Aspectos clínicos: Síntomas, tratamiento y pronóstico	39
1.1.4 Epidemiología	40
1.1.5 Etiología	47
1.2 CARNES PROCESADAS Y CÁNCER COLORRECTAL	60
1.2.1 Mecanismos subyacentes	60
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	69
2.1 Justificación	71
2.2 Hipótesis	75
3. OBJETIVOS	76
4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	83
4.1 Artículo I: Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives	87
4.2 Artículo II: Nitrosyl-heme and heme iron intake in subjects from the EPIC-Spain cohort	103

4.3 Artículo III: Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort	127
4.4 Artículo IV: Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study.....	135
5. DISCUSIÓN.....	165
5.1 Determinación de nitrosilhemo y hierro hemo en carnes procesadas.....	168
5.2 Estimación de la ingesta de hierro hemo y nitrosilhemo en carnes procesadas a nivel español y europeo.....	169
5.3 El papel de la ingesta de hierro hemo y nitrosilhemo en el riesgo de cáncer colorrectal.....	173
5.4 De las carnes procesadas a sus alternativas vegetales: nuevas tendencias alimentarias.....	178
5.5 Fortalezas y limitaciones	181
5.6 Aportaciones, aplicabilidad y líneas de investigación futura	184
6. CONCLUSIONS.....	187
7. BIBLIOGRAFÍA.....	193

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nivel de evidencia científica sobre el impacto de factores de estilo de vida en el riesgo de cáncer colorrectal, adaptada del <i>Informe Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer del World Cancer Research Fund Institute y el American Institute for Cancer Research CUP, 2018</i> (10).....	48
Tabla 2. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal (adaptado de <i>Ionescu VA., et al.</i>) (127).....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estadíos del cáncer colorrectal de acuerdo con la <i>American Cancer Society</i>	40
Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer colorrectal según las provincias de España, 2023	42
Figura 3. Mortalidad estimada de cáncer colorrectal (<i>Globocan</i> , ambos sexos)	43
Figura 4. Número estimado de casos prevalentes (a los 5 años) para todas las edades en Europa (<i>Globocan</i> , ambos sexos)	45
Figura 5 Tasa de prevalencia (a los 5 años) para todas las edades en España (ambos sexos) ..	46
Figura 6. Tendencias del consumo global de carne	55
Figura 7. Resumen mecanismos subyacentes a la carcinogénesis de la carne roja y procesada en el cáncer colorrectal de acuerdo con <i>Casella M. et al.</i>	60
Figura 8. Hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados de la dieta y su papel patogénico en el cáncer colorrectal (adaptado de <i>Cheng et al.</i>)	61
Figura 9. Implicaciones patológicas sugeridas del consumo, acumulación e inflamación posterior del Neu5gc en la aterosclerosis y el cáncer (adaptado de <i>Dhar Chirag et al.</i>)	62
Figura 10. Mecanismos propuestos sobre los posibles riesgos para la salud asociados con el consumo de carne roja y procesada de acuerdo con <i>Oostindjer M., et al.</i>	65
Figura 11. Estructura molecular del nitrosilhemo de acuerdo a <i>Bastide N. M et al.</i>	66

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Español

ADN Ácido desoxirribonucleico
CCR Cáncer colorrectal
EII Enfermedad Inflamatoria Intestinal
IDH Índice de Desarrollo Humano
IL-6 Interleuquina-6
IMC Índice de Masa Corporal
Neu5gc Ácido N-glicolilneuramínico

Inglés

ATNC *Apparent total N-nitroso compounds*
BMI *Body Mass Index*
ENDB *EPIC Nutrient Database*
EPIC *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*
GLOBOCAN *Global Cancer Observatory*
hPDI *Healthy plant-based diet Index*
HPLC *High Performance Liquid Chromatography*
IARC *International Agency for Research on Cancer*
IGF-1 *Insulin-like growth factor 1*
IL-6 *Interleukin 6*
Neu5gc *N-Glycolylneuraminic acid*
NOCs *N-Nitroso compounds*
PBMA *Plant-based meat alternatives*
PDI *Plant-based diet Index*
TNF-alfa *Tumor Necrosis Factor-alpha*
UPDI *Unhealthy plant-based diet Index*
UPFs *Ultra-processed foods*
WCRF/AICR CUP *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Continuous Update Project*

ENUMERACIÓN ARTÍCULOS DE LA TESIS

La tesis se ha realizado en formato por compendio de publicaciones.

Esta tesis comprende 3 objetivos y 4 publicaciones: 3 como artículos originales publicados y 1 artículo original no publicado (manuscrito en preparación).

Artículos originales publicados:

- Bou R. and Farran-Codina A., **Rizzolo-Brime L.**, Jacint A., Sabeña G., and Jakszyn P. **Iron, Heme, and Nitrosyl-Heme Content in Spanish Meat Derivatives.** 2024;125(105832):105832.
Factor de Impacto, Cuartil (Categoría): 4.0, Q2 (Food Science & Technology)
- **Rizzolo-Brime L.**, Farran-Codina A., Bou R., Lujan-Barroso L., Quirós J.R., Amiano P., Sánchez M.J., Rodríguez-Barranco M., Guevara M., Moreno-Iribas C., Gasque A., Chirlaque M.D., Colorado-Yohar S.M., Huerta Castaño J.M., Agudo A., Jakszyn P. **Nitrosyl-heme and heme iron intake in subjects from the EPIC-Spain cohort.** Nutrients, 2024;18;16(6):878.
Factor de Impacto, Cuartil (Categoría): 4.8, Q1 (Nutrition & Dietetics)
- **Rizzolo-Brime L.**, Lujan-Barroso L., Farran-Codina A., Bou R., Lasheras C., Amiano P., Aizpurua A., Sánchez M.J., Molina-Montes E., Guevara M., Moreno-Iribas C., Gasque A., Chirlaque M.D., Colorado-Yohar S.M., Huerta Castaño J.M., Zamora Ros R., Agudo A., Jakszyn P. **Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2024; 33(6): 854–856.
Factor de Impacto, Cuartil (Categoría): 3.7, Q1 (Public, Environmental & Occupational Health)

Artículo original no publicado:

- **Rizzolo-Brime L.**, Lujan-Barroso L, Farran-Codina A, Bou R, Nicolas G, Huybrechts I, Lasheras C, Molina Montes E, Colorado-Yohar S, Gasque A, Dahm CC, Bock N, Olsen A, Tjønneland A, Katzke V, le Cornet C, Schulze MB, Saieva C, Sieri S, Santucci De Magistris M, Tumino R, Macciotta A, Weiderpass E, Chatziioannou C, Vineis P, Jakszyn P. ***Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study.***

Estado: Artículo no publicado (manuscrito en preparación).

ABSTRACT

Title Processed Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: Main Compounds Involved.

Introduction Diet is among the most important lifestyle determinants of colorectal cancer risk, influenced by factors such as alcohol, fibre, and processed meats. In October 2015, the *International Agency for Research on Cancer* issued a statement based on sufficient epidemiological evidence, classifying processed meats as Group 1 (carcinogens for humans). However, the mechanisms explaining the relationship between consumption of red and processed meats and colorectal cancer risk remain unknown. Hypotheses have highlighted compounds like nitrosyl-heme and heme iron as potential factors linked to this cancer type. Gathering data on the concentration of these compounds in PM is crucial for investigating their intake-related disease associations and providing solid evidence of association or causation.

Hypothesis Our main hypothesis is that the nitrosyl-heme and heme iron content in processed meat products could explain the differences observed between fresh and processed red meat in relation to colorectal cancer risk. Additionally, we believe that the content of these compounds varies according to the different types of processed meat and cooking methods. We also propose that the intake of nitrosyl-heme and heme iron from these products varies based on numerous sociodemographic, regional, and lifestyle factors. Furthermore, we believe that the intake of these compounds may be associated with an increased risk of colorectal cancer and that this association could vary depending on tumour location. Lastly, we hypothesise that other risk factors may interact, modifying the association with this type of cancer.

Objectives Obtain reliable representative data on the composition of nitrosyl-heme and heme iron in meat derivatives consumed in Spain. Estimate their intake in a sample of the Spanish population and describe differences in consumption according to sociodemographic and lifestyle variables. Evaluate colorectal cancer risk in relation to the intake of these compounds in a sample of the Spanish population. Additionally, extrapolate nitrosyl-heme iron data from Spanish meat derivatives to European meat

derivatives. Finally, assess colorectal cancer risk in relation to the intake of this compound in a larger, more heterogeneous sample than the previously-mentioned Spanish sample.

Methods We used data from the EPIC study (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) to obtain a list of meat derivatives consumed by the Spanish population sample (EPIC-Spain). To obtain reliable representative data on the content of nitrosyl-heme and heme iron in meat derivatives, they were analysed using direct laboratory measurements: *the Hornsey spectrophotometric method* and *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. After relevant exclusions, the intake of these compounds was estimated in a sample of 38,471 healthy volunteers from five Spanish regions, describing differences in observed consumption according to their sociodemographic and lifestyle variables. Dietary intake was assessed through a validated dietary history questionnaire collected at EPIC recruitment. To examine the association between the intake of nitrosyl-heme and heme iron from meat derivatives and colorectal cancer risk, it was evaluated in 577 colorectal cancer cases within the same EPIC-Spain cohort. Prevalent cancer cases, those lost to follow-up, and subjects with implausible dietary information were excluded from the study. Only meat derivative consumers were considered. The final studied population consisted of 38,262 individuals (23,546 women and 14,716 men). Cox proportional hazards regression models were used to calculate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). Data on nitrosyl-heme and heme iron content from Spanish processed meats were extrapolated to European processed meats registered in the EPIC study. The association between the intake of these compounds and colorectal cancer risk was examined in a larger, heterogeneous population with a total of 5,115 colorectal cancer cases.

Main Results Regardless of the methodology used, significant variability was observed in determining nitrosyl-heme and heme iron in meat derivatives. However, the *HPLC* method provided more useful information, allowing for a more accurate assessment of these compound consumptions in the Spanish population. Regarding the consumption of these compounds, significant differences were observed according to various sociodemographic and lifestyle variables. Although nitrosyl-heme and heme iron

content were low in "*jamón serrano*" and "*jamón cocido/jamón de york*", they were the most consumed items by the cohort, significantly contributing to the dietary intake of these compounds. Studying the relationship between the intake of these compounds and colorectal cancer risk in the EPIC-Spain cohort did not show statistically significant associations ($HR_{T3 \text{ vs } T1}$: 0.98 (95% CI: 0.79-1.21); $HR_{T3 \text{ vs } T1}$: 0.88 (95% CI: 0.70-1.10) for nitrosyl-heme and heme iron intake with colorectal cancer risk, respectively). After extrapolating the data to the European cohort, no statistically significant associations were found between sex-specific nitrosyl-heme consumption and colorectal cancer risk ($HR_{T3 \text{ vs } T1}$: 1.01 (0.93-1.09)).

Conclusions The determination of nitrosyl-heme and heme iron through laboratory analytical methods, specifically using the *HPLC* method, allows for a more accurate assessment of the intake of these compounds in the Spanish population, offering more precise estimates than those found in previous literature for European populations. However, the variability of heme, nitrosyl-heme, and curing efficiency remains high, highlighting the need for more detailed databases of meat products in each country. Regarding colorectal cancer risk, our findings suggest that there is no significant association between the intake of nitrosyl-heme and heme iron and this risk. Given the current limited evidence and studies on this association, as well as the underlying biological mechanisms, it is crucial to conduct further research. This should include repeated assessments of processed meat intake to clarify these links and better understand their effects on public health.

RESUMEN

Título Consumo de carnes procesadas y riesgo de cáncer colorrectal: principales compuestos involucrados.

Introducción La dieta está entre los determinantes de estilo de vida más importantes del riesgo de cáncer colorrectal (CCR), debido a factores como el alcohol, la fibra y las carnes procesadas. En octubre de 2015, la *Agencia Internacional de Investigación en Cáncer* clasificó a las carnes procesadas en el grupo 1 (cancerígenos para los humanos), basándose en suficiente evidencia epidemiológica. Sin embargo, los mecanismos que pueden explicar la relación entre el consumo de carnes rojas/procesadas y el riesgo de CCR siguen siendo desconocidos. Se han propuesto compuestos como el nitrosilhemo y el hierro hemo como posibles responsables de esta relación. Disponer de datos sobre los niveles de estos compuestos en carnes procesadas es fundamental para estudiar la relación entre su ingesta y la aparición de enfermedades y así poder aportar evidencias sólidas de asociación o causalidad.

Hipótesis Nuestra principal hipótesis es que el contenido en nitrosilhemo y hierro hemo de los derivados cárnicos, podría explicar el porqué de las diferencias encontradas entre la carne roja fresca y procesada, en relación al riesgo de CCR. Creemos que el contenido de estos compuestos difiere según los diferentes tipos de derivados cárnicos y técnicas de cocción, así como su ingesta podría variar según variables sociodemográficas, regionales y de estilo de vida. Además, la ingesta de estos compuestos creemos que podría estar asociado al aumento de riesgo de CCR y que este riesgo podría diferir según localización tumoral. Por último, se hipotetiza que otros factores de riesgo podrían interactuar modificando la asociación con este tipo de cáncer.

Objetivos Obtener datos representativos fiables sobre la composición de nitrosilhemo y hierro hemo en derivados cárnicos consumidos en España. Estimar su ingesta en una muestra de la población española y describir las diferencias de su consumo según variables sociodemográficas y de estilo de vida. Evaluar el riesgo de CCR en relación a la ingesta de estos compuestos en una muestra de la población española. Por otro

lado, extrapolar los datos de nitrosilhemo de derivados cárnicos españoles a derivados cárnicos europeos. Y, por último, evaluar el riesgo de CCR en relación a la ingesta de este compuesto en esta muestra europea, más grande y heterogénea que la anterior.

Métodos Se utilizaron datos del estudio EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) para adquirir una lista de derivados cárnicos consumidos por la muestra de la población española (EPIC-España). Para obtener datos representativos fiables del contenido de nitrosilhemo y hierro hemo de los derivados cárnicos, se analizaron mediante mediciones directas de laboratorio: método *espectrofotométrico de Hornsey* y la cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC* por sus siglas en inglés). Tras las exclusiones pertinentes, se estimó la ingesta de estos compuestos en una muestra de 38.471 voluntarios sanos de cinco regiones españolas y se describieron las diferencias de consumo encontradas según sus variables sociodemográficas y de estilo de vida. La ingesta dietética fue evaluada a través de un cuestionario de historia dietética validado y recogido en el reclutamiento de EPIC. Para examinar la asociación entre la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo de los derivados cárnicos y el riesgo de CCR, se evaluó en 577 casos de CCR en la misma cohorte EPIC-España. En este caso, excluimos del estudio los casos de cáncer prevalente y aquellos que se perdieron durante el seguimiento, así como los sujetos que presentaron una información dietética implausible. Se tuvieron en cuenta sólo a los individuos consumidores de derivados cárnicos. La población final estudiada consistió en 38.262 individuos (23.546 mujeres y 14.716 hombres). Se utilizaron modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox para calcular las razones de riesgo y los intervalos de confianza del 95%. Se extrapolaron los datos del contenido de nitrosilhemo de las carnes procesadas españolas a las carnes procesadas europeas registradas en el estudio EPIC. Se examinó la asociación entre la ingesta de estos compuestos y el riesgo de CCR en una población más grande y heterogénea, con un total de 5.115 casos de CCR.

Resultados principales Independientemente de la metodología utilizada, la variabilidad encontrada en la determinación del nitrosilhemo y hierro hemo en derivados cárnicos sigue siendo significativa. No obstante, el método *HPLC* ofrece información más útil, permitiendo una evaluación más acertada del consumo de estos

compuestos en la población española. Respecto al consumo de estos compuestos, se observaron diferencias significativas según las diferentes variables sociodemográficas y de estilo de vida. A pesar que el contenido de nitrosilhemo y hierro hemo fue bajo para el “*jamón serrano*” y el “*jamón cocido/jamón de york*”, fueron los ítems más consumidos por la cohorte, contribuyendo considerablemente a la ingesta dietética de estos compuestos. Al estudiar la relación entre la ingesta de estos compuestos y el riesgo de CCR en la cohorte EPIC-España, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas (HR_{T3vsT1} : 0.98 (95% IC: 0.79-1.21); HR_{T3vsT1} : 0.88 (95% IC: 0.70-1.10) para la ingesta sexo-específica de nitrosilhemo y hierro hemo, respectivamente). Tras extrapolar los datos a la cohorte europea, tampoco se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el consumo específico por sexo de nitrosilhemo y riesgo de este tipo de cáncer (HR_{T3vsT1} : 1.01 (0.93-1.09).

Conclusiones La determinación del nitrosilhemo y hierro hemo mediante métodos analíticos de laboratorio, específicamente con el método *HPLC*, permite una evaluación más precisa de la ingesta de estos compuestos en la población española, ofreciendo estimaciones más exactas que las de la literatura previa para poblaciones europeas. Sin embargo, la variabilidad del hemo, nitrosilhemo y la eficiencia de curado sigue siendo alta, lo que suscita la necesidad de bases de datos de derivados cárnicos más detalladas en cada país. En cuanto al riesgo de CCR, nuestros hallazgos sugieren que no existe una asociación significativa entre la ingesta de estos compuestos y dicho riesgo. Dada la escasa evidencia y estudios hasta el momento acerca de esta asociación, junto con los mecanismos biológicos subyacentes, se subraya la importancia de realizar más investigaciones con mediciones repetidas de la ingesta de carnes procesadas para clarificar estos vínculos y comprender mejor sus efectos en la salud pública.

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer Colorrectal

1.1.1 Aspectos generales de la enfermedad

El cáncer colorrectal es un tipo de cáncer que afecta al colon o al recto. Dicha patología surge a partir de diferentes daños en el ADN, que impactan en los protooncogenes, los genes supresores de tumores y los genes responsables de la reparación del ADN (1). El tipo de cáncer colorrectal más común es el adenocarcinoma, que representa entre el 90 y 95 por ciento de todos los tumores del intestino grueso (2). Los síntomas principales del cáncer colorrectal incluyen sangrado colorrectal, cambios del hábito intestinal, pérdida de apetito, dolor abdominal y anemia por deficiencia de hierro (3). Es importante señalar que los síntomas y signos de este tipo de cáncer pueden ser similares a los de afecciones comunes como las hemorroides y el síndrome del intestino irritable (4,5). Se trata del cáncer más diagnosticado en el mundo después del de mama y de pulmón y representa la segunda causa de muerte por cáncer para ambos sexos alrededor del mundo (6).

1.1.2 Patogénesis y causas

Ciertos hábitos de estilo de vida y características personales, considerados factores de riesgo, pueden aumentar la probabilidad de desarrollar pólipos o cáncer de colon (7). Entre estos factores, destaca que los individuos que cuentan con un familiar de primer grado con historial de esta enfermedad presentan un riesgo significativamente mayor. Este riesgo aumenta todavía más si ese familiar es diagnosticado antes de cumplir los 50 años de edad o si más de un familiar de primer grado está afectado. Aproximadamente del 2% al 5% de los diagnósticos de cáncer colorrectal están vinculados a mutaciones genéticas hereditarias que incrementan la probabilidad de desarrollar cáncer e influyen en las estrategias de tratamiento (8). La predisposición genética, los factores medioambientales o una combinación de ambas pueden contribuir a que algunos cánceres sean hereditarios (9–11). Las dos condiciones hereditarias principales son la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis.

Antecedentes de pólipos adenomatosos

Poseer un historial de pólipos adenomatosos (adenomas) aumenta el riesgo de cáncer colorrectal. Este riesgo es especialmente significativo cuando existen una cantidad considerable, si son de gran tamaño o si alguno de ellos muestra signos de displasia. La displasia se refiere a las células del revestimiento del colon o recto que parecen anormales sin ser cancerosas en ese momento. Además, el hecho de haber pasado un cáncer colorrectal, incluso si se ha extirpado completamente, causa una mayor probabilidad de desarrollo de nuevos cánceres en distintas áreas del colon y recto. Este riesgo aumenta si la enfermedad se pasó en una etapa temprana de la vida (9).

Antecedentes de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (síndrome de Lynch)

El síndrome de Lynch destaca como el síndrome hereditario más prevalente vinculado al cáncer colorrectal, abarcando entre el 2-4% de nuevos diagnósticos (12,13). Se caracteriza por un predominio de cánceres en el lado derecho del colon y una tendencia a desarrollar cánceres colorrectales sincrónicos y metacrónicos (14,15). Las personas con síndrome de Lynch tienen más probabilidades de padecer cáncer colorrectal u otros tipos de cáncer a una edad más temprana (antes de los 50 años) (13).

Otras causas establecidas de cáncer colorrectal**Tabaco**

Fumar 40 cigarrillos (2 paquetes) por día incrementa el riesgo de cáncer colorrectal en un 40% y casi duplica el riesgo de muerte por esta enfermedad (9,16,17). Un metaanálisis realizado en 2020 confirma la asociación establecida en el último informe del *World Cancer Research Fund Institute* y el *American Institute for Cancer Research Continuous Update Project* (por sus siglas en inglés *WCRF/AICR CUP*) entre el tabaquismo y el aumento de riesgo de cáncer colorrectal. Esta asociación se muestra en forma dosis dependiente con la intensidad y duración del hábito tabáquico (18).

Antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal crónica

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se caracteriza por una inflamación prolongada en el colon. Las personas con EII crónica, especialmente las que no reciben tratamiento, suelen desarrollar displasia. No obstante, con el tiempo, pueden evolucionar hacia cáncer. Padecer EII, colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn implica un aumento de riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (9,16,17).

Factores protectores**Medicamentos**

El uso a largo plazo (cinco años o más) de al menos 75 mg al día del fármaco antiinflamatorio no esteroideo aspirina puede reducir el riesgo de cáncer colorrectal. La terapia hormonal en mujeres posmenopáusicas también disminuye el riesgo de este tipo de cáncer (10).

1.1.3 Aspectos clínicos: Síntomas, tratamiento y pronóstico

En las etapas iniciales del cáncer colorrectal, los síntomas pueden ser leves o inexistentes, aunque podría haber indicios tempranos. Estos síntomas podrían no manifestarse hasta que la enfermedad haya avanzado a la etapa 2 o más (19) y varían desde la población en general hasta aquellos individuos que se atienden en la atención primaria y en la atención secundaria (20). Cabe destacar que los síntomas y signos de cáncer colorrectal pueden coincidir con los de afecciones comunes como las hemorroides y el síndrome del intestino irritable (4,5). Los síntomas más comunes en etapas tempranas incluyen el sangrado colorrectal (12-24%) (20–22), cambios del hábito intestinal (4-40%) (20,23,24), pérdida de peso (2,3-39%) (23,24), dolor abdominal (15,1-17,2%) (23,25) y anemia por deficiencia de hierro (1-20%) (26,27).

El enfoque terapéutico dependerá de la etapa de cáncer colorrectal en que se encuentre el paciente, si bien los más frecuentes son: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia (28). En aquellos casos de cáncer metastásico la quimioterapia sistémica es el tratamiento primario, aunque el tratamiento puede incluir una combinación de los mencionados previamente (28). Gracias a los avances en el tratamiento, el panorama del cáncer colorrectal está

evolucionando de una enfermedad mortal hacia una que se vuelve cada vez más tratable (29).

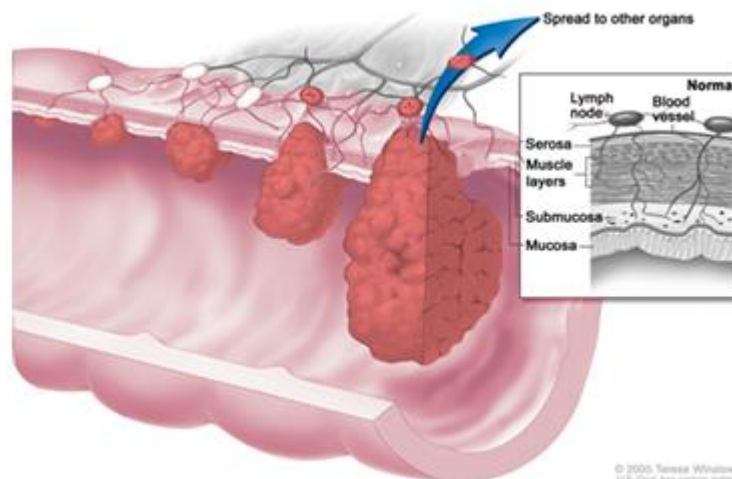


Figura 1. Estadíos del cáncer colorrectal de acuerdo con la American Cancer Society (30)

El pronóstico de cáncer colorrectal en términos de supervivencia es relativamente bueno (31), aunque presenta notables variaciones entre los países con altos ingresos, la edad y el estadio en el momento del diagnóstico (32). Para el cáncer colorrectal metastásico (estadio IV), la supervivencia a 5 años es del 14% (33) mientras que para estadios más tempranos las tasas de supervivencia relativas a 5 años se encuentran entre el 73-91% dependiendo de la etapa en el momento del diagnóstico (localizado o regional) (33).

1.1.4 Epidemiología

1.1.4.1 Carga global

Resultados del Observatorio Mundial del Cáncer, específicamente de la plataforma *GLOBOCAN* (por sus siglas en inglés), mostraron que en 2022 se diagnosticaron 1,93 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal (equivalentes a casi un 10% de la incidencia mundial de cáncer). Las muertes asociadas al cáncer colorrectal se situaron en casi 1 millón de muertes alrededor del mundo. Se trata del tercer cáncer que más se diagnostica en el mundo después del de mama y el de pulmón. Además, es la segunda causa principal de muerte por cáncer en ambos sexos alrededor del mundo

(6). El cáncer colorrectal presentó el mayor riesgo de incidencia y mortalidad por este tipo de cáncer, representando el 38,5% del riesgo total de desarrollar y el 28,2% de morir por cánceres gastrointestinales, seguido por cánceres de estómago, hígado, esófago, páncreas y vesícula biliar (34). En España, se estima que se detectaron 41.661 nuevos casos de cáncer colorrectal en 2022 con un total de 16.246 casos en mujeres (39%) y 25.415 casos en hombres (61%), lo que lo convierte en el tumor más diagnosticado en el país (35).

1.1.4.2 Prevención

La evidencia disponible hasta el momento señala que es posible llevar a cabo medidas de prevención primaria contra el cáncer colorrectal. Al menos el 70% de los casos de cáncer de colon podrían ser evitados mediante modificaciones en la dieta y el estilo de vida (36). La prevención secundaria se centra en grupos poblacionales con un riesgo promedio o superior de desarrollar la enfermedad. Actualmente, estos grupos comprenden a la población general con mayor riesgo debido a la edad, individuos pertenecientes a familias con cáncer colorrectal hereditario y pacientes que padecen EII crónicas y extensas (37). Los programas de cribado se enfocan principalmente en personas de 50 a 55 años en adelante, ya que esta población tiene un mayor riesgo de desarrollar adenomas y cáncer (38). Existen varios métodos disponibles para la detección del cáncer colorrectal, de los cuales destacan las pruebas basadas en heces: prueba inmunoquímica fecal, prueba de sangre oculta en heces, prueba de ADN en heces de múltiples objetivos o más recientemente la sigmoidoscopia flexible y la colonoscopia (37,39). Además, la colonografía por tomografía computarizada, un método de imagen basado en tecnología de escaneo, se ha desarrollado como una técnica de visualización menos invasiva para la detección de cáncer colorrectal (40).

1.1.4.3 Incidencia

Según los datos del *GLOBOCAN* en 2022, el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en el mundo (6), representando aproximadamente el 7% de nuevos diagnósticos de cáncer (41). En España, es el segundo tumor más frecuente en hombres, después del cáncer de próstata, y en mujeres, después del cáncer de mama. La incidencia del cáncer colorrectal en 2023 siguió siendo mayor en hombres (24.385

casos, 61%), que en mujeres (15.818, 39%). En total, representó casi el 15% de todos los tumores diagnosticados en ese mismo año (35,42). En relación a las provincias de España (**Figura 2**), Castilla y León presentó las tasas de incidencia más altas, seguido de Galicia y Asturias (con 126.000, 113.000 y 108.000 casos nuevos por cada 100.000 habitantes, respectivamente) (35). Por el contrario, Ceuta y Melilla representaron las provincias con menos tasas de incidencia (con 60.000 y 55.000 casos nuevos por cada 100.00 habitantes, respectivamente).

Ranking de nuevos casos por 100.000 habitantes por tipo de cáncer

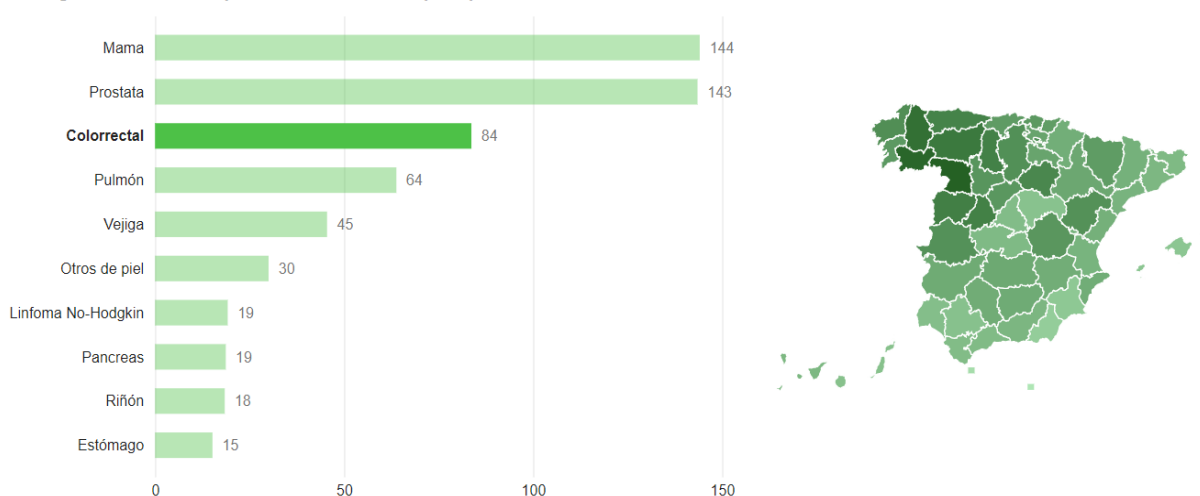


Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer colorrectal según las provincias de España, 2023 (35)

En ciertas regiones con altas tasas de cáncer colorrectal, se ha observado una reducción de la incidencia atribuida a cambios generales en el estilo de vida, como la disminución del hábito de fumar y la implementación de pruebas de detección. A partir del 2000 se observó una mejora más acelerada, atribuida en gran medida al aumento en el uso de la colonoscopia como método de detección y la eliminación de lesiones precursoras (38,43,44).

1.1.4.4 Mortalidad

El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con un total de 881.000 muertes estimadas para 2018. Para ese mismo año, el cáncer de colon se situó como el quinto cáncer más mortal con unas 551.000 muertes, comprendiendo el 5,8% de todas las muertes por cáncer. Por otro lado, el cáncer de recto fue el décimo más mortal con un total de 310.000 muertes, lo que constituye un 3,2% de todas las muertes por cáncer (45). Los últimos datos registrados para 2022,

muestran un aumento de mortalidad por este tipo de cáncer, llegando a un total de 903.853 muertes esperadas alrededor del mundo, de las cuales se atribuyen 499.715 y 404.138 muertes para hombres y mujeres, respectivamente (6). En los países de la Unión Europea, se estimó que el cáncer colorrectal representaba el 12,1% de todas las muertes por cáncer, manteniéndolo como el tercer cáncer más frecuente (después del cáncer de pulmón y de mama) y la segunda causa de muerte por cáncer (después del cáncer de pulmón) (6). Las tasas de mortalidad estandarizadas por edad más bajas en Europa se encontraron en Albania con un 4,9/100.000 habitantes, seguido por Suiza (7,9/100.000 habitantes) y Austria (8,4/100.000 habitantes) (6).

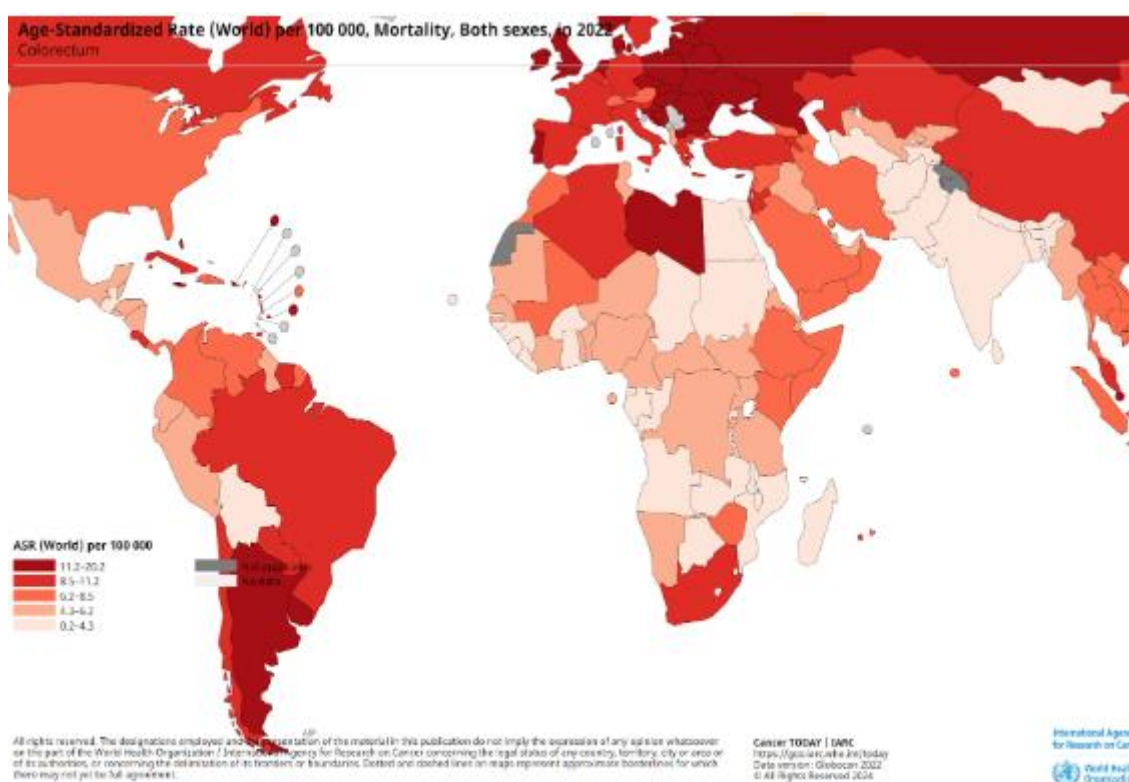


Figura 3. Mortalidad estimada de cáncer colorrectal (*Globocan*, ambos sexos) (6)

En España, los datos más recientes correspondientes a 2023 estimaron un total de 15.2385 muertes, de las cuales se atribuyen 9.077 y 6.307 muertes para hombres y mujeres, respectivamente (35). En ese año, las tasas de mortalidad se situaron en 32/100.000 habitantes, siendo Castilla y León la provincia con tasas de mortalidad más elevadas y Ceuta con las más bajas (57/100.000 y 15/100.000 habitantes, respectivamente) (35).

1.1.4.5 Supervivencia

A diferencia de los patrones de incidencia y mortalidad, las mejoras en el tratamiento de cáncer colorrectal han dado lugar a un aumento de la supervivencia con el tiempo. Generalmente, como resultado de la extirpación de pólipos y otros esfuerzos de detección temprana como son la sensibilidad mejorada de los procedimientos de diagnóstico y estratificación. La introducción de mejores pruebas de detección puede haber incrementado inicialmente las tasas de incidencia debido al diagnóstico de esta enfermedad no diagnosticada previamente, pero ha reducido la mortalidad a largo plazo gracias a la eliminación de pólipos precancerosos o sin metástasis (44). Desde las últimas décadas, las tasas de supervivencia de pacientes con cánceres locales y regionales diseminados han mejorado significativamente. No obstante, este progreso no se ha observado en aquellos pacientes con la enfermedad avanzada y/o metastásica (aproximadamente el 45% de los pacientes diagnosticados mueren por la enfermedad a pesar del tratamiento) (46).

El cáncer colorrectal es generalmente asintomático. Cuando aparecen los síntomas como el sangrado rectal, anemia o dolor abdominal, la mayoría de los pacientes ya se encuentran en un estadio avanzado, maligno y/o metastásico. Es por ello que los programas de detección se han propuesto e implementado ampliamente en los países desarrollados con el objetivo de cambiar esta distribución del cáncer colorrectal en etapas tempranas y mejorar los resultados de la terapia (47).

En los países de la Unión Europea, la tasa de supervivencia a cinco años para el cáncer de colon ha experimentado una mejora notable. Entre los periodos de tiempo 2000-2004 y 2010-2014, esta tasa aumentó del 54% al 60%. En el caso del cáncer de recto, también se observa una mejora en la supervivencia a los cinco años, pasando del 52% al 58% durante el mismo intervalo (48).

En España, las tasas de supervivencia a 5 años para las personas con cáncer colorrectal alcanza el 65% (49). Sin embargo, estas tasas pueden diferir considerablemente según localización tumoral y el estadio de la enfermedad. En este sentido, la tasa de supervivencia a 5 años para personas con cáncer de colon en estadio localizado es del 90%, mientras que para aquellos con estadio avanzado es inferior al 10%. Para el

cáncer de recto, estas tasas van del 70% a menos del 20%, dependiendo del estadio en que se encuentre la enfermedad (49,50).

1.1.4.6 Prevalencia

Los países de la Unión Europea donde observamos más incremento en las tasas de prevalencia a 5 años de cáncer colorrectal son Dinamarca, Noruega, los Países Bajos, Hungría, Croacia, Portugal, Eslovaquia y España (6).

Estimated number of prevalent cases (5-year), as a proportion (World), Both sexes, in 2022
Colorectum

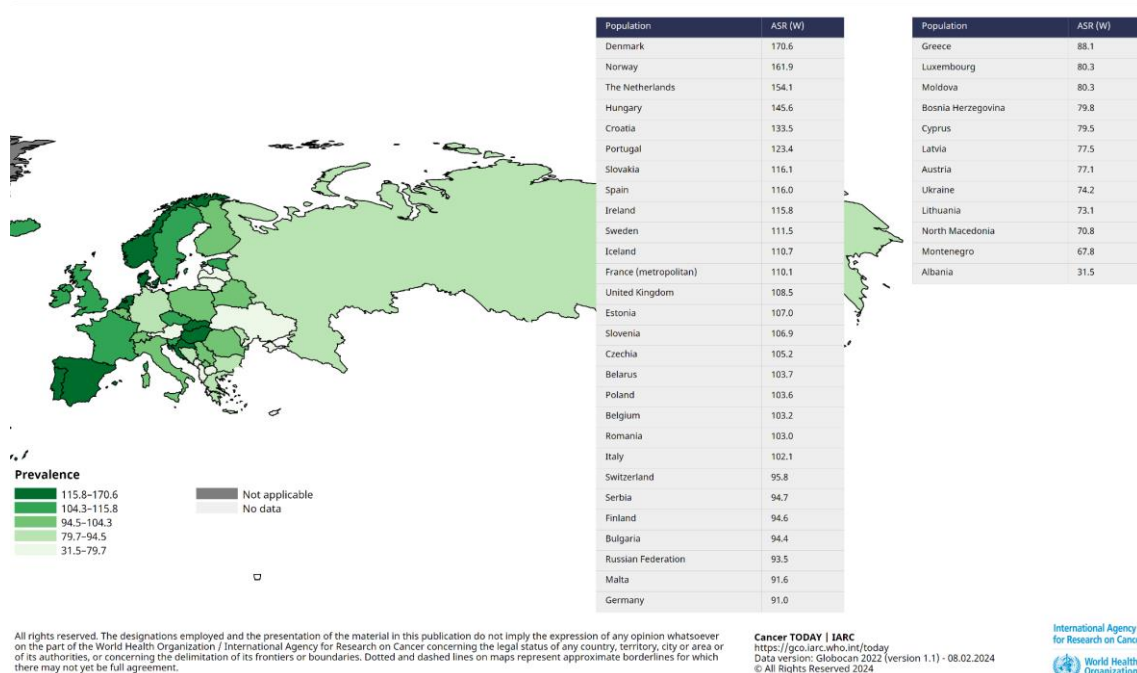
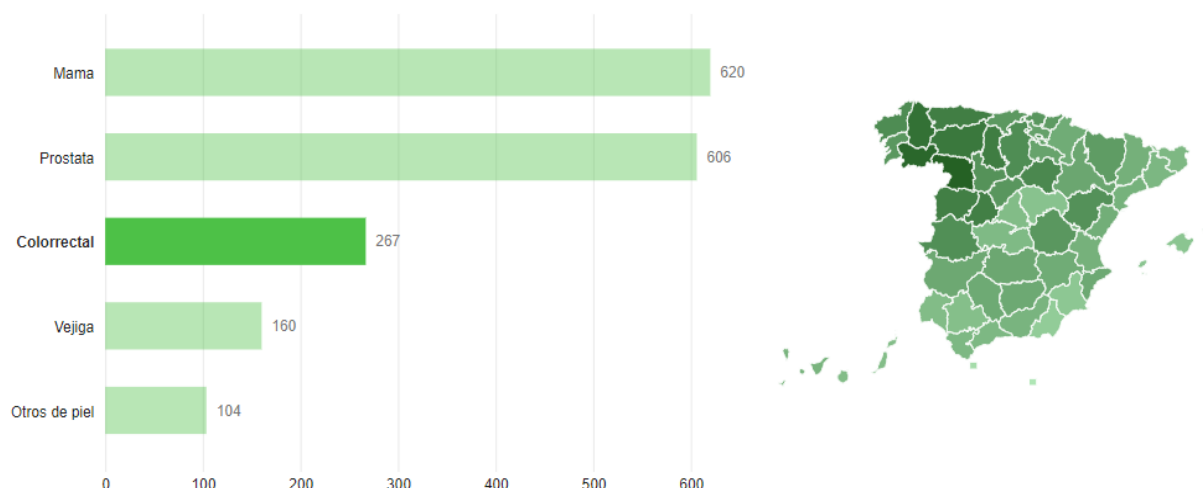


Figura 4. Número estimado de casos prevalentes (a los 5 años) para todas las edades en Europa (*Globocan*, ambos sexos) (6)

En España, la tasa de prevalencia a cinco años para este tipo de cáncer es de 267 por cada 100.000 habitantes (**Figura 5**). En detalle, esta tasa es de 330 por cada 100.000 hombres y de 206 por cada 100.000 mujeres (35). Las provincias de Castilla y León y Galicia, son las que presentan mayor prevalencia.

Ranking de prevalencia a 5 años por 100.000 habitantes por tipo de cáncer

**Figura 5.** Tasa de prevalencia (a los 5 años) para todas las edades en España (ambos sexos) (35)

En relación a los programas de detección temprana de cáncer de colon y de mama en este mismo país, se observó una disminución en la cantidad de personas cubiertas (es decir, aquellas que fueron invitadas a participar dentro de la población elegible). Esta disminución fue más notable durante los primeros tres meses de la pandemia y en el programa de cáncer colorrectal. Esto se debió principalmente a las características específicas del programa que dificultaron su reanudación o la llevaron a reanudarse más tarde. Estos hechos sugieren que en los años posteriores a 2020 se podría observar un aumento en los diagnósticos de cáncer en etapas más avanzadas debido a los retrasos en el diagnóstico (51).

1.1.5 Etiología

1.1.5.1 Factores de riesgo de estilo de vida del cáncer colorrectal

El informe del *WCRF/AICR CUP* publicado en 2018, presenta investigaciones globales sobre cómo ciertos factores de estilo de vida afectan el riesgo de desarrollar o prevenir cáncer colorrectal (10). En este informe, se recoge el nivel de evidencia científica disponible sobre cómo la dieta, la nutrición y la actividad física influyen en la prevención y la supervivencia de este tipo de cáncer. En total, este informe analizó 99 estudios de todo el mundo, que incluyeron a más de 29 millones de adultos y más de 247.000 casos de cáncer colorrectal. Dicho informe clasifica la evidencia en diferentes grados:

¹ Convincente: Existe evidencia lo suficientemente fuerte para apoyar una relación causal convincente.

² Probable: Existe evidencia lo suficientemente fuerte para apoyar una relación causal probable.

³ Sugestiva - limitada: La evidencia es demasiado limitada para permitir una relación causal probable o convincente.

⁴ Limitada - inconclusa: La evidencia es demasiado limitada para llegar a una conclusión firme.

Tabla 1. Nivel de evidencia científica sobre el impacto de factores de estilo de vida en el riesgo de cáncer colorrectal, adaptada del *Informe Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer del World Cancer Research Fund Institute y el American Institute for Cancer Research CUP, 2018* (10)

2018		DIETA, NUTRICIÓN, ACTIVIDAD FÍSICA Y CÁNCER COLORRECTAL	
		Reduce el riesgo	Aumenta el riesgo
FUERTE EVIDENCIA	Convincente	Actividad física ^{1,2}	Carne procesada ³ Bebidas alcohólicas ⁴ Grasa corporal ⁵ Altura alcanzada en la edad adulta ⁶
	Probable	Cereales integrales Alimentos que contienen fibra dietética ⁷ Productos lácteos ⁸ Suplementos de calcio ⁹	Carne roja ¹⁰
EVIDENCIA LIMITADA	Sugestiva	Alimentos que contienen vitamina C ¹¹ Pescado Vitamina D ¹² Suplementos multivitamínicos ¹³	Bajo consumo de verduras no almidonadas ¹⁴ Bajo consumo de fruta ¹⁴ Alimentos que contienen hierro hemo ¹⁵
	Sin conclusión	Cereales (granos) y sus productos; patatas; grasa animal; pollo; mariscos y otros productos del mar; composición de ácidos grasos; colesterol; ácido graso n-3 de la dieta provenientes del pescado; legumbres; ajo; fuentes no dietéticas de calcio; alimentos que contienen azúcares añadidos; azúcar (sacarosa); café; té; cafeína; carbohidratos; grasa total; almidón; carga glucémica; índice glicémico; folato; vitamina A, vitamina B6; vitamina E; selenio; bajo en grasa; metionina; beta-caroteno; alfa-caroteno; licopeno; retinol; ingesta energética; frecuencia de las comidas; patrones dietéticos.	

¹ Todos los tipos de actividad física: ocupacional, de hogar, transporte y recreativa.

² El panel concluye que la evidencia para el cáncer de colon es convincente. No se llegó a ninguna conclusión para el cáncer rectal.

³ El término carne procesada hace referencia a las carnes conservadas por ahumado, curado o salado, o mediante la adición de conservantes químicos.

⁴ Basado en la evidencia de que la ingesta de aproximadamente 30g de alcohol al día (2 bebidas al día).

⁵ La adiposidad corporal está determinada por el índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura o índice cintura-cadera.

⁶ La altura alcanzada en la adultez es poco probable que influya directamente en el riesgo de cáncer. Es un marcador de factores genéticos, ambientales, hormonales y nutricionales que afectan el crecimiento desde la preconcepción hasta la finalización del crecimiento lineal.

⁷ Incluye tanto los alimentos que contienen naturalmente el componente como los alimentos a los que se ha añadido el componente. La fibra dietética se encuentra en alimentos de origen vegetal.

⁸ Incluye evidencia de la ingesta total de lácteos, leche, queso y calcio dietético.

⁹ La evidencia se deriva de suplementos a una dosis superior a 200 miligramos por día.

¹⁰ El término "carne roja" se refiere a la carne de res, cerdo, cordero y cabra de animales domésticos.

¹¹ El panel considera que la evidencia para el cáncer de colon es limitada. No se llegó a ninguna conclusión para el cáncer rectal.

¹² Incluye evidencia de alimentos que contienen vitamina D, vitamina D sérica y vitamina D suplementaria.

¹³ Las definiciones y categorizaciones de los suplementos multivitamínicos no están estandarizadas.

¹⁴ Se observó un mayor riesgo en ingestas bajas (inferiores a 100 gramos por día).

¹⁵ Los alimentos incluyen carne roja y procesada, pescado y aves de corral.

Las variaciones en la relación entre el riesgo de cáncer colorrectal y las diferentes localizaciones tumorales, especialmente en el colon, todavía no son bien comprendidas. Sin embargo, algunos factores de riesgo están específicamente asociados con esta localización tumoral (52). Un ejemplo es el caso de la actividad física, que se ha visto que reduce de manera convincente¹ el riesgo de cáncer de colon, pero no tiene el mismo efecto en el cáncer de recto.

Evidencia convincente

Carne procesada

El vínculo entre el consumo de carne procesada y el aumento de riesgo de cáncer colorrectal es sólido y respaldado por evidencia convincente¹ (10). Los estudios analizados en el informe del *International Agency for Research on Cancer (IARC*, por sus siglas en inglés) mostraron un aumento de riesgo del 18% por cada 50 g/día de aumento de ingesta de carne procesada, clasificándose como cancerígeno para los humanos (Grupo 1) en el año 2015 (53). El término “carne procesada” se refiere a carnes conservadas mediante el ahumado, curado, salazón o la adición de conservantes químicos. La carne procesada comparte similitudes con la carne roja en su contenido de grasas, proteínas y hierro hemo, elementos que pueden estimular la formación de tumores mediante mecanismos explicados anteriormente (54). Además, también suelen cocinarse a altas temperaturas, provocando una mayor exposición a aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (54). Por otro lado, la carne procesada es también una fuente de compuestos N-nitrosos de origen exógeno que pueden tener un potencial cancerígeno (55,56).

Actividad física

La actividad física, incluyendo todos sus tipos: ocupacional, del hogar, transporte y recreación, disminuye el riesgo de cáncer de colon con una evidencia convincente¹ (10). Para el cáncer colorrectal, se observó una asociación inversa significativa con la actividad física total; mientras que, para el cáncer de recto no se observaron asociaciones significativas con la actividad física total ni con la actividad física recreativa (10).

La actividad física puede tener un efecto positivo en la reducción de la grasa corporal, reduciendo la resistencia a la insulina y la inflamación, y, por tanto, ser beneficioso para la disminución del riesgo de cáncer colorrectal. Sin embargo, no está del todo claro si la actividad física por sí sola, sin estar acompañada de pérdida de peso o de mantener un peso adecuado, tiene un efecto significativo en estas vías (57). Se han propuesto otros mecanismos para explicar el vínculo entre la actividad física y el cáncer colorrectal, donde destacan la función inmunitaria, la secreción de ácidos biliares, los cambios en el tiempo del tránsito gastrointestinal, y los perfiles lipídicos y hormonales (58). Además, también se sugiere que el incremento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca durante el ejercicio provoca un mayor flujo sanguíneo, pudiendo disminuir la cantidad de células tumorales al fomentar la necrosis celular (59).

Alcohol

El consumo de alcohol por encima de aproximadamente 30g al día (alrededor de 2 bebidas por día) es una causa convincente¹ de cáncer colorrectal, según lo publicado por el informe del *WCRF* y el *AICR* (10). En diferentes estudios realizados en la cohorte EPIC se constata esta asociación causal para este mismo cáncer (60–63), destacando un aumento importante de riesgo entre los participantes que bebían > de 3 bebidas/día frente a los que bebían 1 bebida/día (60). Particularmente, el riesgo era más alto entre aquellos individuos que bebían cerveza en comparación con aquellos que bebían vino (64,65). Recientemente, se ha sugerido que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de cáncer colorrectal en adultos jóvenes (66–68) pudiendo ser posible debido a que el consumo de alcohol ha ido aumentando en diversos países (69,70).

El principal mecanismo biológico detrás de la relación entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer colorrectal está probablemente relacionado con el acetaldehído (metabolito del etanol), el cual puede ser carcinógeno y genotóxico (71–73). Este metabolito puede interferir en mecanismos de reparación del ADN (74) y generar alteraciones en el equilibrio hormonal del cuerpo (75).

Grasa corporal

Un aumento en la grasa corporal (caracterizado por el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de cintura o la proporción cintura-cadera) es una causa convincente¹ de cáncer colorrectal. Tener más grasa corporal está relacionado con modificaciones en los patrones hormonales del cuerpo, pudiendo llevar a niveles más elevados de insulina y estimular el crecimiento de las células de cáncer de colon y dificultar su apoptosis (10). Se ha observado que niveles más altos de insulina y del factor de crecimiento insulinoide (*IGF-1*, por sus siglas en inglés) en sangre están vinculados con un aumento de cáncer colorrectal (76). Uno de los principales mecanismos detrás de esta asociación es que la acumulación de grasa en el cuerpo también activa una reacción inflamatoria en el organismo, produciendo citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF-alfa*, por sus siglas en inglés), la interleuquina-6 (*IL-6*) y la proteína C reactiva (77,78).

Altura

La altura alcanzada por un adulto es una causa convincente¹ de aumento de riesgo de cáncer colorrectal (10). No obstante, es poco probable que la altura que alcance un individuo tenga un efecto directo en el riesgo. Más bien, la altura es un indicador de una serie de factores genéticos, ambientales, hormonales y nutricionales que influyen en el crecimiento desde el momento de la concepción hasta el final del período de crecimiento lineal (79). Los mecanismos propuestos de esta relación incluyen una exposición más intensa a factores de crecimiento, como la hormona de crecimiento, y los factores de crecimiento similares a la insulina durante la niñez y el inicio de la adultez, junto con un exceso calórico en los primeros años de vida (79,80). Además, las personas más altas tienden a tener intestinos de mayor longitud, suponiendo más posibilidad de que exista un mayor riesgo de daño en el ADN debido a la exposición de agentes mutagénicos y cancerígenos (79).

Evidencia probable

Cereales integrales

Se considera cereal integral el arroz integral, el trigo integral, la avena, la cebada y el centeno. Su consumo probablemente² reduzca el riesgo de cáncer colorrectal (10). Este tipo de producto posee una gran variedad de nutrientes bioactivos y compuestos no nutricionales que incluyen la vitamina E, selenio, lignanos, cobre, cinc, fitoestrógenos, compuestos fenólicos y fibra dietética. Generalmente estos componentes se encuentran en las capas externas del grano (salvado y germen) y poseen potenciales propiedades anticancerígenas (81). El estudio EPIC ha demostrado asociaciones inversas entre los indicadores de la ingesta de trigo integral y centeno y el riesgo de cáncer colorrectal (82). Por otro lado, los cereales integrales se ha observado que pueden regular la respuesta glucémica (83) o que los ácidos fenólicos pueden estimular la actividad antioxidante (81,84).

Alimentos que contienen fibra dietética

La ingesta de alimentos que contienen fibra dietética probablemente² reduzcan el riesgo de cáncer colorrectal. Dentro de estos alimentos se incluyen aquellos que contienen fibra tanto de forma natural como aquellos alimentos a los que se les ha sido añadida (10).

Detrás de los mecanismos que puedan explicar esta asociación inversa, se encuentra la fermentación bacteriana en el intestino grueso, formando ácidos grasos de cadena corta como el butirato. Este último, en estudios experimentales, ha demostrado inhibir la proliferación de células de cáncer de colon, lo que sugiere un potencial efecto antitumoral (85,86). Otros mecanismos por los cuales una mayor ingesta de fibra dietética puede reducir el cáncer colorrectal incluye la aceleración del paso de los alimentos a través del intestino, ayudando a reducir el tiempo que los posibles agentes cancerígenos permanecen en contacto con el revestimiento del colon (84). Además, la fibra aumenta el volumen de las heces, disminuyendo la probabilidad de que agentes mutagénicos interactúen con la mucosa del colon (86).

Dietas altas en fibra podrían reducir también la resistencia a la insulina, la cual se considera un factor de riesgo para el cáncer colorrectal (87).

Productos lácteos y suplementos de calcio

El último reporte del *WCRF* y el *AICR* concluyó que el consumo de productos lácteos, leche, queso y calcio en la dieta se relacionan probablemente² con un menor riesgo de cáncer colorrectal a medida que aumenta su consumo (10). Esto se debe principalmente al alto contenido de calcio en estos productos, el cual ha sido asociado con efectos protectores (88). Además, se ha observado que las bacterias generadas por el ácido láctico también pueden contribuir a la protección contra este cáncer (89) y que la caseína y la lactosa de la leche pueden incrementar la biodisponibilidad del calcio (90,91). Otros nutrientes presentes en los productos lácteos como son la lactoferrina y la vitamina D también podrían tener efectos protectores contra el cáncer colorrectal. Sin embargo, la evidencia hasta el momento es sugestiva y limitada³ (10,54).

Carne roja

Se entiende como carne roja la carne proveniente de los músculos de mamíferos como carne de res, ternera, cerdo, caballo o cabra (92).

El consumo de carne roja es probablemente² una causa de cáncer colorrectal (10,53). Los estudios analizados en el último informe del *WCRF* y el *AICR* mostraron de manera constante que hay una asociación positiva entre el consumo de carne roja y el incremento de riesgo de cáncer colorrectal. Los datos de 24 estudios prospectivos sobre cáncer colorrectal mostraron un aumento del riesgo del 17% por cada 100 g/día de incremento de ingesta de carne roja (53). Aunque el resultado fue positivo, no se consideró estadísticamente significativo en el caso de cáncer colorrectal y cáncer de recto. Sin embargo, sí se encontró una relación significativa con el cáncer de colon (10).

Los mecanismos detrás de la posible relación entre la carne roja y el incremento de riesgo de cáncer colorrectal podrían deberse al alto contenido de hierro hemo en las carnes rojas, el cual se ha observado que promueve la formación de tumores en el colon tras estimular la formación endógena de compuestos N-nitrosos (*NOCs*, por sus siglas en inglés) (93). Además, el cocinado de las carnes rojas a altas temperaturas

conlleve la formación de aminas heterocíclicas y de hidrocarburos policíclicos aromáticos (94).

Nuevas tendencias alimentarias

Alimentos Ultraprocesados

En 2009, el sistema de clasificación de alimentos NOVA fue desarrollado por investigadores brasileños para permitir la categorización de los alimentos según el grado de procesamiento (95). A nivel mundial, se ha observado una tendencia hacia una dieta global cada vez más basada en alimentos ultraprocesados (*UPFs*, por sus siglas en inglés), contribuyendo aproximadamente entre el 25-60% de la ingesta diaria energética en los países de ingresos medios-altos (96). Se ha propuesto que diferentes características de los *UPFs* pueden causar problemas de salud, incluido el cáncer colorrectal. Por ejemplo, los *UPFs* están caracterizados por tener una alta densidad calórica, pudiendo promover un aumento de peso y obesidad, ambos factores de riesgo conocidos para este tipo de cáncer (97). Además, algunos tipos de edulcorantes (como la sacarina) y emulsionantes (como la carboximetilcelulosa) pueden interferir con la interacción huésped-microbiota, lo que podría provocar anomalías metabólicas y un ambiente proinflamatorio para la carcinogénesis del colon (98,99). Por otro lado, destaca la acrilamida, un contaminante presente en los *UPFs*, que puede ser generado durante el procesamiento y preparación de alimentos, especialmente mediante tratamientos a alta temperatura. Esta sustancia ha sido clasificada por la *IARC* como carcinógeno del Grupo 2A (probablemente carcinogénico para los seres humanos) (100) y en 2015, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria confirmó su carácter carcinogénico y genotóxico (101).

En este contexto, las últimas revisiones sistemáticas y metaanálisis han mostrado que un alto consumo de *UPFs* se ha asociado significativamente con un mayor riesgo de cáncer colorrectal (102,103).

Patrones dietéticos basados en alimentos de origen vegetal

La evidencia existente hasta el momento sugiere que el consumo de patrones dietéticos con un alto consumo de alimentos de origen vegetal reduce el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades (104,105). Estudios previos han demostrado que varios alimentos de origen animal, como las carnes rojas (53,106) y carnes procesadas (107), están relacionados positivamente con un aumento del riesgo de cáncer colorrectal, mientras que alimentos de origen vegetal, como cereales integrales (82,108), verduras y frutas (104), están asociados con un menor riesgo. No obstante, debido a la compleja interacción entre diversos alimentos y nutrientes en la dieta, resulta complicado estimar el efecto de un solo factor dietético. Tener en cuenta esta compleja interacción es complicado en estudios que se enfocan en factores dietéticos individuales; por eso, examinar los patrones dietéticos en relación con los resultados de enfermedades es un enfoque complementario esencial (109).

En las últimas décadas, se ha observado un aumento significativo en el número de personas que eliminan o reducen el consumo de carne en sus dietas (110,111). Este cambio en los hábitos alimenticios ha impulsado a diferentes estudios a predecir cuál será esta tendencia para los próximos años, destacando el crecimiento en la venta de nuevos productos, como la carne de origen celular y vegetal en su mayoría (112–114).

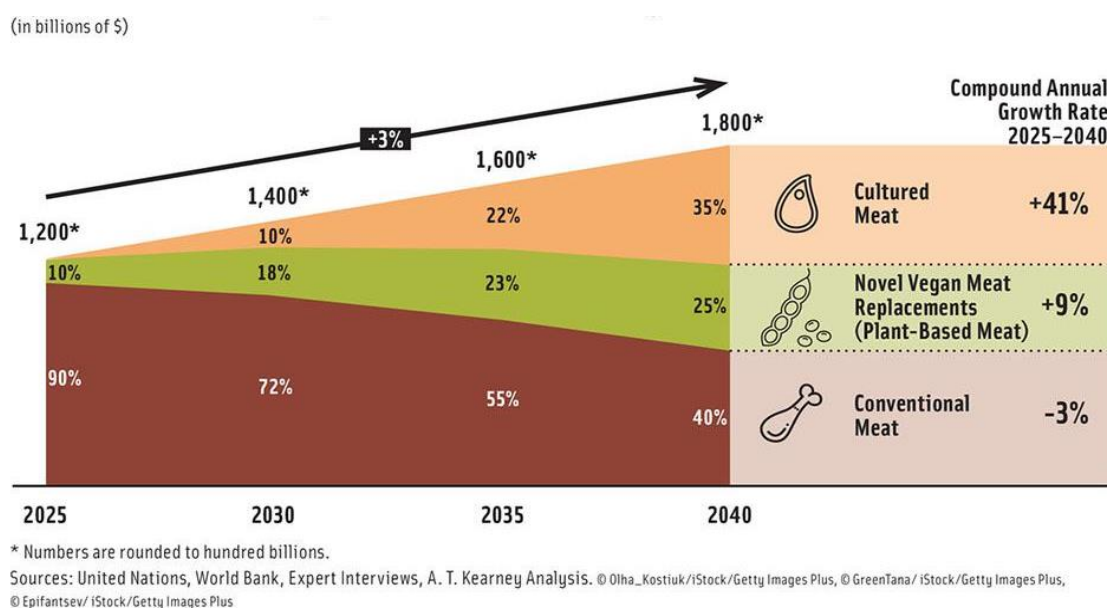


Figura 6. Tendencias del consumo global de carne (113)

En este contexto, aparece la dieta basada en alimentos de origen vegetal, la cual enfatiza un consumo elevado de este tipo de alimentos y una menor ingesta de alimentos de origen animal (115). Sin embargo, no todos los alimentos basados en alimentos de origen vegetal son necesariamente beneficiosos para la prevención del cáncer colorrectal, como los cereales refinados, los jugos de frutas, las bebidas azucaradas y los dulces/postres (108,116–118). Dentro de este escenario, se crearon tres patrones de dieta basados en alimentos de origen vegetal que incluyen: un índice de dieta basada en alimentos de origen vegetal general (*PDI*, por sus siglas en inglés), un índice de dieta basada en alimentos de origen vegetal saludable (*hPDI*, por sus siglas en inglés) y un índice de dieta basada en alimentos de origen vegetal no saludable (*uPDI*, por sus siglas en inglés) para evaluar su adherencia con varias enfermedades crónicas y mortalidad (119,120).

Se ha observado que la adherencia a dietas basadas en alimentos de origen vegetal de mayor calidad se ha asociado con un menor riesgo de incidencia de cáncer colorrectal (121,122). No obstante, aunque hay evidencia convincente o probable de la asociación de varios factores dietéticos individuales con el riesgo de cáncer colorrectal, el informe publicado por el *WCRF* y el *AICR* en 2018, concluyó que la evidencia sobre la asociación entre los patrones dietéticos y el riesgo de cáncer colorrectal es limitada e inconclusa por el momento (10).

Dentro de esta tendencia hacia patrones dietéticos basados en alimentos de origen vegetal y como respuesta a la creciente demanda de alternativas vegetales a la carne, han surgido los productos alternativos a la carne de origen vegetal (*PBMAs*, por sus siglas en inglés). Estos productos, han sido clasificados como *UPFs* por el contenido moderado-alto en carbohidratos, grasas totales y grasas saturadas, así como su alto contenido en sal y alta densidad calórica (123–125). Considerando este cambio de tendencias de consumo, sería de especial interés investigar su impacto en la salud a largo plazo y evaluar si realmente constituyen una opción más saludable en comparación con los productos cárnicos tradicionales.

1.1.5.2 Otros factores de riesgo: modificables y no modificables

Más allá de la relación entre la dieta, la actividad física y el riesgo de cáncer que encontramos en el informe del *WCRF/AICR CUP*, así como las nuevas tendencias alimentarias, el cáncer colorrectal puede estar asociado a otros factores de riesgo (126).



Tabla 2. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal (adaptado de *Ionescu VA., et al.*) (127)

Factores no modificables

Edad

El riesgo de desarrollar cáncer colorrectal aumenta conforme uno envejece. Aunque adultos más jóvenes también pueden padecerlo, su prevalencia es significativamente mayor después de los 50 años (128). La media de edad en diagnosticar el cáncer colorrectal en hombres es de 70 años, mientras que la media de edad en mujeres es de 72 años (129). Respecto al cáncer de recto, la edad promedio de diagnóstico también ronda los 70 años, tanto en hombres como en mujeres (130). No obstante, la incidencia del cáncer colorrectal está incrementando (2%) en adultos más jóvenes, debido en gran parte al aumento de casos de cáncer de recto. Aproximadamente el 11% de los casos de cáncer colorrectal se diagnostican en adultos menores de 50 años, pero las causas detrás de este fenómeno de momento se desconocen (9,131).

Sexo

La incidencia de cáncer colorrectal específico por edad es mayor en hombres que en mujeres. Además, los hombres presentan tasas de supervivencia más bajas en comparación con las mujeres. Variaciones como la exposición a factores de riesgo vinculados al cáncer colorrectal, así como las bases biológicas subyacentes, podrían ser las causas detrás de estas diferencias de género (132).

Raza

En Estados Unidos, las personas de raza negra presentan las tasas de incidencia más altas de cáncer colorrectal esporádico o no hereditario, con un aumento del 20% (133). Además, figura como una de las principales causas de muerte por cáncer dentro de esta población, con una tasa de mortalidad un 40% mayor en comparación con la mayoría de los demás grupos (9,133,134). Las mismas tendencias de incremento de riesgo y mortalidad se observan en los indígenas americanos y los nativos de Alaska (135). Las causas de estas disparidades son complejas, pero en gran medida se reflejan en diferencias en factores vinculados al estatus socioeconómico como por ejemplo la disponibilidad de atención médica (133).

Otros factores de riesgo

Padecer acromegalia, fibrosis quística o haber sido sometido a una colecistectomía o a irradiación abdominal pueden ser factores de riesgo para un aumento de cáncer colorrectal (136–140).

Factores modificables

Diabetes y resistencia a la insulina

La diabetes es un factor de riesgo para el cáncer colorrectal independientemente del IMC, la actividad física o el hábito de fumar (128,136). El mecanismo fisiopatológico subyacente parece estar relacionado con el aumento en los niveles séricos de insulina y *IGF-1*, donde la acción mitogénica de estos biomarcadores promueve la proliferación de células epiteliales colorrectales (142).

Microbiota intestinal

Diferentes estudios han reportado que la microbiota intestinal está involucrada en la carcinogénesis colorrectal (143,144). En pacientes con este tipo de cáncer, se han observado alteraciones en la composición de la microbiota intestinal así como una reducción de su diversidad (145,146). En este sentido, destaca la presencia más elevada de bacterias patógenas como *Bacteroides*, *Escherichia*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas* y menos abundancia de bacterias saprófitas, las cuales producen ácidos grasos de cadena corta (146). Se ha encontrado una relación entre los niveles reducidos de ácidos grasos de cadena corta y poblaciones con alto riesgo de cáncer colorrectal, como personas que padecen colitis ulcerosa (147) o adenoma colorrectal avanzado (148), así como poblaciones rurales de África (149), afroamericanos en Estados Unidos (150) y pueblos indígenas de Alaska (149).

1.2 CARNES PROCESADAS Y CÁNCER COLORRECTAL

1.2.1 Mecanismos subyacentes

Diferentes hipótesis se han propuesto en relación a los posibles mecanismos que podrían explicar la capacidad carcinogénica de la carne procesada. Una de ellas hace referencia a los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas, las cuales podrían desempeñar un papel relevante en la carcinogénesis al inducir mutaciones en el ADN (151,152). Otra, sugiere que el hierro hemo presente en la carne, mediante la peroxidación lipídica, y, por ende, la formación de compuestos N-Nitrosos (NOCs), produciría aldehídos citotóxicos y genotóxicos, contribuyendo al proceso carcinogénico (93). Otra hipótesis más reciente, sugiere la interacción entre el ácido N-glicolineuramínico (Neu5gc) y compuestos genotóxicos como un posible mecanismo adicional (153). Además, recientemente se ha propuesto que la vía N-nitroso constituye una explicación sobre cómo la carne tratada con nitrito favorece el desarrollo del cáncer (154).

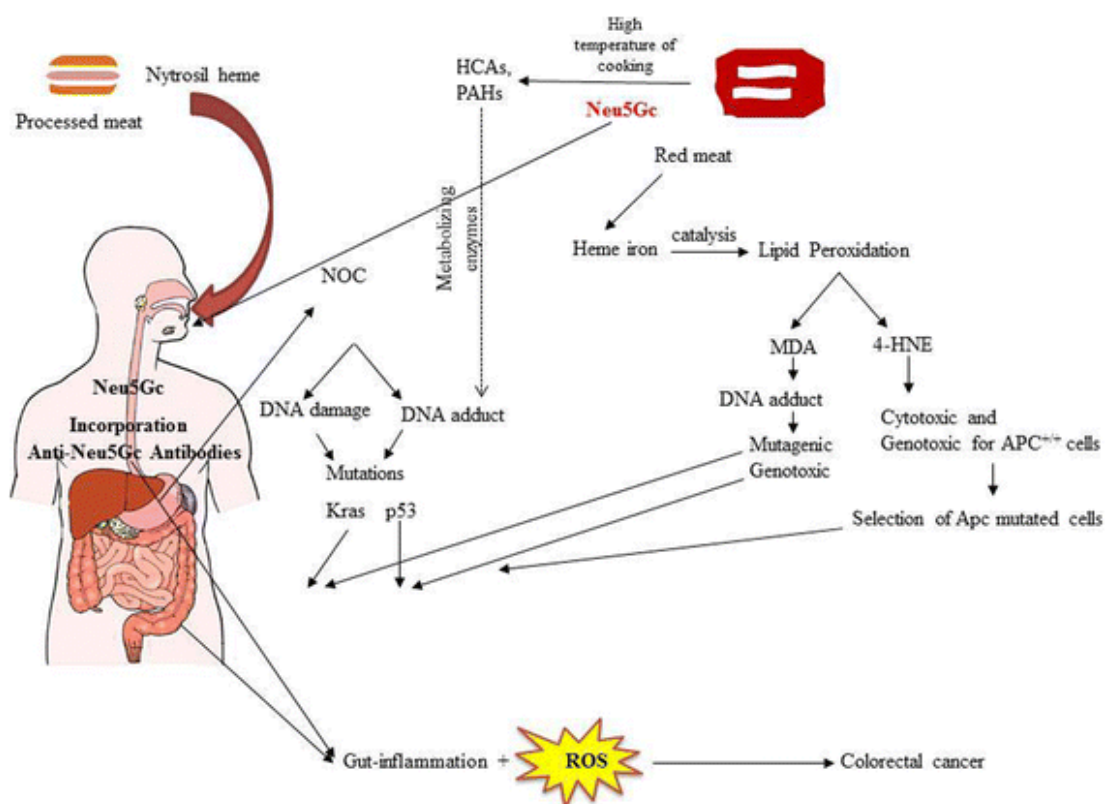


Figura 7. Resumen mecanismos subyacentes a la carcinogénesis de la carne roja y procesada en el cáncer colorrectal de acuerdo con *Casella M. et al.* (153)

1.2.1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas se describen como un grupo de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos (155). Estos compuestos pueden aparecer en los alimentos asados o a la parrilla y particularmente en las carnes (156,157). Concretamente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos suelen originarse por la creación de una llama o humo inducidos por el goteo de la grasa o por asar directamente en una superficie caliente (158). Además, pueden formarse durante procesos de preparación de alimentos, como es el ahumado de la carne (94). Por otro lado, las aminas heterocíclicas se producen cuando los aminoácidos, azúcares y creatinina del músculo del animal reaccionan a altas temperaturas (159). Los mecanismos de acción para ejercer sus efectos carcinógenos se basan en la unión de sus metabolitos en el ADN, pudiendo causar mutaciones e iniciar el proceso cancerígeno (151,152).

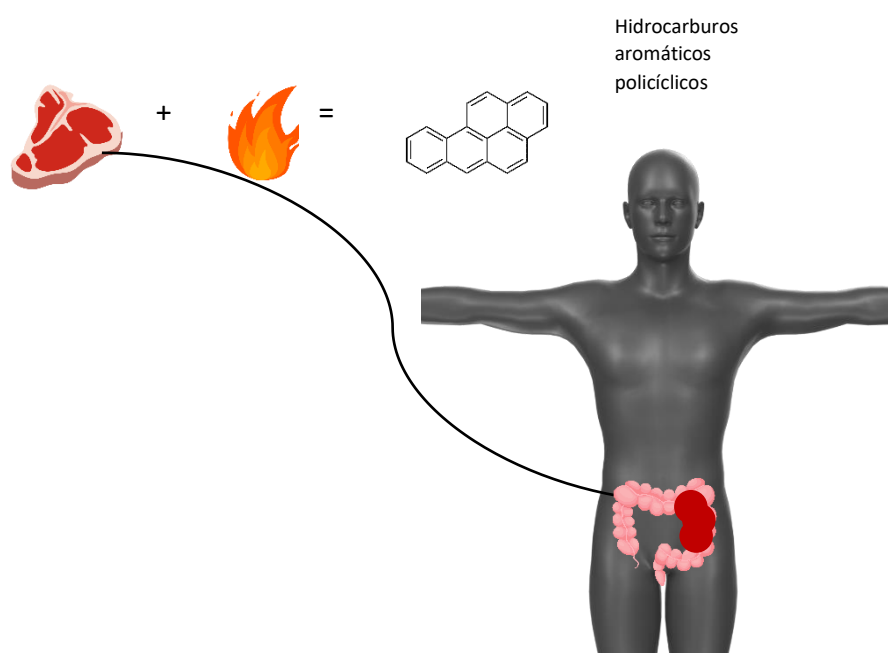


Figura 8. Hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados de la dieta y su papel patogénico en el cáncer colorrectal (adaptado de *Cheng et al.*) (158)

1.2.1.2 Neu5gc

El Neu5gc (ácido N-glicolilneuramínico) es un tipo de azúcar de ácido siálico que se encuentra en muchos mamíferos. Consta de nueve átomos de carbono y tiene una carga negativa. Se encuentra en los extremos de las cadenas de carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos en el cuerpo desarrollando diversas funciones (160). Los seres humanos no son capaces de sintetizarlo por sí mismos debido a la inactivación del gen CMP-Neu5Ac hidroxilasa (161). Sin embargo, la Neu5gc exógena se puede obtener a partir de fuentes dietéticas ricas en Neu5gc (en particular, a partir de la carne roja y la leche) y se incorpora metabólicamente a las células del tejido humano (162,163).

La presencia de Neu5gc a través de la dieta tiene un impacto en cómo el cuerpo produce anticuerpos específicos llamados anti-Neu5gc. Curiosamente, la cantidad y la variedad de anti-Neu5gc no parece depender del tipo de fuente alimentaria (independientemente si provienen de la carne o de productos lácteos) (160). Actualmente, existe una amplia evidencia en ratones que sugiere que los anti-Neu5gc desempeñan un papel importante en el agravamiento de diversas enfermedades mediadas por inflamación crónica (164–167).

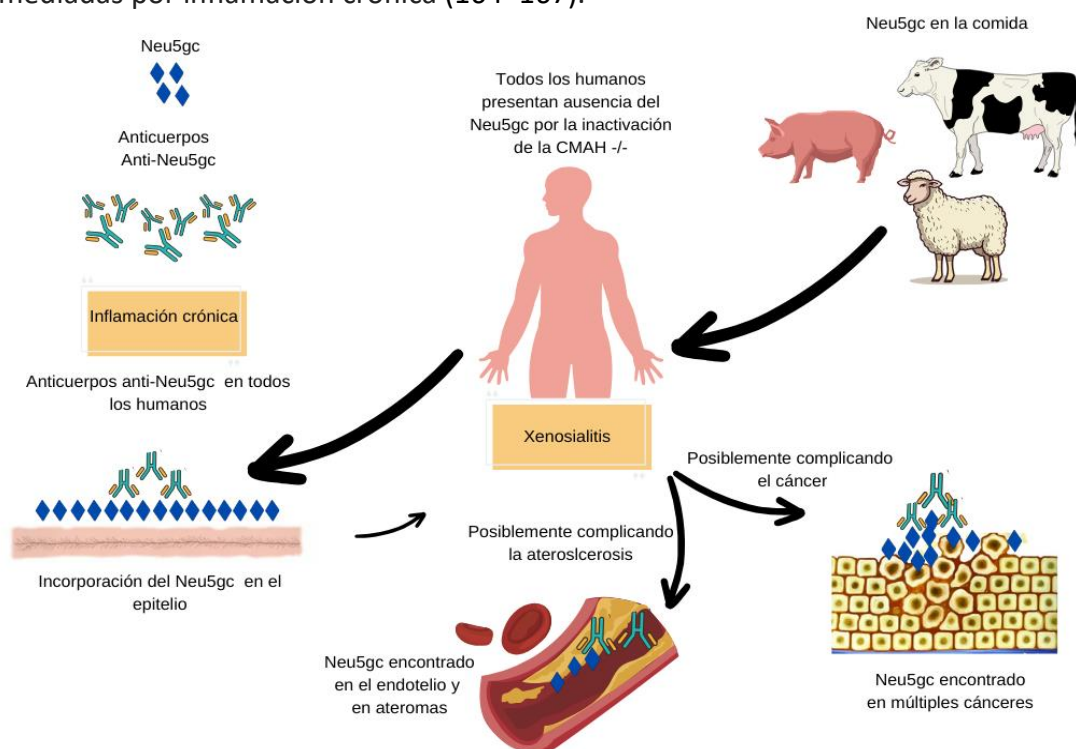


Figura 9. Implicaciones patológicas sugeridas del consumo, acumulación e inflamación posterior del Neu5gc en la aterosclerosis y el cáncer (adaptado de *Dhar Chirag et al.*) (166)

La xenosialitis es el término utilizado para describir la reacción inmunitaria que ocurre cuando los anticuerpos de un organismo se dirigen contra moléculas de ácido siálico presentes en tejidos y/o células de otro organismo (166). En ratones con deficiencia de Neu5gc humano, se ha demostrado que el proceso de xenosialitis contribuye a un mayor riesgo de desarrollar carcinomas hepatocelulares (168). Además, este mecanismo también impulsa el crecimiento de tumores (169). No obstante, la evidencia en humanos es limitada, por lo que se ha sugerido como posible hipótesis en relación a la ingesta de carne roja y procesada y el aumento de riesgo de cáncer.

1.2.1.3 Hierro hemo

El hierro hemo es la principal fuente de hierro de la carne roja, siendo su contenido diez veces mayor que el de la carne blanca (170). Entre el 15-40% del hierro hemo se absorbe en el duodeno (171) y se ha visto que se absorbe más fácilmente que el hierro de otras fuentes (172).

Los mecanismos a través de los cuales el hierro puede promover la carcinogénesis colorrectal son variados y han sido descritos anteriormente (173,174).

Respecto al hierro hemo, se ha demostrado que la carne consumida en la dieta puede promover la carcinogénesis colorrectal con un efecto aumentado directamente relacionado con la concentración de este compuesto (175).

Asimismo, se ha observado que las personas que consumen hierro hemo específicamente, muestran un aumento en la formación endógena de *NOCs* (93), los cuales son carcinógenos conocidos (176). Además, podrían contribuir indirectamente a aumentar el riesgo de este tipo de cáncer al generar radicales de peróxido lipídico y aumentar la producción de nitrosaminas carcinogénicas en el colon (93,177).

En relación a los radicales de peróxido lipídico, hace más de una década *Tappel A, 2007* dio lugar a lo que se conoce como “reacciones oxidativas en cadena”, idea que planteaba que el hierro hemo podría desencadenar el daño oxidativo de los lípidos y esto podría ser el punto de partida para el desarrollo del cáncer en los diferentes órganos, incluido el colon (178). Dentro de los productos de peroxidación lipídica, destacan el malondialdehído y el 4-hidroxinoneal, los cuales se consideran genotóxicos

y citotóxicos, así como participantes en el proceso de cáncer colorrectal (174). Los mecanismos de acción por los que se ha relacionado a estos productos con el aumento de riesgo de cáncer colorrectal se basan en la formación de nuevos aductos en el ADN, pudiendo inducir mutaciones e iniciar la carcinogénesis (179,180).

1.2.1.4 Compuestos N-Nitrosos

Los *NOCs* son sustancias a las que los seres humanos se ven expuestos a través de diferentes vías, como la alimentación, el humo del tabaco y otras fuentes ambientales (181). Estas sustancias son conocidas como compuestos N-nitroso exógenos. En condiciones ácidas, como las que se encuentran en los procedimientos de procesamiento de las carnes, se pueden formar agentes nitrosantes (dinitrógeno, tri y tetraóxidos) (182).

No obstante, en los últimos 20 años, se ha ido acumulando evidencia de un nuevo grupo de compuestos, llamados compuestos N-nitroso endógenos (94,183), de los cuales se ha sugerido que contribuyen entre el 45% y 75% de la exposición total (181). Un hallazgo relevante se estableció cuando se observó por primera vez que la ingesta de carne roja, a diferencia de la carne blanca, conllevaba un marcado aumento de *NOCs* en las heces de individuos. Además, se observó que a medida que la ingesta de carne roja aumentaba, las concentraciones de estos compuestos también lo hacían (184,185). Sin embargo, hay que tener en cuenta que también se forman estos compuestos cuando se calienta la carne a altas temperaturas, de modo que las concentraciones fecales medidas de estas sustancias pueden ser la suma de *NOCs* exógenos y endógenos (183). En relación a las carnes procesadas, los *NOCs* suelen estar presentes y se forman endógenamente después de su consumo, de la misma manera que tras el consumo de carne roja (182).

Se ha demostrado que el hierro hemo de la carne aumenta la formación de *NOCs* (93). No obstante, *Mirvish y colaboradores, (2001)* observaron que los hot dogs (mayoritariamente de origen porcino, por lo tanto, con menos hierro hemo) contienen 10 veces más *NOCs* que la carne roja fresca (186), lo que sugiere la posibilidad de que el procesamiento de la carne esté involucrado en este fenómeno. La presencia de *NOCs* en los alimentos se ha investigado extensamente debido a su estrecha relación

con el nitrito y los óxidos de nitrógeno. La interacción entre nitrito y óxidos de nitrógeno con compuestos amino secundarios y terciarios desempeñan un papel clave su formación (187). En 2001 se descubrió que el método de detección para estos compuestos abarcaba el nitrosilhemo y los S-nitrosotioles, además de nitrosaminas y nitrosamidas. Todos estos compuestos se agruparon bajo el término de compuestos N-nitrosos totales aparentes (ATNC, por sus siglas en inglés) (184).

En resumen, de acuerdo con la IARC, el consumo de nitritos que conducen a nitrosación endógena se considera probablemente cancerígeno para los seres humanos, clasificándose en el Grupo 2A (188).

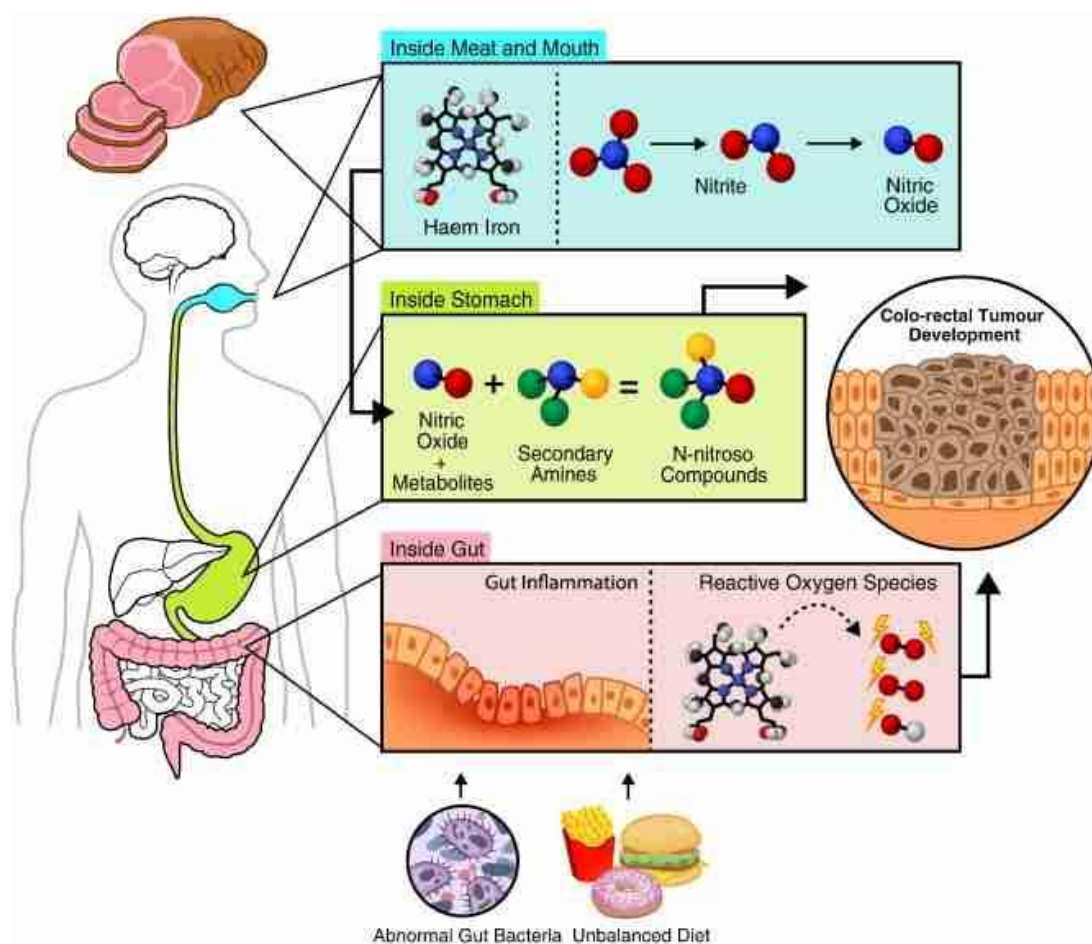


Figura 10. Mecanismos propuestos sobre los posibles riesgos para la salud asociados con el consumo de carne roja y procesada de acuerdo con *Oostindjer M., et al.* (189)

1.2.1.5 Nitrosilhemo

Exógeno

Los nitritos en diversos productos cárnicos actúan como importantes conservantes e impiden la proliferación de microorganismos no deseados (190,191). En la carne curada, se suele añadir nitrito para prevenir el desarrollo de microorganismos como el *Clostridium botulinum*, uno de los principales causantes de intoxicación alimentaria (192). Esta adición de nitrito en carnes procesadas puede promover la nitrosilación del hierro hemo, dando lugar al compuesto conocido como nitrosilhemo. La nitrosilación del hierro hemo podría posiblemente explicar los mayores efectos cancerígenos encontrados de la carne procesada en comparación con la carne roja (182). Esta hipótesis surge al observar que la carne roja aumenta el riesgo de cáncer colorrectal pero que la carne procesada, parece estar vinculada a un riesgo incluso más elevado para este mismo cáncer. Por lo tanto, se sugiere que la forma del hemo (en el caso de la carne procesada, nitrosilado por el curado de la sal) marca la diferencia (182).

En este sentido, la cocción de la carne curada puede liberar el nitrosilhemo formado de la mioglobina (193). Se contempla la posibilidad de que el nitrosilhemo, junto con la abundante existencia de precursores de compuestos N-nitrosos ya presentes en la carne procesada, conduzcan a una mayor exposición de compuestos N-nitrosos, tanto los formados exógenamente como los formados endógenamente (182,194,195). Esta combinación, podría ser la causa detrás de los efectos cancerígenos más pronunciados en la carne procesada que en la carne roja.

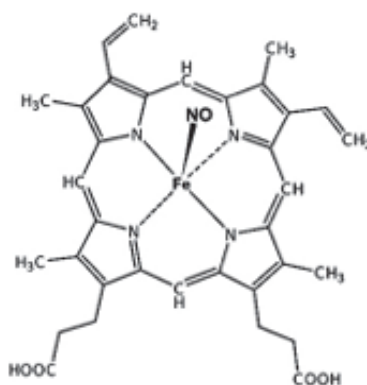


Figura 11. Estructura molecular del nitrosilhemo de acuerdo a *Bastide N. M et al.* (174)

Endógeno

Endógenamente, las tres especies principales presentes en compuestos N-nitrosos que podrían formarse a partir del nitrito acidificado en el estómago son los nitrosilos del hierro (formados a partir del hemo), los S-nitrosotioles (formados a partir de la S-nitrosación de los grupos tiol de la dieta) y las N-nitrosaminas (formadas a partir de la nitrosación de aminas secundarias) (196). En 2007, se demostró por primera vez que los S-nitrosotioles y el nitrosilhemo se forman en el tracto gastrointestinal y se excretan a través de las heces tras el consumo de carne roja (197). De la misma manera, varios estudios que enumeran el tipo de *NOCs* encontrados después de la ingestión de carne roja indican que se componen principalmente de nitrosilhemo (83-86%) y nitrosotioles (197,198).

En estudios experimentales se respalda la idea de que los S-nitrosotioles son formados en medio ácido del estómago (197). Tan pronto como los S-nitrosotioles alcanzan el medio alcalino del intestino delgado, se vuelven inestables y pueden degradarse en óxido nítrico mediante una reacción catalizada por cobre (199). En condiciones alcalinas, el óxido nítrico puede reaccionar con moléculas hemo (200), formando el nitrosilhemo (197). Se ha demostrado que el óxido nítrico derivado de los S-nitrosotioles y el nitrosilhemo por sí solos pueden favorecer la proliferación y metástasis de las células tumorales (201–203). Además, se ha observado que estos compuestos pueden inducir la nitrosación de moléculas como el aminoácido glicina, pudiendo afectar a sus funciones biológicas y contribuir a la formación de nitrosaminas, compuestos conocidos por su potencial cancerígeno (204).

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Justificación

La ingesta de carne roja y carne procesada se ha relacionado con diferentes efectos de salud, incluyendo un mayor riesgo de mortalidad total, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer (10,205,206). En 2015, la *IARC* (53) clasificó las carnes procesadas como "cancerígenas" (grupo 1) y la carne roja como "probablemente cancerígena" (grupo 2A) para los seres humanos. En la misma línea, en 2018, el *WCRF/AICR CUP* publicó su tercer informe de expertos en el que recomienda limitar el consumo de carne roja a cantidades moderadas y evitar en la medida de lo posible las carnes procesadas, siguiendo estas recomendaciones para reducir el riesgo de cáncer (10).

Se han propuesto diversas hipótesis para la relación entre la ingesta de carne roja y procesada y el riesgo de cáncer. Principalmente, estas explicaciones se basan en su contenido de compuestos mutagénicos y carcinogénicos (53). La creciente importancia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas heterocíclicas y los compuestos N-nitrosos exógenos en la carcinogénesis colorrectal (183), podría apoyar esta explicación.

Paralelamente, metaanálisis de estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de hierro hemo puede explicar la asociación entre la ingesta de carne roja y diferentes tipos de cáncer (207,208). Es precisamente el alto contenido de hierro hemo, en forma de mioglobina, lo que le confiere a la carne su color rojo oscuro. En las carnes procesadas, es el nitrito presente en la sal del curado el que causa la nitrosilación de la molécula de hierro hemo y provoca la formación de un compuesto denominado nitrosilhemo, que resulta en su liberación de la mioglobina durante el proceso de curado y/o cocción (193). Algunos estudios han propuesto que el nitrosilhemo puede ser potencialmente más tóxico que la propia molécula de hierro hemo (182,209), lo que podría ser una de las razones por las cuales las carnes procesadas se asocian más fuertemente con el cáncer en comparación con la carne roja fresca. En concreto, un estudio publicado por *Santarelli et. al.*, (182) estima que un gramo de carne procesada aumenta el riesgo de cáncer colorrectal entre 2 y 11 veces más el riesgo que un gramo

de carne roja fresca. Por lo tanto, la carne procesada parece estar más estrechamente asociada con el riesgo de cáncer colorrectal que la carne roja fresca. Los resultados del mismo grupo (210), han mostrado que la carne con un contenido elevado de hierro hemo, nitrito y cocinado, aumentó significativamente el nivel fecal de los *ATNC* y el número de mutaciones en el colon en comparación con la carne proveniente de la dieta de control ($P < 0,05$).

Por otro lado, varios autores han demostrado que el hierro libre, el hierro hemo y el nitrosilhemo pueden inducir la formación de especies reactivas de oxígeno y que esto finalmente podría desencadenar mutaciones genéticas y daño celular (196,211,212). Sin embargo, esta hipótesis no ha sido testada en estudios epidemiológicos.

La principal limitación es que no hay tablas de composición o información disponible en alimentos sobre el contenido de nitrosilhemo, y, respecto a las tablas de composición de hierro hemo, se han encontrado en Tailandia y Estados Unidos (213,214), pero las cifras sobre carnes procesadas, tanto para el hierro hemo como para el nitrosilhemo, son limitadas en Europa.

A pesar de que la evidencia científica es convincente sobre asociación entre las carnes procesadas y el riesgo de cáncer colorrectal, el no poder encontrar evidencias y recomendaciones específicas sobre qué alimentos son los responsables y cuáles tenemos que moderar o limitar su consumo, resulta contradictorio y en muchos casos difícil de llevar a la práctica de la población.

Dado que la literatura consultada se refiere a carnes procesadas, a lo largo de esta tesis se emplearán indistintamente los términos carnes procesadas y derivados cárnicos para hacer referencia al mismo concepto. No obstante, es importante destacar que la categoría de derivados cárnicos engloba tanto los preparados como los productos cárnicos, lo que proporciona una definición más extensa y completa.

Las carnes procesadas engloban un grupo amplio y heterogéneo que muchas veces no es correctamente recogido en los cuestionarios alimentarios, haciendo evidente la necesidad de profundizar en este campo de investigación. No solamente desde el punto de vista etiológico, sino para que la evidencias sean traducidas en recomendaciones específicas para la población.

Dado que en España se consumen cantidades elevadas de distintos tipos de derivados cárnicos de composición heterogénea, contar con esta información nos permitirá:

- 1) Contar con una base de datos sobre el contenido de nitrosilhemo y hierro hemo en carnes procesadas de calidad, que permita estimar sus niveles de ingesta en nuestra población.
- 2) Estudiar el efecto de la exposición a estas sustancias en el proceso de la carcinogénesis colorrectal tanto a nivel español como europeo.

2.2 Hipótesis

Nuestra principal hipótesis es que el nitrosilhemo y hierro hemo podrían ser los responsables de la relación comprobada entre el consumo de carnes procesadas y el riesgo de cáncer colorrectal. Por lo tanto, creemos que contar con datos fiables sobre su contenido en derivados cárnicos, permitirá una correcta evaluación de su nivel de exposición y así luego poder evaluar correctamente su efecto en el riesgo de cáncer colorrectal.

Más específicamente, las hipótesis de este trabajo son:

Hipótesis I:

El método por *HPLC* proporciona estimaciones más precisas que el método de *Hornsey* debido a la posible interferencia de ciertos compuestos, como las Cinc-Protoporfirinas y otros ingredientes, que pueden conducir a una sobreestimación de los compuestos de hemo cuando se emplea el método espectrofotométrico clásico de *Hornsey*.

Hipótesis II:

El contenido de nitrosilhemo y hierro hemo difiere según los diferentes tipos de derivados cárnicos y técnicas de cocción.

Hipótesis III:

La ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo, procedente del consumo de derivados cárnicos, varía según las diferentes variables sociodemográficas, regionales y de estilo de vida de la población española.

Hipótesis IV:

La ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo, a través del consumo de derivados cárnicos, está asociado al aumento de riesgo de cáncer colorrectal y podría variar según localización tumoral, tanto a nivel español como europeo. Además, se hipotetiza que otros factores de riesgo podrían interactuar modificando la asociación con este tipo de cáncer.

3. OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis es profundizar en la investigación del rol de los compuestos presentes en las carnes procesadas y su relación con el riesgo de cáncer colorrectal, principalmente a través de la determinación del nitrosilhemo y hierro hemo en una gran cantidad de derivados cárnicos españoles. La evidencia sugiere que estas sustancias son clave para explicar la relación científicamente comprobada entre el consumo de carnes procesadas y el riesgo de cáncer colorrectal.

Esta tesis se llevó a cabo en el marco del estudio EPIC, un estudio de cohortes multicéntrico europeo que incluye a más de medio millón (521.000) de participantes reclutados en 10 países europeos. De los cuatro artículos incluidos en esta tesis, los 3 primeros se realizaron como parte del estudio EPIC-España, englobando a un total de 41.000 individuos de 5 regiones de España. El último artículo, se realizó como parte del estudio EPIC a nivel europeo, incluyendo un total de siete países (Francia, Italia, España, Reino Unido, Alemania, Países Bajos y Dinamarca) y más de trescientos mil participantes.

El **objetivo central** de la tesis fue estructurado en **tres objetivos**:

Objetivo I.

Medir el contenido de nitrosilhemo y hierro hemo en más de 50 derivados cárnicos identificados a través de los cuestionarios de consumo de la cohorte EPIC-España mediante dos métodos analíticos.

Objetivos específicos.

I.I Comparar la precisión del método *HPLC* con el método de *Hornsey* en la estimación de compuestos de hemo, evaluando la interferencia de compuestos como Cinc-Protoporfirinas y otros ingredientes en el método espectrofotométrico clásico de *Hornsey*.

I.II Incorporar información adicional en relación a otras sustancias, métodos de conservación, cocción y elaboración.

Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives

Autores: Ricard Bou & Andreu Farran-Codina, **Lucía Rizzolo-Brime**, Jacint Arnau, Gerard Sabeña, Paula Jakszyn.

Artículo publicado en *Journal of Food Composition and Analysis* (2024); 125.

Objetivo II.

Estimar la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo en individuos de la cohorte española del EPIC basado en la determinación de laboratorio de estos compuestos mediante el método *HPLC*.

Objetivos específicos.

II.I Describir las diferencias de dicha ingesta según variables sociodemográficas, regionales y de estilo de vida.

II.II Identificar los derivados cárnicos que más contribuyeron a niveles más altos de ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo en los sujetos del EPIC-España.

Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats in subjects from the EPIC-Spain cohort.

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Andreu Farran-Codina, Ricard Bou, Leila Lujan-Barroso, Jose Ramón Quirós, Pilar Amiano *et al.*

Artículo publicado en *Nutrients* (2024) Mar 18;16(6):878.

Objetivo III.

Estudiar la asociación entre la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo de los derivados cárnicos y el riesgo de cáncer colorrectal en sujetos de la cohorte EPIC España.

Objetivos específicos.

III.I Analizar si el riesgo de cáncer colorrectal varía en función de los subtipos y localizaciones tumorales.

III.II Secundariamente, examinar si la relación entre la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal varía dependiendo del valor de otros factores de riesgo como el IMC, la actividad física, el hábito de fumar y el consumo de alcohol.

Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Leila Lujan-Barroso, Andreu Farran-Codina,

Ricard Bou, Cristina Lasheras, Pilar Amiano *et al.*

Artículo publicado en *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2024; 33(6): 854–856.

Adicionalmente, se plantea el **objetivo IV** de analizar el rol del nitrosilhemo en la asociación con el cáncer colorrectal, pero en este caso centrado en los sujetos de la cohorte europea EPIC.

IV.I Estimar la ingesta de nitrosilhemo en individuos de la cohorte europea del EPIC basado en la extrapolación de los datos obtenidos a nivel español, teniendo en cuenta criterios de formulación, procesamiento y cocción.

IV.II Estudiar la asociación entre la ingesta de nitrosilhemo de los derivados cárnicos y el riesgo de cáncer colorrectal en sujetos de la cohorte EPIC Europa.

Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study.

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Leila Lujan-Barroso, Andreu Farran-Codina,

Ricard Bou, Genevieve Nicolas, Inge Huybrechts, *et al.*

Artículo no publicado (manuscrito en preparación).

4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS



4. MATERIAL/MÉTODOS Y RESULTADOS

-Resumen – Resultados

Artículos	Factor de Impacto *	Categoría y rango de la revista	Comunicaciones
Artículo I: Bou R. and Farran-Codina A., Rizzolo-Brime L. , Jacint A., Sabeña G., and Jakszyn P. Iron, Heme, and Nitrosyl-Heme Content in Spanish Meat Derivatives. <i>Journal of Food Composition and Analysis</i> , 2024;125(105832) https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4573041	FI: 4.0	Food Science & Technology Quartile 2	Este trabajo fue presentado como comunicación oral en el <i>VI Congreso de alimentación, nutrición y dietética</i> , celebrado en Barcelona del 24 al 25 de noviembre de 2023.
Artículo II: Rizzolo-Brime L. , Farran-Codina A., Bou R., Lujan-Barroso L., Ramón Quirós J., Amiano P., et al. Nitrosyl-Heme and Heme Iron Intake from Processed Meats in Subjects from the EPIC-Spain Cohort. <i>Nutrients</i> , 2024 18;16(6):878. https://doi:10.3390/nu16060878 .	FI: 4.8	Nutrition & Dietetics Quartile 1	Este trabajo fue presentado como comunicación oral en el <i>VI Congreso de alimentación, nutrición y dietética</i> , celebrado en Barcelona, España del 24 al 25 de noviembre de 2023.
Artículo III: Rizzolo-Brime L. , Lujan-Barroso L., Farran-Codina A., Bou R., Lasheras C., Amiano P., et al. Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort. <i>Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention</i> , 2024;33(6): 854–856 https://doi:10.1158/1055-9965.EPI-24-0211 .	FI: 3.7	Public, environmental & occupational health Quartile 1	Este trabajo fue presentado en formato póster en el <i>Nutrition Society Congress 2024</i> celebrado en Belfast, Reino Unido, del 2 al 5 de julio de 2024
Artículo IV: Rizzolo-Brime L. , Lujan-Barroso L., Farran-Codina A., Bou R., Nicolas G., Huybrechts I., et al. Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study. Estado: Artículo no publicado (manuscrito en preparación).	-	-	-
FI: Factor de Impacto *Fecha de acceso: 25 de Junio de 2024			

4.1 Artículo I: Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives

El hierro es un micronutriente esencial que desempeña un papel fundamental en el cuerpo humano y está involucrado en diversos procesos metabólicos, incluyendo el transporte de oxígeno y electrones, así como el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico y el metabolismo de ADN. Se encuentran dos variantes de hierro en la alimentación: hierro hemo y hierro no-hemo. El hierro hemo constituye una fracción pequeña del hierro total presente en los alimentos y presenta una absorción de entre un 15 y 40%. Se encuentra presente principalmente en la carne y el pescado, siendo considerablemente más abundante en la mioglobina de la carne roja. Respecto al hierro no-hemo, a pesar de que representa una mayor proporción del hierro alimentario y encontrándose tanto en alimentos vegetales como en animales, presenta una absorción más limitada (entre un 1 a un 40%).

A través del procesamiento de la carne, mediante la adición de sales de nitrito y/o nitrato, la molécula hemo es nitrosilada promoviendo la formación de un compuesto llamado nitrosilhemo, el cual es liberado de la mioglobina durante la cocción y/o curado.

Se ha propuesto que el nitrosilhemo es más tóxico que la molécula hemo en sí y que esto podría ser una de las razones por las cuales las carnes procesadas están más intensamente relacionadas con el cáncer que la carne fresca. Sin embargo, hasta la fecha no existen tablas de composición ni información disponible sobre el contenido de nitrosilhemo en los alimentos.

En este estudio obtuvimos datos representativos fiables sobre la composición de hierro libre, hierro hemo y nitrosilhemo en derivados cárnicos consumidos en España. Además, se comparó el método espectrofotométrico clásico descrito por *Hornsey* con la determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

Mediante el método espectrofotométrico clásico de *Hornsey*, se detectaron contenidos elevados de hierro hemo en aquellos derivados cárnicos que contenían sangre (sangrecilla, morcillas, morcón negro), mientras que en los derivados cárnicos

curados en seco (panceta o tocino) el contenido encontrado fue bajo. En derivados cárnicos como la cecina o el paté, se observaron altos contenidos de hierro hemo, atribuidos al uso de la carne de res en lugar de cerdo y por el uso del hígado (víscera rica en sangre), respectivamente. Respecto al nitrosilhemo, el mayor contenido se encontró en la sangrecilla y en los diferentes tipos de morcillas, a pesar de que no se esperaba que fueran una fuente significativa del mismo, ya que no se utilizan agentes nitrificantes añadidos en sus formulaciones. Por otro lado, no se detectaron contenidos en el tocino o el bratwurst.

Mediante el método *HPLC*, los derivados cárnicos con un alto contenido de hierro hemo, como los que contiene sangre (morcillas, sangrecilla o morcón negro) y cecina (carne de res) dieron como resultados contenidos más bajos que con el método espectrofotométrico de *Hornsey*. Igual que con el hierro hemo, la evaluación del contenido de nitrosilhemo mediante *HPLC* arrojó algunos resultados controvertidos en comparación con la medición espectrofotométrica de *Hornsey*.

En conclusión, parece que la formulación de ciertos productos puede interferir con la cuantificación de hemo y nitrosilhemo mediante la determinación espectrofotométrica. Sin embargo, la variabilidad del hemo, nitrosilhemo y la eficiencia de curado sigue siendo alta independientemente de la metodología, lo que resalta la necesidad de bases de datos de derivados cárnicos más precisas. A pesar de esto, los niveles de hierro hemo y nitrosilhemo informados en derivados cárnicos, especialmente aquellos obtenidos con *HPLC*, son útiles para evaluar de manera más exacta el consumo de estos compuestos en la población española, proporcionando estimaciones más precisas que las de la literatura para poblaciones europeas.

ARTÍCULO I

Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives

Autores: Ricard Bou, Andreu Farran-Codina, **Lucía Rizzolo-Brime**, Jacint Arnau, Gerard Sabeña, Paula Jakszyn.

Artículo publicado en: *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024; 125(105832)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives

Ricard Bou^{a,*}, Andreu Farran-Codina^{b,1}, Lucía Rizzolo-Brime^c, Jacint Arnau^a, Gerard Sabeña^a, Paula Jakszyn^{c,d}^a Food Safety and Functionality Program, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Monells, Finca Camps i Armet s/n, 17121, Spain^b Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, Santa Coloma de Gramenet, E-08921 Barcelona, Spain^c Unit of Nutrition and Cancer, Cancer Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain^d Blanquerna School of Health Sciences, Ramon Llull University, Barcelona 08025, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Porphyrins

Curing agents

Nitrifying agents

Meat products

Zn-protoporphyrin

Macronutrients

ABSTRACT

Heme and nitrosyl-heme have been pointed out as responsible for the association between processed meats and cancer. The objective of this study was to obtain reliable data on the current proximate composition, total iron, total heme, zinc-protoporphyrin, and nitrosyl-heme content in 40 meat derivatives consumed in Spain. The determination of heme and nitrosyl-heme was achieved using the classical spectrophotometric determination of the acetone extracts and compared with the chromatographic determination of these extracts which enables the separation of other porphyrins. Results revealed a high variability of heme and nitrosyl-heme contents in meat derivatives which may reflect differences in meat derivatives ingredients and formulations, manufacturing processes, storage, and cooking conditions. In addition, certain derivatives contain considerable amounts of nitrosyl-heme despite the fact there was no addition of nitrite or nitrate. Although the comparison of both methodologies for heme and nitrosyl-heme determination were in good agreement, the chromatographic method is advisable as some interfering compounds may lead to an overestimation when using the classical spectrophotometric determination. In the Spanish adult population and based on the obtained data the estimated total iron, nitrosyl-heme, and total heme intakes resulting from meat derivatives consumption, were 14.6 mg/day, 528.6 µg/day, and 1676.2 µg/day, respectively.

1. Introduction

Red and processed meats are important contributors of several important nutrients to the human diet. Processed meats may undergo different processing steps (e.g., grinding, salting, fermentation, smoking, drying as well as the addition of several ingredients and additives) that increase their shelf life and/or improve their taste. In times when cold storage was nonexistent or scarce, it was meat processing that extended shelf life. However, high intakes of red and processed meats have been positively associated with an increased risk of different types of cancer, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes (Wolk, 2017; Santarelli et al., 2008).

The chemical components responsible for this possible relationship and the biochemical mechanisms involved have not yet been fully identified. Some candidates have been proposed: saturated fat, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic aromatic amines, advanced glycation end products, trimethylamine-N-oxide, heme iron, nitrite, nitrate, and N-nitroso compounds (Wolk, 2017). Red and processed meat are rich in heme iron, which is more bioavailable than non-heme iron. Processing of meat through the addition of nitrite and/or nitrate salts for curing leads to the formation of nitrosyl-heme (NO-heme) compounds. Free iron, heme iron, and NO-heme iron all induce the formation of reactive oxygen species, which could eventually lead to cellular damage and gene mutations (Wolk, 2017). Santarelli et al. (2008) and Pierre

Abbreviations: AOAC, Association of Official Analytical Chemists; EPIC, European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; FW, fresh weight; HPLC, High-performance liquid chromatography; IR, interquartile range; ISO, International Organization for Standardization; MPrd, meat products; MPrp, meat preparations; ND, not detected; NO, nitric oxide; NO-heme, nitrosyl-heme; Tr, trace amounts.

* Corresponding author.

E-mail address: ricard.bou@irta.cat (R. Bou).¹ These authors contributed equally.<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105832>

Received 29 August 2023; Received in revised form 6 November 2023; Accepted 10 November 2023

Available online 15 November 2023

0889-1575/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

et al. (2010) proposed that NO-heme in processed meats could be more harmful to health than heme iron and could be one of the reasons why processed meats are more intensely related to cancer than fresh meat.

To study the relationship between the intake of these components and the occurrence of diseases, it is essential to have data on their concentration in meat preparations and meat products (hereafter both referred to as meat derivatives), to be able to provide solid evidence of association or causality. The iron content of foods can be obtained from food composition databases. For heme iron, databases exist on Thailand (Kongkachuichai et al., 2002) and the United States (Cross et al., 2012) but figures in meat derivatives both for heme and NO-heme on Europe are limited. Furthermore, it should be noted that meat derivatives have different characteristics depending on the place where they are produced as many of them are traditional and regional specialties. Accordingly, it is difficult to make assumptions about their contents due to the scarcity of data and product variability. This lack of data has led to the use of estimates of heme and NO-heme concentrations in meat and meat derivatives in different European epidemiological studies (Jakszyn et al., 2013; Bastide, 2016).

This study aimed to obtain reliable representative data on the composition of, iron, heme, and NO-heme in meat derivatives consumed in Spain for use in the estimation of their intake in a sample of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Spain cohort. We hypothesized that the presence of certain compounds such as Zn-protoporphyrin and ingredients may cause an overestimation of heme compounds when measured spectrophotometrically. For this reason, we compared the classical spectrophotometric method described by Hornsey (1956) with the high-performance liquid chromatography (HPLC) determination to ascertain the need for chromatographic determination. To the best of our knowledge, the studies dealing with the determination of heme and NO-heme by HPLC in meat derivatives are limited.

2. Material and methods

2.1. Sampling

A list of meat derivatives was obtained from the food consumption data of the EPIC group of Spain, 1997 study ($n = 39$, Table 1). EPIC is a large prospective cohort study involving more than half a million participants (ages 25–70), who were recruited across 10 European countries between 1992 and 1999. The EPIC-Spain prospective cohort included 41,437 participants (25,808, 62%, women) recruited between October 1992 and July 1996 from five Spanish regions: three in the north (Asturias, Navarra, and Guipúzcoa) and two in the south (Murcia and Granada). Convenience samples were obtained from delicatessen stores, food markets, and supermarkets in different geographical locations of Spain (Asturias, Navarra, Andalucía, Murcia, and Catalonia) and immediately transported to IRTA's laboratory under refrigerated conditions when required. For each listed type of product, a minimum of 4 different brands were collected and ground with a kitchen aid individually. Subsamples of the different brands were mixed to obtain a single aggregated samples for each type of product. Immediately after grinding and mixing, samples were vacuum packaged in aluminum bags and stored in a freezer at -20°C until their analysis. Different varieties of "chorizo" and "morcilla" samples were analyzed. With regards to dry-cured serrano ham ("jamón serrano") and cooked cured ham ("jamón cocido"), they were bought both sliced at butchers' and at industrial vacuum or modified atmosphere packaged sliced ham ($n = 4$ in each case) and analyzed separately for assessing the variability between samples and retail conditions. With regard to "chistorra" sausages, two different categories were considered and analyzed separately: those labeled with and without the addition of nitrifying agents. It is worth mentioning that back in the 1990s "chistorra" was typically elaborated with nitrifying agents, whereas their use is nowadays less common. In addition, two additional categories, "lacón traditional" (regional

product) and industrially processed "lacón" (nowadays more widespread), were considered and analyzed separately. Some of the products (e.g., "chistorra", bacon, "bratwurst", and frankfurter sausages) were analyzed before and after cooking in the lab. The cooking procedure aimed to mimic typical Spanish household cooking practices and thus samples were pan-fried with a minimum amount of olive oil (griddling) and subsequently ground and mixed as described above.

2.2. Proximate composition

Moisture content was determined by drying at $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ until reaching a constant weight after 24 h. Total nitrogen was determined according to the Kjeldahl method, whereas the protein content was estimated by multiplying by 6.25 according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). Fat content (extracted with hexane), and ashes were determined following the International Organization for Standardization (ISO) protocols ISO 1443:1973 and ISO 936:1998, respectively. Analyses were carried out in duplicates and the results were expressed in grams per 100 g of edible fresh weight (FW).

2.3. Nitrosyl-heme and total heme extraction and spectrophotometric quantification

NO-heme and total heme pigment concentrations were extracted in triplicates by using final solutions of 80% acetone and 80% acidified acetone, respectively, considering the sample's moisture as described by Hornsey (1956). Briefly, for NO-heme determination, 2 g of ground samples were weighed under subdued light conditions into 50 mL capacity centrifuge tubes. Then, 200 μL of 0.5% (w/v) aqueous L-cysteine hydrochloride solution plus 10 mL of acetone solution were added to each tube. Similarly, for total heme determination, 2 g of ground samples were weighed under subdued light conditions into 50 mL capacity centrifuge tubes. Then, 200 μL of 0.5% (w/v) aqueous L-cysteine hydrochloride solution plus 10 mL of the acidified acetone solution (containing 2% concentrated HCl) were added to each tube. The acetone mixtures were homogenized using the UltraTurrax homogenizer (IKA, Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) for 30 s at 9000 rpm while the tube was immersed in ice. The sample was kept at 4°C and under stirring for 1 h and 15 min in the dark for the aqueous acetone and acid acetone, respectively, and then centrifuged for 15 min ($1100 \times g$ at 4°C). After centrifugation, supernatants were filtered through filter papers (grade 42) and collected in a 10 mL volumetric flask while protecting it from light as much as possible. Sample aliquots were filtered through 0.45 μm nylon syringe filters before spectrophotometric and HPLC measurements. A spectrophotometer (UV1800; Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to measure the spectrum of samples from 350 to 750 nm. The absorbance at 540 nm and 640 nm and the extinction coefficients of 11.3 and 4.8 $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ were considered for the calculation of NO-heme content and total heme content, respectively. Results were expressed as milligrams of hemin chloride equivalents per kilogram of edible FW. The curing efficiency was calculated by expressing the NO-heme content as a percentage of the total heme content.

2.4. Determination of porphyrins by HPLC

Aliquots of the aqueous and acidified acetone extracts were injected (40 μL) into an Agilent 1100 series HPLC system (Waldbronn, Germany) equipped with a Synergi Fusion-RP column ($150 \times 4.6 \text{ mm}$, 4 μm , 80 Å) from Phenomenex (Torrance, USA) and using a UV/Vis detector set at 400 and 414 nm. Water with 0.05% trifluoroacetic acid and acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid were used as mobile phases A and B, respectively.

In the aqueous acetone extracts, porphyrins were eluted with a gradient in which phase B increased from 20% to 70% in 5 min and then increased to 100% in 15 min at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} . Three

Table 1List of meat pr (n = 39) consumed by the Spanish cohort of the EPIC study^a.

Local product name	English description	Animal source	Elaboration time	Drying	Fermentation	Nitrite and nitrate salts added	Heat-treated	Other	Usual culinary preparation in Spain
Bacon	Cured streaky bacon	pork	1–5 days	yes	no	yes	yes	smoked	griddled, grilled, fried
Bratwurst	Bratswurst type sausage	pork	1 day	no	no	no	yes	smoked	griddled, grilled, or simmered
Cabeza de jabalí	Offal and pork meat luncheon (head cheese)	pork	1–2 days	no	no	yes	yes		cold
Carne en lata	Canned meat including corned beef	pork / beef	1 day	no	no	yes	yes		cold
Cecina	Dry cured beef leg	beef	months	yes	no	depends	no		cold
Chistorra	Small caliber fresh MPrp ^b or slightly fermented paprika sausage MPrp or MPrd ^b	pork	1–3 days	no	no	depends ^c	no	nitrified / non-nitrified	griddled, grilled, fried
Chóped / Chopped	Pork meat luncheon (jagdwurst)	pork	1–2 days	no	no	yes	yes		cold
Chorizo fresco	Fresh paprika sausage MPrp	pork	1 day	no	no	depends ^c	no		stewed, grilled, griddled
Chorizo curado	dry-cured paprika sausage	pork	3–4 weeks	yes	yes	depends	no		cold
Chorizo fresco oreado	Fresh aired paprika sausage MPrp/MPrd	pork	1–3 days	yes	depends	yes	no		stewed, grilled, griddled
Chorizo de Pamplona	Dry cured paprika sausage	pork	3–5 weeks	yes	yes	yes	no		cold
Chorizo tipo vela	Dry cured paprika sausage	pork	3–5 weeks	yes	yes	yes	no		cold
Fiambre de pavo	Turkey meat luncheon	turkey	1 day	no	no	yes	yes		cold
Frankfurt	Frankfurter type sausage	chicken / pork	1 day	no	no	yes	yes	smoked	griddled, grilled, fried, simmered
Fuet	Small caliber dry cured sausage	pork	2–4 weeks	yes	yes	yes	no		cold
Jamón cocido / Jamón de York	Cooked ham	pork	2–5 days	no	no	yes	yes		cold
Jamón Serrano	Dry cured ham	Pork	> 7 months	yes	no	yes	no		cold
Lacón, industrial	Cooked shoulder, Galician specialty, industrial elaboration	pork	2–5 days	no	no	yes	yes		cold
Lacón, traditional	Cooked shoulder, Galician specialty, traditional elaboration	pork	> 2 weeks	yes	no	yes	Yes		cold, stewed
Lomo embuchado	Dry cured loin	pork	> 4 weeks	yes	no	yes	no		cold
Longaniza de payes/llonganissa de payes	Dry cured sausage, Catalan specialty	pork	4–8 weeks	yes	yes	yes	no	surface mold	cold
Longaniza imperial	Dry cured sausage	pork	3–4 weeks	yes	yes	yes	no	surface mold	cold
Longaniza murciana/salchicha de pellizco	Small caliber dry cured sausage	pork	1 week	yes	yes	yes	no		cold
Longaniza seca	Dry cured sausage	pork	1 week	yes	yes	yes	no		cold
Morcilla asturiana	Blood sausage, Asturian specialty	pork	1–3 weeks	yes	yes	no	yes	smoked and dried	stewed, griddled
Morcilla de arroz	Blood sausage with rice	pork	1 day	no	no	no	yes		grilled, griddled
Morcilla de cebolla	Blood sausage with onion	pork	1 day	no	no	no	yes		grilled, griddled
Morcilla murciana	Blood sausage, Murcian specialty	pork	1 day	no	no	no	yes		grilled, griddled
Morcón	Bung cap paprika sausage	pork	months	yes	yes	yes	no		cold
Morcón blanco	Bung cap sausage	pork	1 day	no	no	no	yes		cold
Morcón negro/Butifarra ancha	Bung cap blood and liver sausage	pork	1 day	no	no	no	yes		cold
Mortadela	Bologna type sausage (mortadella)	pork	1 day	no	no	yes	yes	smoked	cold
Panceta de cerdo	Dry cured pork belly	pork	weeks	depends	no	yes	no		stewed, grilled, griddled
Paté / Fuagrás / Foie-gras	Meat and liver pâté	pork liver	1 day	no	no	yes	yes		cold
Salami	Salami	pork	4–8 weeks	yes	yes	yes	no		cold
Salchichón	Dry cured sausage	pork	4–8 weeks	yes	yes	yes	no		cold
Sangrecilla	Cooked blood curd	chicken / pork / veal	1 day	no	no	no	yes		stewed, grilled, griddled
Sobrasada /sobrassada	Paprika raw cured sausage and spread	pork	months	yes	yes	yes	no		cold, warmed
Tocino	Salted pork fat	pork	weeks/ months	yes	no	yes	no		stewed

^a This table describes the main characteristics of the sampled meat derivatives that are representative of the Spanish market although in each meat derivative it is possible to find some exceptions with the use of nitrites, smoking, animal source ingredients, etc.

^b They can be classified as meat preparations (MPPr) or meat products (MPPrd) according to European Commission Regulation No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin.

^c Nowadays nitrifying salts are seldom added in this product, but their addition was usual in the 1990 s

peaks were detected depending on the aqueous acetone extract. The first eluted peak corresponds to a heme species, the second was identified as Zn-protoporphyrin, and the third peak corresponds to a transient NO-heme species. The identification of this peak was achieved by preparing NO-heme as described by Killday et al. (1988). In brief, 0.1 mL of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (6.6% in water) were added to 5 mg of hemin chloride dissolved in 0.5 mL of dimethylsulfoxide under inert atmosphere and protected from light. Subsequently, nitric oxide (NO) gas was bubbled into the solution, which then became purplish. Then, water was added to obtain a purple–reddish precipitate. The solid NO-heme was recovered by centrifugation and washed with water several times. The solid was dissolved in acetone, presenting the Soret band and attenuated peaks at 485, 540, and 570 nm in the Q band (Fig. 1, inset III), and immediately injected in the HPLC, as in the solution it converts rapidly into heme. This instability prevented the obtaining of a calibration curve and led to the area of this peak being added to that of heme and used for NO-heme quantification. Coefficients of determination (R^2) higher than 0.99 were obtained from linear regression analysis. The latter was carried out by using a calibration curve ranging from 0.5 to 15 mg L^{-1} using porcine hemin chloride (PanReac AppliChem; Barcelona, Spain) standard solutions and a calibration curve ranging from 0.06 to 3.5 mg L^{-1} using Zn-protoporphyrin (Merck; Darmstadt, Germany) standard solutions. The standard solutions were prepared in 80% acetone and measured at 400 nm and 414 nm for NO-heme and Zn-protoporphyrin determination, respectively. NO-heme was expressed as milligrams of hemin chloride equivalents per kilogram of edible FW whereas Zn-protoporphyrin was expressed in mg/kg of edible FW.

In the acidified acetone extract, total heme was eluted with a gradient in which phase B increased from 20% to 70% in 5 min and then increased to 100% in 10 min at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} . A coefficient of determination (R^2) higher than 0.99 was obtained from linear regression analysis carried out using a calibration curve ranging

from 0.5 to 15 mg L^{-1} using porcine hemin chloride standard solutions prepared in 80% acidified acetone and measured at 400 nm. Total heme content was expressed as milligrams of hemin chloride equivalents per kilogram of edible FW.

2.5. Total iron content

Closed quartz vessels and a microwave acid digestion system (Milestone UltraWAVE) were used to determine total iron in duplicate. Ground samples were accurately weighed (0.5 g) into quartz digestion vessels. Then, 3 mL of nitric acid, 1 mL of hydrogen peroxide, and 1 mL of water were added to each tube and closed. Digestion of samples was conducted by applying a 4-step program described as follows: firstly, heating for 8 min up to 100°C , then heating for 7 min up to 150°C , heating again for 11 min up to 240°C , and then maintaining for 6 min. Once the samples had been allowed to cool, the digested solutions previously diluted with a solution of nitric acid and hydrochloric acid, were transferred into volumetric flasks, and analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (Agilent 7800). The calibration curve was obtained by different concentrations of Fe [isotope 53] from 4 to 10000 ppb prepared on a nitric and hydrochloric acid mixture solution. Results were expressed as milligrams of Fe per kilogram of edible FW.

2.6. Dietary intake assessment

NO-heme, heme iron, and total iron content data were used to estimate the intake of these 3 components in the Spanish population using data from the EPIC-Spain cohort. Processed meat consumption data from 38,471 subjects collected through a previously validated dietary history questionnaire were used to estimate intakes (Ibañez et al., 2005). It should be noted that, because the aim was to obtain data to estimate

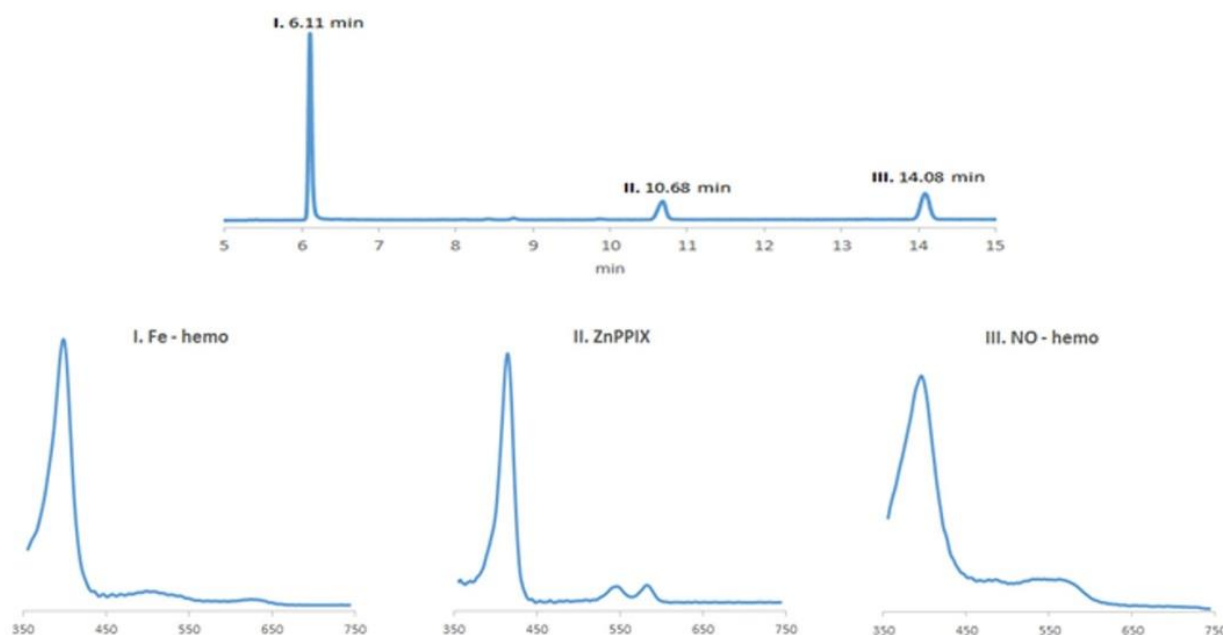


Fig. 1. Chromatogram of the aqueous acetone extract of dry-cured hams with heme, Zn-protoporphyrin, and nitrosyl-heme peaks at 6.1, 10.7, and 14.1, min, respectively. The spectra of heme, Zn-protoporphyrin, and transient nitrosyl-heme species is shown in I, II, and III, respectively.

the intake using dietary records obtained in 90's, issues that could affect the representativeness of current samples like changes in ingredients or processing were considered.

2.7. Statistical analysis

Pearson's correlation analysis was carried out between samples proximate content and also between the determinations of heme and NO-heme when measured spectrophotometrically and by HPLC. An analysis of variance was carried out to study the effect of butcher-sliced vs. industrial slicing and packaging on heme and NO-heme content of dry-cured and cooked ham samples. Tukey's honest significant difference test was performed at a 95% confidence level ($p \leq 0.05$) to identify significant differences among samples.

3. Results and discussion

A brief description of the products reported in the Spanish EPIC cohort study is provided in Table 1. This table shows the diversity of meat derivatives including a great number of regional specialties. Overall, pork meat is the main meat derivative ingredient in Spain similar to other southern European countries and, in general, western countries. However, the use of beef, lamb, and meat from other species is also common in European countries and other countries with religious constraints. It is worth mentioning that the use of poultry meats in the elaboration of meat derivatives is relatively recent and mainly used in the elaboration of certain types of derivatives addressed to satisfy specific customers' demands (e.g., low calories or low budget). This table also shows a high diversity of dry-cured meat products (20 out of 39), as in the past this elaboration process allowed the regular consumption of meat in periods of scarcity without cold storage. However, the main reason for their consumption nowadays is to enjoy their pleasant organoleptic features. Typically, dry curing implies the addition of nitrifying agents (also referred to as curing agents and involving the addition of nitrite and/or nitrate salts) during their elaboration process. Cooked meat products, despite being most of them less traditional than dry-cured meat products, have been consumed for decades in Spain, as also observed in the EPIC study questionnaire. "Morcillas", a traditional blood sausage with many regional specialties, would probably be the most remarkable exception.

3.1. Proximate composition

Table 2 shows the proximate composition of the Spanish meat derivatives listed in the EPIC study. They were analyzed as purchased ($n = 40$, excluding cooked sausages in the lab). Meat derivatives are mostly made up of water, fat, protein, and ash. The carbohydrate content in meat derivatives is low or very low (0.4–6.5%), except in the case of "morcillas", to which carbohydrate-contributing ingredients such as onion, rice, bread, or pine nuts are added (3–27%). Ash constitutes a minor fraction of the centesimal composition; the median was 3.48 g/100 g FW and most of the values are between 1.61 and 7.11 g/100 g FW, except for "lacón traditional" which reached 12.10 g/100 g FW. These values are higher than the ash content of unprocessed meat because these products contain significant amounts of added salt (Jiménez-Colmenero et al., 2010). Higher fat content is usually detrimental to water content and vice versa (as in the case with "fiambre de pavo" and bacon) so the relationship between the two shows a strong negative and significant correlation ($r = -0.8863$; $p < 0.001$). Nevertheless, some processed meats can present important amounts of protein and fat, but relatively smaller amounts of water (for example, "chorizo curado" or "fuet") due to the drying process to which they are subjected. Thus, although animal muscle is associated with important quantities of water, no significant correlations were observed between protein and water content, or between protein and fat. As expected, when proximate composition is expressed as dry matter, correlation between protein and

Table 2

Proximate composition of meat derivatives (g/100 g FW). Most of meat derivatives were analyzed as purchased. When cooking was applied, it is conveniently indicated.

Product name	Ashes	Moisture	Protein	Fat
Bacon	3.46 ± 0.04	57.51 ± 0.09	15.60 ± 0.33	19.95 ± 0.27
Bacon, griddled	4.26 ± 0.02	49.08 ± 0.12	21.80 ± 0.13	22.64 ± 0.68
Bratwurst	2.54 ± 0.02	60.51 ± 0.14	13.30 ± 0.31	21.67 ± 0.32
Bratwurst, griddled	2.58 ± 0.05	59.22 ± 0.36	13.90 ± 0.22	20.81 ± 0.44
Cabeza de jabalí	2.43 ± 0.02	52.16 ± 0.23	19.33 ± 0.52	21.90 ± 0.01
Carne en lata	3.01 ± 0.06	65.71 ± 1.92	18.48 ± 0.16	12.34 ± 0.05
Cecina	5.74 ± 0.04	51.39 ± 2.14	33.91 ± 0.07	7.46 ± 0.23
Chistorra (nitrified)	3.23 ± 0.08	39.29 ± 0.42	17.19 ± 0.31	37.50 ± 1.04
Chistorra (nitrified), griddled	3.69 ± 0.04	37.97 ± 0.42	17.99 ± 0.04	31.44 ± 0.28
Chistorra (not nitrified)	3.39 ± 0.07	39.65 ± 1.29	18.24 ± 0.03	35.31 ± 1.25
Chistorra (not nitrified), griddled	3.70 ± 0.07	32.67 ± 0.89	19.28 ± 0.15	34.45 ± 0.55
Chóped / Chopped pork	3.34 ± 0.01	66.61 ± 0.06	12.37 ± 0.08	10.49 ± 0.27
Chorizo (fresh)	3.50 ± 0.07	56.65 ± 3.76	16.45 ± 0.23	23.13 ± 0.89
Chorizo curado	5.17 ± 0.07	24.28 ± 0.74	24.62 ± 0.63	43.61 ± 1.66
Chorizo oreado	3.94 ± 0.14	39.52 ± 0.89	19.30 ± 0.15	33.40 ± 0.19
Chorizo de Pamplona	4.90 ± 0.04	30.89 ± 2.83	17.98 ± 0.31	41.83 ± 0.16
Chorizo tipo vela	5.09 ± 0.12	41.19 ± 0.48	21.63 ± 0.32	27.21 ± 0.14
Fiambre de pavo	3.80 ± 0.04	75.52 ± 0.30	14.71 ± 0.03	0.96 ± 0.05
Frankfurt	3.63 ± 0.04	64.99 ± 0.30	12.32 ± 0.28	14.63 ± 0.23
Frankfurt, griddled	3.42 ± 0.01	64.12 ± 0.16	13.11 ± 0.19	15.91 ± 0.26
Fuet	5.29 ± 0.15	24.99 ± 0.99	28.71 ± 0.68	35.50 ± 0.71
Jamón cocido / Jamón de York	3.17 ± 0.34	74.36 ± 1.28	18.35 ± 1.59	3.30 ± 1.90
Jamón serrano	6.56 ± 0.92	41.32 ± 6.29	31.93 ± 3.64	19.08 ± 5.24
Lacón, industrial	7.11 ± 0.04	73.21 ± 0.01	17.52 ± 0.12	3.10 ± 0.13
Lacón, traditional	12.10 ± 0.10	49.67 ± 0.26	27.68 ± 0.60	10.57 ± 0.12
Lomo embuchado	5.68 ± 0.01	49.18 ± 0.04	36.87 ± 0.10	7.11 ± 0.01
Longaniza de payés	6.32 ± 0.01	26.31 ± 0.26	30.89 ± 0.13	30.59 ± 0.56
Longaniza imperial	5.44 ± 0.01	28.24 ± 0.89	28.40 ± 0.05	36.16 ± 1.57
Longaniza murciana	5.52 ± 0.08	31.69 ± 1.59	27.11 ± 0.14	34.01 ± 0.30
Longaniza seca	4.73 ± 0.01	36.34 ± 2.01	24.68 ± 0.06	28.86 ± 0.12
Morcilla asturiana	2.98 ± 0.04	16.86 ± 0.41	9.94 ± 0.23	58.60 ± 0.69
Morcilla de arroz	1.62 ± 0.01	52.92 ± 0.67	6.88 ± 0.09	14.90 ± 0.16
Morcilla de cebolla	2.50 ± 0.09	46.17 ± 0.68	9.03 ± 0.11	30.78 ± 1.54
Morcilla murciana	2.28 ± 0.01	64.54 ± 6.70	4.13 ± 0.05	14.81 ± 0.54
Morcón	3.96 ± 0.07	40.25 ± 0.71	21.16 ± 0.13	30.69 ± 0.41
Morcón blanco	2.55 ± 0.07	38.24 ± 0.61	13.11 ± 0.35	34.12 ± 3.01

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Product name	Ashes	Moisture	Protein	Fat
Morcón negro / Butifarra ancha	3.12 ± 0.06	42.01 ± 3.30	16.40 ± 0.54	33.66 ± 0.75
Mortadela	3.22 ± 0.04	65.78 ± 0.53	11.96 ± 0.31	11.09 ± 0.59
Panceta de cerdo	3.89 ± 0.02	35.71 ± 1.53	17.82 ± 0.24	38.43 ± 2.79
Paté / Fuagrás / Foie-gras	2.45 ± 0.04	57.28 ± 0.75	11.63 ± 0.00	26.01 ± 0.16
Salami	4.47 ± 0.11	34.22 ± 0.14	17.80 ± 0.52	42.43 ± 0.13
Salchichón	5.74 ± 0.06	39.19 ± 2.16	28.08 ± 0.76	21.28 ± 0.15
Sangrecilla	1.61 ± 0.02	81.15 ± 1.02	19.36 ± 0.13	0.02 ± 0.01
Sobrasada	3.43 ± 0.05	20.79 ± 1.40	10.93 ± 0.09	61.63 ± 0.99
Tocino	1.99 ± 0.13	3.22 ± 0.78	1.49 ± 0.04	90.51 ± 0.13

Each mean was calculated from the analytical result of $n = 3$ aliquots of a composite sample of at least 4 different brands.

fat is high and negative ($r = -0.8576$) and statistically significant ($p < 0.001$). In turn, when protein and moisture are referred to as defatted matter, a negative high correlation appears between the two ($r = -0.7276$, $p < 0.001$).

The protein content of the meat derivatives analyzed (excluding cooked products in the lab) ranged from 1.49 to 36.87 g/100 g FW, with a median of 17.19 g/100 g FW. The highest protein contents (≥ 30.9 g/100 g FW; 90th percentile) were found in "lomo embuchado", "cecina", "jamón serrano" and "longaniza de payés", while those with the lowest contents (≤ 9 g/100 g FW; 10th percentile) were "tocino", "morcilla murciana", "morcilla de arroz" and "morcilla de cebolla".

The fat content of the analyzed meat derivatives (excluding cooked products) ranged from 0.02 to 90.51 g/100 g FW with a median of 27.21 g/100 g FW. The highest fat contents (≥ 43.6 g/100 g FW; 90th percentile) were found in "chorizo curado", "morcilla asturiana", "sobrasada" and "tocino", while those with the lowest contents (≤ 3.3 g/100 g FW; 10th percentile) contents were "sangrecilla", "fiambre de pavo", "lacón industrial" and "jamón cocido".

Previous studies have reported differences of up to 30% comparing composition data from sampled and analyzed sausages and data from composition tables (Cunningham et al., 2015). We compared the data obtained in our study with data from the available in scientific literature (León-Crespo et al. 1986; Muñoz et al., 1996; Santos et al., 2003; Estévez et al., 2005; Molinero et al., 2008; Marra et al., 1999; Lorenzo et al., 2008; Prado et al., 2019; Farran-Codina et al., 2022). We managed to compile data on water, protein, and fat content for 33 of the 39 meat derivatives. To the best of our knowledge, there was no available data in the literature for "longaniza de payés", "longaniza murciana", "longaniza seca", "sangrecilla", bacon and "morcilla asturiana". Twenty two percent of analyzed products for moisture values, 20% of protein values, and 23% of fat values were greater than 30% with respect to the literature values. The foods that included some of these values were "lomo embuchado" (fat), "salchichón" (protein and fat), "chistorra not nitrified" (moisture), "chorizo Pamplona" (fat), "panceta de cerdo" (moisture and fat), "lacón industrial" (moisture, protein, and fat), "chistorra nitrified" (moisture), "morcón blanco" (moisture, protein, and fat), "frankfurt" (fat), "morcilla de arroz" (protein), "morcilla murciana" (moisture, protein, and fat) and "tocino" (moisture, and protein); in total, 12 meat derivatives.

The differences between our data and that in previous literature may be due to different reasons. First, the variability inherent to many of these products (León-Crespo et al., 1986; Jiménez-Colmenero et al., 2010), frequently produced by small and medium-sized companies or establishments that have their own formulations and elaboration procedures, often based on local traditions or preferences. This variability also includes those differences caused by changes in the moisture

content as a result of drying during their elaboration and retail market storage conditions of these products. Second, the sampling carried out in the present study included different geographical areas and different points of sample acquisition, so as to achieve maximum representativeness; data from the literature (except in the case of food composition tables) may be biased given that they often analyzed local samples or samples produced on purpose for the study. Third, most of the data in the literature are from before the 2000 s. There is a need for more updated data on these derivatives' composition. Despite this limited information, when the data obtained in this study are compared with those from the literature, a bias in a particular direction is not apparent in any of the four components. For example, there is no consistent tendency for all meat derivatives to have lower fat values than those reported in the literature. This finding agrees with the fact that most of these products are traditional and thus expected to remain relatively unchanged for decades. In consequence, the variability in these studies can be mainly explained by changes in rearing conditions, meat composition, product formulations, manufacturing processes, etc. (Jiménez-Colmenero et al., 2010;).

3.2. Total iron content

The total iron content is shown in Table 3. The total iron content of the meat derivatives analyzed (excluding cooked products) was highly variable and ranged from 1.4 to 443.0 mg/kg FW with a median of 15.0 mg/kg FW. Meat derivatives with higher iron contents (≥ 64.6 mg/kg FW; 90th percentile) were "sangrecilla", "morcilla de cebolla", "morcilla de arroz", "morcón negro", "paté /foie gras" and "morcilla asturiana", all of which include blood and/or liver as a ingredients, while those with lower contents (≤ 6 mg/kg FW; 10th percentile) were bacon, "fiambre de pavo", "jamón cocido" and "panceta de cerdo". These results can be explained by the relatively high moisture or fat content of these products. When comparing the values obtained with those reported in the literature (León-Crespo et al., 1986; Estévez et al., 2005; Molinero et al., 2008; Jiménez-Colmenero et al., 2010; Farran-Codina et al., 2022) for 29 of the 39 processed types of meats, it is observed that the data from the present study tend to be lower, with a median difference of -21% concerning the data from the scientific literature. For the remaining 10 meat derivatives, no data were found in the scientific literature. This bias between the data from our study and the values provided by the literature could be due to the factors discussed above for the proximate composition. It should be highlighted that the data available in the literature on the iron content of Spanish meat derivatives are scarcer than the data available for proximate composition, and this may have compromised their representativeness.

3.3. Total heme content measured spectrophotometrically

The content of heme in raw meat measured spectrophotometrically following the Hornsey's method is shown in Table 3. Heme was not detected in "tocino" as was expectable from what is essentially subcutaneous fat with a low protein content. Conversely, those products containing blood were in the upper range of heme content. For instance, "sangrecilla" which is made from coagulated blood showed the highest heme content (1939.4 mg/kg). Meat derivatives which formulation includes blood and other ingredients, such as "morcillas" (ranging from 263.5 to 706.1 mg/kg), and "morcón negro" (346.5 mg/kg) also accounted for high amounts of heme mainly coming from hemoglobin. The variability of heme in "morcillas" can be attributed to the different blood content in the formulations. The addition of rice, onion, fat, and protein sources explained the variability in the proximate composition of these products. "Morcilla murciana" had, accordingly, the highest moisture and lowest protein content of all, which agrees with the lowest heme content.

With regards to dry-cured meat products, heme content was low in "panceta" (15.8 mg/kg) which, similarly to "tocino", can be attributed to

Table 3

Total iron, total heme, and nitrosyl-heme (NO-heme) contents obtained using spectrophotometric (Hornsey's method) and HPLC methods and the curing efficiency calculated from the data obtained by means of the corresponding method. Most of meat derivatives were analyzed as purchased. When cooking was applied, it is conveniently indicated.

Meat derivatives	Fe (mg/kg)	Hornsey's method			Curing efficiency (%)	HPLC method			Curing efficiency (%)
		Heme (mg/kg)	NO-heme (mg/kg)			Heme (mg/kg)	NO-heme (mg/kg)	ZnPP (mg/kg)	
Bacon	5.2 ± 1	23.4 ± 2.0	23.7 ± 2.9	101		24.9 ± 1.0	22.6 ± 2.7	0.2 ± 0.1	91
Bacon, griddled	6.8 ± 2	27.4 ± 1.0	21.5 ± 1.0	79		30.1 ± 1.9	21.4 ± 7.4	tr	71
Bratwurst	8.1 ± 2	26.8 ± 2.9	ND	0		26.2 ± 2.7	tr	ND	7
Bratwurst, griddled	8.8 ± 2	30.1 ± 2.0	ND	0		28.5 ± 2.3	tr	ND	24
Cabeza de jabalí	13.0 ± 3	55.1 ± 6.6	33.0 ± 1.6	60		57.3 ± 8	42.0 ± 3.5	tr	73
Carne en lata	11.0 ± 3	56.7 ± 3.9	35.7 ± 2.5	63		55.3 ± 4.2	45.6 ± 6.6	0.3 ± 0.1	82
Cecina	15.0 ± 4	216.4 ± 18.8	85.9 ± 8.3	40		183.5 ± 5.3	104.6 ± 17.3	19.3 ± 3.9	57
Chistorra (nitrified)	12.0 ± 3	31.4 ± 2.0	26.4 ± 2.7	84		27.1 ± 2.6	27.9 ± 1.5	0.2 ± 0.1	103
Chistorra (nitrified), griddled	13.0 ± 3	35.4 ± 5.2	29.8 ± 1.2	84		28.6 ± 0.5	26.2 ± 5.8	0.3 ± 0.1	92
Chistorra (not nitrified)	14.0 ± 4	43.1 ± 3.5	37.3 ± 3.0	86		36.8 ± 0.5	37.0 ± 1.9	0.9 ± 0.2	100
Chistorra (not nitrified), griddled	15.0 ± 4	39.8 ± 1.6	40.8 ± 2.6	103		34.0 ± 0.4	33.9 ± 1.6	0.9 ± 0.0	100
Chóped / Chopped pork	7.7 ± 2	33.0 ± 4.6	15.6 ± 2.3	47		31.2 ± 2.6	20.8 ± 0.3	ND	67
Chorizo (fresh)	21.0 ± 5	29.4 ± 2.6	30.4 ± 2.4	103		28.2 ± 1.5	29.4 ± 2.7	0.2 ± 0.1	103
Chorizo curado	19.0 ± 5	62.3 ± 3.6	51.1 ± 5.5	82		52.8 ± 2.3	52.9 ± 1.7	1.1 ± 0.2	100
Chorizo oreado	15.0 ± 4	56.2 ± 6.3	41.6 ± 4.1	85		29.4 ± 4.7	30.5 ± 1.4	0.5 ± 0.1	104
Chorizo de Pamplona	14.0 ± 4	42.7 ± 2.8	50.4 ± 1.7	118		36.7 ± 0.5	37.4 ± 2.4	0.4 ± 0.1	102
Chorizo tipo vela	18.0 ± 5	73.1 ± 2.5	65.1 ± 9.3	89		68.6 ± 1.1	63.9 ± 9.3	0.3 ± 0.1	93
Fiambre de pavo	4.1 ± 1	7.2 ± 0.6	4.4 ± 1.0	62		7.5 ± 0.4	5.8 ± 0.3	ND	78
Frankfurt	15.0 ± 4	74.6 ± 3.2	67.8 ± 7.3	91		73.4 ± 5.9	67.3 ± 6.5	tr	92
Frankfurt, griddled	16.0 ± 4	76.7 ± 5.5	72.1 ± 4.5	94		82.0 ± 1.8	80.1 ± 1.5	tr	98
Fuet	11.0 ± 3	45.2 ± 0.4	37.0 ± 3.2	82		46.8 ± 1.6	36.5 ± 5.2	ND	78
Jamón cocido / Jamón York	5.9 ± 2	25.6 ± 1.1	21.6 ± 1.4	84		27.2 ± 0.9	21.9 ± 2.4	0.2 ± 0.1	81
Jamón serrano	10.6 ± 3	47.2 ± 2.5	34.7 ± 2.7	73		41.3 ± 3.2	38.8 ± 2.7	7.6 ± 1.0	94
Lacón, industrial	7.2 ± 2	34.0 ± 3.7	24.9 ± 1.3	73		36.1 ± 3.6	36.0 ± 3.0	0.2 ± 0.0	100
Lacón, traditional	15.0 ± 4	47.6 ± 5.5	33.5 ± 1.3	70		49.2 ± 6.1	49.3 ± 1.6	tr	100
Lomo embuchado	8.7 ± 2	27.9 ± 2.9	18.6 ± 2.1	67		30.6 ± 1.3	28.2 ± 3.0	0.2 ± 0.1	92
Longaniza de payés	14.0 ± 4	46.1 ± 4.4	29.2 ± 2.5	63		44.7 ± 4.8	28.8 ± 2.6	0.3 ± 0.1	64
Longaniza imperial	16.0 ± 4	39.7 ± 4.2	31.4 ± 3.2	79		41.8 ± 2.8	41.9 ± 3.3	0.2 ± 0.1	100
Longaniza murciana	12.0 ± 3	59.3 ± 3.2	31.5 ± 3.8	53		40.8 ± 5.1	24.4 ± 2.9	ND	60
Longaniza seca	15.0 ± 4	40.0 ± 4.1	31.1 ± 0.3	78		39.9 ± 1.4	39.5 ± 2.7	0.2 ± 0.1	100
Morcilla asturiana	62.0 ± 16	484.3 ± 32.5	217.1 ± 25.7	45		440.2 ± 156	215.9 ± 4.7	0.2 ± 0.1	49
Morcilla de arroz	85.0 ± 22	562.4 ± 60.2	9.4 ± 1.3	2		555.1 ± 46.6	16.1 ± 0.9	tr	3
Morcilla de cebolla	125.0 ± 33	706.1 ± 26.6	38.5 ± 5.2	6		669.3 ± 127	42.8 ± 2.9	0.2 ± 0.0	6
Morcilla murciana	47.0 ± 12	263.5 ± 19.4	38.1 ± 2.6	14		280.9 ± 26.5	50.7 ± 2.9	0.2 ± 0.1	18
Morcón	35.0 ± 9	56.4 ± 4.0	45.2 ± 1.8	80		51.2 ± 5.8	51.0 ± 10.0	0.2 ± 0.1	100
Morcón blanco	15.0 ± 4	28.2 ± 1.2	17.2 ± 0.4	61		26 ± 1.6	25.5 ± 1.4	tr	100
Morcón negro /Butifarra ancha	75.0 ± 20	346.5 ± 30.4	73.6 ± 5.2	21		331.2 ± 26.5	139.8 ± 45	0.3 ± 0.1	42
Mortadela	8.5 ± 2	19.4 ± 2.1	12.1 ± 0.9	62		19.3 ± 0.7	14.2 ± 0.8	ND	74
Panceta de cerdo	5.8 ± 2	15.8 ± 1.1	7.0 ± 2.9	44		16.6 ± 1.1	6.3 ± 0.2	tr	38
Paté / Fuagrás / Foie-gras	62.0 ± 16	97.0 ± 3.9	73.1 ± 4.9	75		96.8 ± 3.6	97.1 ± 7.9	tr	100
Salami	8.7 ± 2	29.2 ± 3.3	17.9 ± 0.5	61		27.5 ± 2.8	27.4 ± 1.0	0.2 ± 0.1	100
Salchichón	14.0 ± 4	59.4 ± 7.0	23.1 ± 1.8	39		56.1 ± 5.2	43.9 ± 7.0	tr	78
Sangrecilla	443.0 ± 115	1939.4 ± 140	102.2 ± 6.0	5		1554.2 ± 112	48.6 ± 28.2	ND	3
Sobrasada	23.0 ± 6	30.6 ± 8.1	31.0 ± 4.3	100		28.4 ± 2.8	28.1 ± 5.2	ND	99
Tocino	1.4 ± 0.1	tr	ND	0		1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	ND	80

Each mean was calculated from the analytical result of $n = 3$ aliquots of a composite sample of at least 4 different brands and expressed on a fresh weight basis. The curing efficiency (percentage of nitrosyl-heme content/ total heme content) was calculated using the same method of analysis. The abbreviations ND, and tr stand for not detected, and trace amounts respectively.

its low lean protein content. On the contrary, “cecina” showed the highest heme content (216.4 mg/kg) which can be attributed to the use of beef meat instead of pork meat, which is richer in heme proteins (Kongkachuichai et al., 2002). The average heme content for the rest of the studied dry-cured meat products was 58 mg/kg. In dry-cured hams, heme content was 47 mg/kg, which is in good agreement with the results reported by Fuentes et al., (2014) who reported heme contents ranging from 40 to 55 mg/kg when studying dry-cured hams from pure Iberian pigs and Iberian x Duroc crossbred pigs. In fermented loins, Karwowska et al., (2021) reported heme values ranging from 60 to 109 mg/kg depending on the nitrification level and storage time. Despite having a different process, these values are higher than those found in “lomo embuchado” (27.9 mg/kg). In Galician “chorizo” sausage, Rodríguez-González et al., (2020) reported values around 140 mg/kg which are also higher than those found for “chorizo oreado” and “chorizo curado” (56.2 and 62.3 mg/kg, respectively). In a fermented dry-cured sausage containing pork and beef, Chasco et al., (1996) reported heme

values of 191 mg/kg after processing which is higher than that found for the sausages included in this study (“longaniza payés”, “longaniza seca”, “fuet” with 46.1, 40.0 and 45.2 mg/kg, respectively). In Chasco's study, the high heme content can be in part due to the presence of beef in the formulation, which is not usual in retailed dry-cured sausages in Spain. In salami, de Lima Alves et al., (2018) reported values higher than 90 mg/kg in control samples after processing whereas those exposed to ultrasounds treatments were even higher. These values are also higher than in our study (29.2 mg/kg), however, the same authors reported values close to 30 mg/kg in the control sample by the end of the storage. During storage, heme cleavage and NO-heme degradation may occur and lead to meat and meat product discoloration (Ma et al., 2017). Therefore, it is reasonable to think that several reasons related to the formulation (e.g., protein content, animal, type of muscle), the elaboration process (e.g., drying), and storage conditions may explain this broad range of concentrations and controversial results in the literature. In this regard, it is worth mentioning that in our study we studied retail

samples that may have been stored under different conditions and that could have led to a loss of pigments and consequently explain the relatively low values.

As discussed earlier, heme content greatly depends on the use of blood as ingredient. Regarding the heme content of cooked meat products that do not contain blood in their formulation, the average content was 41 mg/kg and ranged from 7.2 mg/kg in turkey meat luncheon “*fiambre de pavo*” to 97.0 mg/kg in “*paté*” (Table 3). The loss of water in dry-cured meat products explains the higher heme content when compared to cooked meat products (Table 2). The low content of heme in “*fiambre de pavo*” can be attributed not only to the relatively higher moisture and lower protein content than other cooked meat products, but also to the low content of heme pigments of poultry meats (Kong-kachuichai et al., 2002;). The high heme content of “*paté*” is explained by the use of liver, a blood-rich viscera, in its formulation. However, other authors reported lower heme contents ranging from 28 to 40 mg/kg in the liver “*patés*” containing different formulations (Martín-Sánchez et al., 2013), probably due to how liver is treated before processing. In emulsified cooked sausages containing 60% beef and 40% pork, Terns et al., (2011) reported a heme content of approximately 133 mg/kg. Carballo et al., (1991) reported heme contents as high as 68 mg/kg in a bologna sausage. In comparison to other emulsified meat products, this content was lower than that found in frankfurters (74.6 mg/kg) but higher than that found in “*mortadela*” (19.4 mg/kg). Again, these controversial results may be attributed to different product formulations, and, for instance, the studied frankfurters contained different amounts of mechanically deboned chicken and turkey meat. Even though it is possible to add water in the elaboration of cooked hams, the composition of this product is relatively less variable than for instance in comminuted meat derivatives. In this study, the heme content of cooked hams was 25.6 mg/kg which agrees with the study of Oliver et al., (2006), who reported 31 mg/kg and 29 mg/kg in *biceps femoris* and *semimembranosus* muscles of cooked hams coming from raw hams with a *postmortem* normal pH and low pH, respectively. Overall, cooked meat products also showed a wide range of heme contents for the same reasons as raw meat derivatives. However, the heme content seems less variable in those products in which the formulation may be less relevant due to the use of whole meat pieces.

3.4. Nitrosyl-heme content measured spectrophotometrically

No amount of NO-heme was detected in “*tocino*” or “*bratwurst*” samples (Table 3). The low protein and high-fat content explain the absence of NO-heme in “*tocino*”. As for the “*bratwurst*” sausage, it is important to mention that there is no addition of nitrifying agents during their elaboration in Spain. The highest content of NO-heme (102.2 mg/kg) was found in “*sangrecilla*” (blood curd). However, the curing efficiency was very low (ca. 5%) because during the elaboration of this product only salt is normally added. Similarly, different types of blood sausages (i.e., “*morcillas*”) contain NO-heme (ranging from 9.4 to 217.1 mg/kg) which again indicates the existence of certain NO sources even though neither nitrites nor nitrates are added during processing. The highest value was found in “*morcilla asturiana*” which goes through a different smoking/drying/fermentation process, compared to other “*morcillas*”. Thus, the use of different ingredients that contain nitrite and nitrate, smoking, and the presence of microorganisms with nitrate reductase activity and/or NO synthase activity can contribute to the formation of NO-heme (Gøtterup et al., 2007). The high NO-heme content in “*morcillas*” and “*sangrecilla*” is of interest not only because of their high content but also for the fact that they were not expected to contribute to its intake, since there is no use of added nitrifying agents in their formulations.

Excluding “*tocino*”, the average NO-heme content in dry-cured meat products measured spectrophotometrically was about 36 mg/kg, which is approximately 2/3 the average heme content, with a minimum content of 7.0 mg/kg and 85.9 mg/kg for “*panceta*” and “*cecina*”,

respectively. The NO-heme content in “*panceta*” agrees with the low heme content due to the low lean content of this product. On the contrary, the high content in “*cecina*” could be attributed to the high protein content and to the fact that beef meat contains more heme proteins. The observed variability among meat derivatives agrees with that observed for heme and, in part, is attributable to the different protein content. In this connection, it can be observed that in comparison with other products the fat content of salami is relatively high whereas the protein content is relatively low and thus consistent with the observed NO-heme values. The average content in dry-cured ham was 35 mg/kg (Table 3). However, in dry-cured Iberian ham the content of NO-heme was found to range between about 40 and 60 mg/kg depending on the storage conditions (i.e., time and presence of oxygen) (Andrés et al., 2006). It is known that in the presence of oxygen, the degradation of NO-heme is significantly faster upon light exposure (Møller and Skibsted, 2006; Skibsted, 2011). NO-heme seems to act as a reservoir of NO and acts as an antioxidant-inactivating radical but when it becomes depleted, oxidation reactions take over (Møller and Skibsted, 2006; Skibsted, 2011). In “*lomo embuchado*”, NO-heme content has been reported to be close to 30 mg/kg when pork loins were formulated with 150 mg/kg of nitrate plus 150 mg/kg nitrite salts (Higuero et al., 2022). These results are also higher than those observed in our study and can be attributed to several factors related to the elaboration and storage of the product. In experimental fermented sausages containing different amounts of chia seeds and black cumin, Borrajo et al. (2021) found a NO-heme content of 66 mg/kg whereas the control with 50 mg/kg of added nitrite the content was 29 mg/kg. This variability lies within the observed range of NO-heme content in this study and reflects the importance of the formulation. In this connection, paprika, like other vegetable sources, may contain certain amounts of nitrate. As stated earlier, nitrate may be reduced to nitrite, and this is converted into NO and ultimately reacts with heme proteins to form NO-heme (Skibsted, 2011). This fact helps to explain why “*chistorras*” elaborated without the addition of nitrifying agents but with paprika added as an ingredient also contain NO-heme. Therefore, the ingredients, elaboration, and storage conditions may be crucial with regard to NO-heme content. It is worth mentioning that in this study we collected retailed meat derivatives and because of that the values recorded may better reflect the NO-heme content of consumed meat derivatives than those reported in experimental samples.

As for cooked meat products, but without considering those containing blood (e.g., “*sangrecilla*”, “*morcillas*”), the lowest value (4.4 mg/kg) was observed in turkey meat luncheon (i.e., “*fiambre de pavo*”) which agrees with the low content of heme (Table 3). The highest content corresponds to “*paté*” (73.1 mg/kg) which is also in line with the higher heme content due to the use of liver in its formulation. The content of NO-heme in cooked meat products averaged 32 mg/kg. This content is lower than that observed for dry-cured meat products which can be attributed to a higher moisture content when compared to dry-cured derivatives. The studies available in the literature show that the NO-heme content in emulsified cooked sausages containing pork and beef ranged from 91 to 110 mg/kg (Terns et al., 2011). These results seem to be higher than those reported in this study for other cooked meat products. Despite that, our results agree with other studies on cooked ham (Li et al., 2012). These authors reported a high variability of NO-heme content (25–50 mg/kg) because of losses caused by illumination and packaging oxygen transfer. Although heme content showed a greater variability than NO-heme content, a broad range of concentrations exists in the studied meat derivatives. Similar to heme, several factors including the animal and muscle used, and the processing and storage conditions may explain the variability of NO-heme.

3.5. Comparison of the methods for heme and NO-heme content measurement

The elution of the acidified acetone extracts showed one important peak which corresponds to heme although in certain samples such as in

“cecina” and dry-cured hams it was possible to observe another peak corresponding to Zn-protoporphyrin (Table 3). This compound can be formed in various meat products due to microbial growth, and the endogenous enzymatic activity of ferrochelatase (Wakamatsu, 2022). This latter mechanism typically occurs in non-nitrified dry-cured hams as NO inhibits the formation of Zn-protoporphyrin and its precursor protoporphyrin IX. Despite that, this pigment can be also formed in lower amounts in nitrified dry-cured hams as well as in other meat products.

In general, the content of heme in the acidified acetone extracts from meat derivatives measured by HPLC agrees with the spectrophotometric determination based on Hornsey’s method (Table 3). However, meat derivatives with a high heme content such as those containing blood (e. g., different types of “morcillas”, “sangrecilla”, “morcón negro”) and “cecina” (beef meat) resulted in lower contents when measured by HPLC. Indeed, Hornsey et al. (1956) reported that the presence of methemoglobin slightly interfered (<2%) in the determination of NO-heme. It is unlikely that the presence of Zn-protoporphyrin interferes in the spectrophotometric determination of heme because it does not absorb at 640 nm. It is also worth noting that the absorbance at this wavelength is much lower than that at the maximum peak corresponding to the Soret band (around 400–420 nm), thus making the measurement at 640 nm more sensitive to the presence of interfering compounds. In this connection and when comparing the two methods, the classical spectrophotometric method showed higher values when measuring various paprika-containing meat derivatives such as “sobrasada” and “chorizo”. However, it is unclear whether the addition of certain ingredients such as paprika which contains carotenoids that typically absorb in the 400–550 nm wavelength range, azorubine (E122), and cochineal red (E124) may lead to this overestimation. In all these types of products, the issue can be overcome by chromatographic separation and measurement at the maximum and characteristic peak of porphyrins.

Zn-protoporphyrin was detected in the aqueous acetone and acidified acetone extracts but in the acidified acetone extracts it was easily converted into protoporphyrin IX within 5 h of storage (data not shown). Therefore, the aqueous acetone extracts were used for Zn-protoporphyrin quantification. It was also observed that NO-heme is a transient species in the acetone extract which is transformed into heme with few hours of storage. Indeed, heme is present at higher amounts than NO-heme immediately after extraction (Fig. 1). Therefore, the sum NO-heme and heme were considered for NO-heme determination by HPLC, assuming that aqueous acetone selectively extracts NO-heme (Hornsey, 1956). Similar to heme, the determination of NO-heme content by HPLC showed some controversial results when compared with the classical spectrophotometric measurement (Table 3). For instance, the content of NO-heme in “chorizo fresco oreado”, “chorizo de Pamplona”, “longaniza murciana”, “sobrasada” and “sangrecilla” was lower than that recorded in the spectrophotometric determination. Conversely, various products such as “cecina”, several “morcillas”, “paté”, “morcón negro”, “salami”, both types of “lacón”, and “salchichón” recorded higher values when measured by HPLC. It is possible that the coexistence of NO-heme and heme species with different spectra in the aqueous extracts may have contributed to these controversial results (Fig. 1). The reliability of the selective extraction and quantification of NO-heme in different meat derivatives should be compared with alternative methods (e.g., electron spin resonance spectroscopy). Despite the existence of possible interfering compounds, such as Zn-protoporphyrin, it is worth noting that the correlation between the Hornsey’s method and the HPLC determination was high for heme ($r = 0.999$; $p < 0.001$) and NO-heme ($r = 0.919$; $p < 0.001$). However, it is advisable to use chromatographic methods when determining heme and NO-heme contents and particularly when meat derivatives contain coloring ingredients and additives, because it guarantees a higher selectivity and allows the quantification at the maximum absorbance peak. However, the variability among products of heme and NO-heme contents remained high regardless of the methodology used (HPLC vs.

spectrophotometry) and the type of derivative analyzed. Therefore, the previously discussed effect of processing and storage conditions on the contents of these compounds is still valid and will be discussed more in depth below. To the best of our knowledge, this is the first time that heme and NO-heme contents have been measured in commercial meat derivatives employing HPLC thus providing a more reliable data for the intake assessment of these compounds.

3.6. Variability of heme and NO-heme in retailed dry-cured and cooked hams

Table 4 shows the composition of cooked and dry-cured hams (“jamón cocido” and “jamón serrano”, respectively) which, according to the survey are the meat derivatives with the greatest contribution to heme and NO-heme intake in Spain. With regards to dry-cured hams, the heme content ranged between 22.6 mg/kg and 49.6 mg/kg, whereas NO-heme content was between 17.2 mg/kg and 42.4 mg/kg, and the curing efficiency ranged between 42% and 100%. Concerning cooked ham, the heme content ranged between 22.5 mg/kg and 38.9 mg/kg, whereas NO-heme was between 18.8 mg/kg and 31.9 mg/kg, and the curing efficiency ranged between 70% and 97%. Contrary to cooked ham with a more homogeneous composition and shorter shelf life mainly determined by microbial growth, dry-cured hams showed a higher variability which may be explained by the higher differences in meat product composition (e.g., protein, moisture, fat) than in cooked ham and the fact that the elaboration process and shelf life is much longer than that of cooked hams. Accordingly, it seems reasonable to think that certain meat derivatives with more standardized formulations and processes may present a reduced variability, especially for NO-heme content, in comparison with other products with greater differences in their formulations, and longer elaboration processes and shelf life.

The heme content in retailed sliced dry-cured ham packaged under modified atmospheres was 43.0 mg/kg, compared to 37.4 mg/kg for freshly sliced at butchers and processed within the same day. The NO-heme content was 30.8 mg/kg and 27.5 mg/kg in modified atmospheres and freshly cut dry-cured ham samples, respectively. The curing efficiency was similar (72% vs. 73%) in both cases. In cooked ham samples, heme content in modified atmospheres was 31.4 mg/kg whereas in freshly cut sliced samples it was 27.8 mg/kg. The NO-heme content was 25.9 mg/kg and 23.9 mg/kg in modified atmospheres and freshly cut cooked ham, respectively. Although the curing efficiency was lower (82 vs. 88%) for modified atmosphere packaging, these differences were small and non-significant ($p > 0.05$). However, there is a tendency towards higher heme, and NO-heme contents in dry-cured hams and cooked hams packaged under modified atmospheres probably because of reduced contact with oxygen and light. These findings need to be confirmed in larger studies, but they seem to agree with the reported increased susceptibility of NO-heme to light degradation in the presence of oxygen (Skibsted, 2011).

The variability observed in both products highlights the variability in the content of heme and NO-heme within the same type of product and reinforces the idea that formulation, processing, and storage conditions can be determining factors.

3.7. Effect of cooking and curing efficiency

Our cooking conditions caused a slight decrease of heme content in “chistorras” elaborated without nitrifying agents when this was measured by HPLC which can be attributed to the destruction of heme by thermal treatments (Table 3). However, an increase of heme content was observed in bacon, “bratwurst”, frankfurters, and “chistorras” elaborated with the addition of nitrites. This increase can be attributed to concentration effect due to the loss of water caused by cooking (Tables 2 and 3). However, and except from frankfurters, the opposite trend was observed in the NO-heme content. This trend can be explained by the instability of the NO radical and the potential reaction with other

Table 4

Proximate composition, heme, nitrosyl-heme (NO-heme), and curing efficiency of individual samples of “jamón serrano” (dry cured ham) and “jamón cocido” (cooked ham)^a.

Sample	Sliced & Packed	Ashes	Moisture	Protein	Fat	Total Fe	Heme total	NO-heme	ZnPP	Curing efficiency
		g/100 g FW				mg/kg FW				
Jamón serrano #1	Yes	6.50 ± 0.04	40.89 ± 0.86	33.95 ± 0.32	16.54 ± 0.16	10.0 ± 2.6	41.9 ± 2.5	42.4 ± 1.6	1.9 ± 0.1	100
Jamón serrano #2	Yes	7.03 ± 0.00	41.88 ± 4.22	30.68 ± 0.81	18.39 ± 0.10	13.1 ± 3.0	49.6 ± 3.1	20.8 ± 1.1	3.0 ± 0.2	42
Jamón serrano #3	No	7.85 ± 0.01	31.11 ± 0.30	38.50 ± 0.67	21.98 ± 0.72	15.0 ± 4.0	44.8 ± 4.8	37.0 ± 2.7	11.0 ± 1.4	83
Jamón serrano #4	No	6.49 ± 0.01	38.97 ± 0.32	33.73 ± 0.57	19.87 ± 0.10	11.1 ± 3.1	46.7 ± 2.2	35.1 ± 2.8	1.8 ± 0.1	75
Jamón serrano #5	No	7.12 ± 0.26	36.12 ± 0.07	30.34 ± 0.46	24.94 ± 0.60	8.3 ± 1.7	22.6 ± 1.2	17.2 ± 3.0	0.2 ± 0.1	76
Jamón serrano #6	No	4.90 ± 0.21	42.42 ± 0.62	26.66 ± 0.44	24.27 ± 0.19	7.2 ± 1.9	35.6 ± 1.9	20.7 ± 3.4	0.1 ± 0.0	58
Jamón serrano #7	Yes	5.63 ± 0.06	48.57 ± 0.17	28.83 ± 0.53	18.23 ± 0.57	11.0 ± 3.0	47.1 ± 0.6	35.7 ± 3.9	0.8 ± 0.1	76
Jamón serrano #8	Yes	6.96 ± 0.05	50.58 ± 0.54	32.74 ± 0.43	8.40 ± 0.10	11.1 ± 3.1	33.5 ± 1.9	24.3 ± 3.5	3.1 ± 0.3	68
	Mean	6.56	41.32	31.93	19.08	10.78	40.5	29.1	2.8	72
	RSD	0.92	6.28	3.63	5.23	2.51	8.89	9.42	0.8	17
Jamón cocido #1	No	2.98 ± 0.02	73.63 ± 0.03	17.20 ± 0.42	6.63 ± 0.04	5.6 ± 1.5	22.5 ± 1.4	21.1 ± 0.7	0.2 ± 0.1	94
Jamón cocido #2	Yes	3.93 ± 0.04	75.42 ± 0.35	15.53 ± 0.42	2.99 ± 0.01	7.5 ± 2.0	38.0 ± 1.1	32.4 ± 1.4	0.2 ± 0.1	85
Jamón cocido #3	Yes	3.19 ± 0.07	72.75 ± 0.02	17.95 ± 0.07	5.18 ± 0.04	5.0 ± 1.3	26.4 ± 1.7	18.8 ± 1.8	0.2 ± 0.0	72
Jamón cocido #4	No	3.04 ± 0.08	76.71 ± 0.11	17.87 ± 0.30	1.10 ± 0.01	6.4 ± 1.7	25.5 ± 2.0	24.7 ± 1.0	0.3 ± 0.0	97
Jamón cocido #5	Yes	3.08 ± 0.04	73.50 ± 0.09	19.89 ± 0.20	3.31 ± 0.01	5.4 ± 1.4	27.0 ± 2.4	20.4 ± 1.1	Tr	76
Jamón cocido #6	Yes	3.28 ± 0.01	75.07 ± 0.01	18.38 ± 0.18	1.13 ± 0.03	5.9 ± 1.5	34.1 ± 2.3	31.9 ± 4.5	0.2 ± 0.0	94
Jamón cocido #7	No	3.09 ± 0.08	73.93 ± 0.03	20.37 ± 0.06	2.34 ± 0.11	7.0 ± 1.4	38.9 ± 8.1	27.4 ± 0.6	Tr	70
Jamón cocido #8	No	2.80 ± 0.01	73.83 ± 0.18	19.60 ± 0.04	3.76 ± 0.08	5.7 ± 1.6	24.4 ± 1.7	22.5 ± 0.6	0.2 ± 0.0	91
	Mean	3.17	74.36	18.35	3.30	6.06	29.6	25.5	0.2	85
	RSD	0.33	1.28	1.59	1.90	0.85	6.42	5.14	0.1	10

^a Each sample mean was calculated from the analytical result of $n = 3$ aliquots of a single commercial sample. Heme and nitrosyl-heme were determined by HPLC as well as the calculation of the curing efficiency. The abbreviation Tr stands for trace amounts.

compounds, which could eventually lead to the formation of nitro-socompounds (Skibsted, 2011). Therefore, the preparation and cooking may influence both heme and NO-heme and should therefore be considered for the assessment of their intake. The curing efficiency may help to explain the possible conversion of nitrate and/or nitrite into NO, leading to an increased content of NO-heme and to understand the equilibrium and stability of different heme species when subject to different processes. In this regard, it is worth mentioning that in Spain, frankfurters and “bratwurst” are typically gridled or grilled, whereas other countries typically use different culinary preparations, such as simmering.

The relationship between heme and NO-heme can be studied by looking at the curing efficiency, which was calculated as the ratio between NO-heme and heme (Table 3). Curing efficiency helps to explain the conversion of total heme to NO-heme. However, as discussed earlier, the calculation of this ratio using the heme and NO-heme classical spectrophotometric method may lead to overestimation in certain meat derivatives. The spectrophotometric calculation of curing efficiency seems to be very variable, which could be attributed to the intrinsic variability of the products and the complexity of the reactions related with the formation and degradation of NO-heme (Magrinya et al., 2016; Møller and Skibsted, 2006; Skibsted, 2011). By looking at the curing efficiency calculated from HPLC data (Table 3), it can be observed that the percentage of heme converted into NO-heme remains very variable. In cured raw meat derivatives, the conversion efficiency ranged between 38% and 104% and averaged 88%. In cured cooked meat products, the

conversion efficiency without considering bratwurst (not nitrified), and meat products containing blood or liver (e.g., “morcillas”, “paté”) ranged between 42% and 100% and averaged 83%. Therefore, the average content and dispersion were quite similar in both kinds of meat derivatives.

3.8. Intake of iron, heme iron, and NO-heme

The data obtained on the iron, heme iron and NO-heme content of Spanish meat derivatives were added to the EPIC-Spain food composition database, replacing the corresponding pre-existing values for iron and heme iron. Then, iron, heme iron and NO-heme iron intakes were estimated by a validated diet history questionnaire (EPIC group of Spain, 1997).

Intake of iron in this cohort showed a median of 14.6 mg/day, with an interquartile range (IR) of 11.6 and 18.4 mg/day. Ballesteros-Pomar et al., (2000) used a food frequency questionnaire to estimate iron intake in a follow-up study of a Spanish representative sample of adult patients with moderate to high risk of cardiovascular and controls without risk. Diet was assessed in 1991 and 1996. Results showed no differences between patients at risk and controls: 18.4 mg/day and 19.0 mg/day respectively in 1991, and 16.7 mg/day and 16.8 mg/day in 1996. However, a statistically significant decline in iron intake was detected. These results are hardly comparable to our calculations due to the different methodologies used to collect data on dietary intake. More recently, Samaniego-Vaesken et al. (2017) conducted a study to estimate

nutrient intake at the national level using a 3-day dietary record, a method more comparable to the 24-hour recall. For plausible reporters, they estimated a median iron intake of 12 mg/day (IR: 10.3–13.8 mg/day) in women and 14.7 (IR: 12.4–17.1 mg/day) in men. These values are slightly lower than ours, but probably this could be attributed in part to the progressive decline in iron intake suggested by Ballesteros-Pomar et al. (2000). The median of the intake of heme iron adjusted by age, sex, and body mass index, energy intake, and center was 1676.2 µg hemin/day (IR: 979.5–2041.3 µg/day). The median intake of NO-heme adjusted by age, sex, body mass index, energy intake and center was 528.6 µg hemin/day (IR: 252.4–645.3 µg/day). To our knowledge, this is the first time that NO-heme intakes have been estimated using direct analytical data in a sample of Spanish individuals. Bastide et al. (2016) estimated the intake of iron and NO-heme in a large cohort of French women and obtained a mean value for total iron intake of 14.5 mg/day (standard deviation = 4.8) and a mean of NO-heme iron intake of 0.16 mg iron/day which corresponds to 1868 µg hemin/day. This amount is far above our estimation for the EPIC-Spain cohort. However, it should be noted that Bastide et al. (2016) estimated the NO-heme content of processed meats by multiplying the heme iron content by a factor of 0.67, which corresponds to a curing efficiency of 67%, a value that is above the average curing efficiencies calculated with HPLC data of 44% and 52% for raw and cooked processed meats, respectively. Additionally, the food intake data were obtained through a food frequency questionnaire, which usually results in overestimates.

4. Conclusions

Overall, heme and NO-heme contents in meat derivatives showed great variability. This variability may be attributed to various factors including product formulation and processing, storage, and cooking conditions. It is worth highlighting the importance of formulation and processing conditions in the formation of NO-heme, as the latter can be found to remarkable amounts in various meat derivatives in which nitrite was not added as an additive. Although the classical spectrophotometric method described by Hornsey agrees with the HPLC determination, it seems that the formulation of certain products can interfere with the quantification of heme and NO-heme using the spectrophotometric determination. However, the variability of the heme, NO-heme, and curing efficiency remains high regardless of the methodology which highlights the need for more accurate meat derivatives databases. Despite that, the heme and NO-heme reported contents in meat derivatives, particularly those obtained employing HPLC, can be used for a more accurate assessment of the intake of these compounds in the Spanish population, offering more exact estimations than those in previous literature for European populations. Further research must be done on the determination of heme and NO-heme concentrations in meat and meat derivatives for assessing their intake in the population and its relationship with possible adverse outcomes.

Funding

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI19/00817 (Co-funded by European Regional Development Fund. ERDF, a way to build Europe).

CRedit authorship contribution statement

Ricard Bou: Investigation, Formal analysis, Resources, Conceptualization, Writing – original draft. **Andreu Farran-Codina:** Investigation, Formal analysis, Conceptualization, Writing – original draft. **Lucía Rizzolo-Brime:** Formal analysis, Writing – original draft. **Jacint Arnau:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Gerard Sabeña:** Investigation, Visualization. **Paula Jakszyn:** Formal analysis, Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Paula Jakszyn reports financial support was provided by Carlos III Health Institute. Lucia Rizzolo-Brime reports financial support was provided by Government of Spain Ministry of Health. Ricard Bou reports financial support was provided by Government of Catalonia.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Participation of L.R. in the project was supported by a grant of the Predoctoral Contracts for Training in Health Research (FI20/00006) of the Spanish Ministry of Health. We thank the Consolidated Research Group (2021 SGR00468) and CERCA Program from the Generalitat de Catalunya.

References

- Andrés, A.I., Adamsen, C.E., Møller, J.K.S., Ruiz, J., Skibsted, L.H., 2006. High-pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *Eur. Food Res. Technol.* 222 (5–6), 486–491. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0176-x>.
- AOAC (2005). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- Ballesteros-Pomar, M.D., Rubio-Herrera, M.A., Gutierrez-Fuentes, J.A., Gomez-Gerique, J.A., Gomez-De-La-Camara, A., Pascual, O., Garate, I., Montero, R., Campina, S., Fernandez Careira, J.M., Gomez Esmoris, L., Lauarica, C.S., Fernandez Careira, J.M., Cachon, J., Bestar, J., Tera Donoso, J., Albert Amoros, T., Campello Perez, J., Conca Perez, V.M., Gomez Castano, J.B., 2000. Dietary Habits and Cardiovascular Risk in the Spanish Population: The DRECE Study (II) Micronutrient Intake. *Annals of Nutrition and Metabolism* 44 (4), 177–182. <https://doi.org/10.1159/000012842>.
- Bastide, N., Morois, S., Cadeau, C., Kangas, S., Serafini, M., Gusto, G., Boutron-Ruault, M. C., 2016. Heme iron intake, dietary antioxidant capacity, and risk of colorectal adenomas in a large Cohort Study of French women: heme, dietary antioxidants, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol., Biomark. Prev.* 25 (4), 640–647. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0724>.
- Borrajó, P., Karwowska, M., Stasiak, D.M., Lorenzo, J.M., Zyśko, M., Solska, E., 2021. Comparison of the effect of enhancing dry fermented sausages with *salvia hispanica* and *nigella sativa* seed on selected physicochemical properties related to food safety during processing. *Appl. Sci.* 11 (19), 9181. <https://doi.org/10.3390/app11199181>.
- Carballo, J., Cavestany, M., Jiménez-Colmenero, F., 1991. Effect of light on colour and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage temperatures. *Meat Sci.* 30 (3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(91\)90069-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(91)90069-3).
- Chasco, J., Lizaso, G., Beriain, M.J., 1996. Cured colour development during sausage processing. *Meat Sci.* 44 (3), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00092-7).
- Cross, A.J., Harnly, J.M., Ferrucci, L.M., Risch, A., Mayne, S.T., Sinha, R., 2012. Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level. *Food Nutr. Sci. (Print.)* 3 (7), 905. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.37120>.
- Cunningham, J., Nguyen, V., Adorno, P., Droulez, V., 2015. Nutrient composition of retail samples of Australian beef sausages. *Nutrients* 7 (11), 9602–9617. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.009>.
- de Lima Alves, L., Stefanello da Silva, M., Martins Flores, D.R., Rodrigues Athayde, D., Roggia Ruviaro, A., da Silva Brum, D., Fagundes Batista, V.S., de Oliveira Mello, R., Ragagnin de Menezes, C., Bastianello Campagnolo, P.C., Wagner, R., Smanioto Barin, J., Cichoski, A.J., 2018. Effect of ultrasound on the physicochemical and microbiological characteristics of Italian salami. *Food Res. Int.* 106, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.074>.
- EPIC group of Spain, 1997. Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain - European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Epidemiol.* 26, S91–S99.
- Estévez, M., Ventanas, J., Cava, R., Puolanne, E., 2005. Characterisation of a traditional Finnish liver sausage and different types of Spanish liver pâtés: a comparative study. *Meat Sci.* 71 (4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.018>.
- Farran-Codina, A., Fernández de Arriba, R., Gorgori-Gonzalez, A., Junyent-Alminyana, S., 2022. Tablas Estándar de Composición de los Alimentos TECA – Taules Estàndard de Composició dels Aliments TECA. McGraw-Hill, Barcelona.
- Fuentes, V., Ventanas, S., Ventanas, J., Estévez, M., 2014. The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: Purebred Iberian versus reciprocal Iberian × Duroc crossbred pigs. *Meat Sci.* 96 (2), 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.010>.

- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H., Møller, J.K.S., 2007. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *Int. J. Food Microbiol.* 120 (3), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.034>.
- Higuero, N., Ramírez, M.R., Vidal-Aragón, M. del C., Cava, R., 2022. Influence of high-pressure processing and varying concentrations of curing salts on the color, heme pigments and oxidation of lipids and proteins of Iberian dry-cured loins during refrigerated storage. *LWT* 160, 113251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113251>.
- Hornsey, H.C., 1956. The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem pigments. *J. Sci. Food Agric.* 7 (8), 534–540. <https://doi.org/10.1002/jfsa.2740070804>.
- Jakszyn, P., Luján-Barroso, L., Agudo, A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Molina, E., Sánchez, M. J., A González, C., 2013. Meat and heme iron intake and esophageal adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Int. J. Cancer* 133 (11), 2744–2750. <https://doi.org/10.1002/ijc.28291>.
- Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., 2010. Production variations of nutritional composition of commercial meat products. *Food Res. Int.* 43 (10), 2378–2384. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.009>.
- Karwowska, M., Stadnik, J., Wójcik, K., 2021. The effect of different levels of sodium nitrate on the physicochemical parameters and nutritional value of traditionally produced fermented loins. *Appl. Sci.* 11 (7), 2983. <https://doi.org/10.3390/app11072983>.
- Killday, K.B., Tempests, M.S., Bailey, M.E., Metral, C.J., 1988. Structural characterization of Nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat – curing reaction. *J. Agric. Food Chem.* 36, 909–914. <https://doi.org/10.1021/jf00083a006>.
- Kongkachuichai, R., Napatthalung, P., Charoensiri, R., 2002. Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. *J. Food Compos. Anal.* 15 (4), 389–398. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1080>.
- León-Crespo, F., Mata-Moreno, C., Almagro-Rudilla, E., Ansino-Torres, F., Barranco-Sánchez, A., Camargo-Castro, S., et al. Catálogo de productos cárnicos de Córdoba. Diputación Provincial de Córdoba. Córdoba, 1986.
- Lí, H., Lí, C.B., Xu, X.L., Zhou, G.H., 2012. Effects of illumination and packaging on non-heme iron and color attributes of sliced ham. *Meat Sci.* 91 (4), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.008>.
- Lorenzo, J.M., Fontán, M.C.G., Franco, I., Carballo, J., 2008. Biochemical characteristics of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product) throughout the manufacture, and sensorial properties of the final product. Effect of some additives. *Food Control* 19 (12), 1148–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.005>.
- Ma, J., Yu, C., Guo, J., Wu, M., Xu, Y., Yi, H., Sun, W., 2017. The intrinsic cause of color fading in sliced cooked cured beef during chilled storage. *Anim. Sci. J.* 88 (10), 1606–1614. <https://doi.org/10.1111/asj.12813>.
- Magrinyà, N., Bou, R., Rius, N., Codony, R., Guardiola, F., 2016. Use of tocopherol extract and different nitrite sources and starter cultures in the production of organic botifarra catalana, a cooked cured sausage. *Food Sci. Technol. Int.* 22 (3), 221–234. <https://doi.org/10.1177/1082013215586915>.
- Marra, A.I., Salgado, A., Prieto, B., Carballo, J., 1999. Biochemical characteristics of dry-cured lacón. *Food Chem.* 67 (1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00104-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00104-1).
- Martín-Sánchez, A.M., Ciro-Gómez, G., Sayas, E., Vilella-Esplá, J., Ben-Abda, J., Pérez-Álvarez, J.Á., 2013. Date palm by-products as a new ingredient for the meat industry: application to pork liver pâté. *Meat Sci.* 93 (4), 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.049>.
- Moliner, C., Martínez, B., Rubio, B., González-Fernández, C., García-Cachán, M.D., Jaime, I., 2008. The anatomical origin of raw meat affects the sensory and chemical characteristics of a dry-cured beef product: Cecina de León. *Food Sci. Technol. Int.* 14 (3), 225–232. <https://doi.org/10.1177/1082013208095>.
- Møller, J.K.S., Skibsted, L.H., 2006. Myoglobins - The link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. *Quim. Nova* 29 (6), 1270–1278. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600024>.
- Muñoz, A., Garrido, M. D., & Ros, G. (1996). *El cerdo en la alimentación*. Ed. Fuertes. ISBN 978-8460554332.
- Oliver, M.A., Polo, J., Panella, N., Arnau, J., Contreras, M., Morera, S., Ruiz, J., Gil, M., 2006. Effect of natural stabilised pork haem pigment on the colour, colour stability and texture of cooked hams from pale, soft and exudative meat. *Food Sci. Technol. Int.* 12 (5), 429–435. <https://doi.org/10.1177/1082013206070161>.
- Pierre, Fabrice H.F., et al., 2010. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr. Cancer* vol. 62 (5), 567–573. <https://doi.org/10.1080/01635580903532408>.
- Prado, N., Sampayo, M., González, P., Lombó, F., Díaz, J., 2019. Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Sci.* 156, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.023>.
- Rodríguez-González, M., Fonseca, S., Centeno, J.A., Carballo, J., 2020. Biochemical changes during the manufacture of galician chorizo sausage as affected by the addition of autochthonous starter cultures. *Foods* 9 (12). <https://doi.org/10.3390/FOODS9121813>.
- Santarelli, Raphaële L., et al., 2008. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr. Cancer* vol. 60 (2), 131–144. <https://doi.org/10.1080/01635580701684872>.
- Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I., Rovira, J., 2003. Physicochemical and sensory characterisation of Morcilla de Burgos, a traditional Spanish blood sausage. *Meat Sci.* 65 (2), 893–898. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.009>.
- Skibsted, L.H., 2011. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. In: *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, Vol. 24. Academic Press, pp. 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.03.307>.
- Terns, M.J., Milkowski, A.L., Rankin, S.A., Sindelar, J.J., 2011. Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* 88 (2), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.009>.
- Wakamatsu, J.I., 2022. Evidence of the mechanism underlying zinc protoporphyrin IX formation in nitrite/nitrate-free dry-cured Parma ham. *Meat Sci.* 192, 108905. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2022.108905>.
- Wolk, A., 2017. Potential health hazards of eating red meat. *J. Intern. Med.* 281, 106–122. <https://doi.org/10.1111/joim.12543>.

4.2 Artículo II: Nitrosyl-heme and heme iron intake in subjects from the EPIC-Spain cohort.

Se ha sugerido que el hierro libre, el hierro hemo y el nitrosilhemo inducen la formación de especies reactivas de oxígeno, lo que eventualmente podría llevar mutaciones genéticas y daño celular, teniendo la capacidad de contribuir tanto en la iniciación como en el crecimiento tumoral.

Hasta donde sabemos, la evidencia disponible hasta el momento respecto a la ingesta de nitrosilhemo en estudios epidemiológicos es muy limitada. El único estudio prospectivo que ha reportado la ingesta de nitrosilhemo en relación al riesgo de cáncer colorrectal es el grupo de *Bastide et. al., (2016)*. Sin embargo, el estudio asignó un coeficiente constante para el contenido de nitrosilhemo para todos los derivados cárnicos (0.67).

En comparación con el nitrosilhemo, la ingesta de hierro hemo ha sido investigada de manera más extensa, aunque generalmente ha sido expresada sólo como un porcentaje del hierro total disponible en derivados cárnicos, o mediante el uso de tablas de composición de alimentos.

Para poder estudiar la relación entre la ingesta de estos compuestos y la aparición de enfermedades, es fundamental disponer de datos sobre su concentración en derivados cárnicos, con la finalidad de poder aportar evidencias sólidas de asociación o causalidad. Si bien la evidencia respecto a la ingesta de carne roja y procesada y el cáncer está más afianzada, el mecanismo detrás de esta asociación no se ha investigado adecuadamente en estudios epidemiológicos.

En este estudio, se usaron los niveles de nitrosilhemo y hierro hemo de los derivados cárnicos españoles obtenidos a partir del método *HPLC* para la estimación de su ingesta en la cohorte española del estudio EPIC.

Las medias geométricas ajustadas por sexo, edad, IMC, centro e ingesta de energía fueron de 528.6 µg/día para nitrosilhemo y 1,676.2 µg/día para hierro hemo. Se observaron diferencias en la ingesta y el tipo de derivado cárnico más consumido entre los diferentes centros españoles (Asturias, Navarra, Granada, Murcia y Guipúzcoa). Además, se encontraron diferencias significativas en la ingesta de nitrosilhemo y hierro

hemo según las diferentes variables sociodemográficas y de estilo de vida. El *jamón serrano* y el *jamón cocido/jamón de york* fueron los ítems más consumidos por la cohorte, mientras que la *sangrecilla* y la *morcilla asturiana* fueron los ítems con niveles más altos de hierro hemo y nitrosilhemo, respectivamente.

Este es el primer estudio que estima directamente los niveles de ingesta de nitrosilhemo en derivados cárnicos en una muestra grande de la población española. Además, también es el primer estudio que estima la ingesta de hierro hemo a partir de datos basados en la medición por *HPLC* en una gran variedad de derivados cárnicos. Considerando que ambos compuestos recientemente se han sugerido como posibles factores implicados en la carcinogénesis del cáncer colorrectal, y dada la escasa evidencia disponible sobre la ingesta de nitrosilhemo en diferentes poblaciones, los resultados de este estudio podrían contribuir significativamente a la comprensión y el conocimiento de su exposición en la población humana.

ARTÍCULO II

Nitrosyl-heme and heme iron intake in subjects from the EPIC-Spain cohort.

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Andreu Farran-Codina, Ricard Bou, Leila Luján-Barroso, Jose Ramón Quirós, Pilar Amiano, María José Sánchez, Miguel Rodríguez-Barranco, Marcela Guevara, Conchi Moreno-Iribas, Alba Gasque, María-Dolores Chirlaque, Sandra M. Colorado-Yohar, José María Huerta Castaño, Antonio Agudo, Paula Jakszyn.

Artículo publicado en: *Nutrients*, 2024 18;16(6):878.

Article

Nitrosyl-Heme and Heme Iron Intake from Processed Meats in Subjects from the EPIC-Spain Cohort

Lucía Rizzolo-Brime ^{1,2} , Andreu Farran-Codina ³ , Ricard Bou ⁴ , Leila Luján-Barroso ^{1,2,5} , Jose Ramón Quirós ⁶, Pilar Amiano ^{7,8,9}, María José Sánchez ^{10,11,12} , Miguel Rodríguez-Barranco ^{10,11} , Marcela Guevara ^{12,13,14} , Conchi Moreno-Iribas ^{12,13,14} , Alba Gasque ¹³ , María-Dolores Chirlaque ^{7,15,16}, Sandra M. Colorado-Yohar ^{7,15,17} , José María Huerta Castaño ^{7,15} , Antonio Agudo ^{1,2} and Paula Jakszyn ^{1,18,*}

- ¹ Unit of Nutrition and Cancer, Catalan Institute of Oncology—ICO, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; lrizzolo@idibell.cat (L.R.-B.); llujan@iconcologia.net (L.L.-B.); a.agudo@iconcologia.net (A.A.)
- ² Nutrition and Cancer Group, Epidemiology, Public Health, Cancer Prevention and Palliative Care Program, Bellvitge Biomedical Research Institute—IDIBELL, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- ³ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain; afarran@ub.edu
- ⁴ Food Safety and Functionality Program, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Girona, Spain; ricard.bou@irta.cat
- ⁵ Department of Public Health, Mental Health and Perinatal Nursing, Public Health, Mental Health and Perinatal Nursing, Universitat de Barcelona, Carrer de la Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- ⁶ Public Health Directorate, 33001 Asturias, Spain; joseramon.quirosgarcia@asturias.org
- ⁷ CIBER Epidemiology and Public Health CIBERESP ISCIII, 28041 Madrid, Spain; p-amiano@euskadi.eus (P.A.); mdolores.chirlaque@carm.es (M.-D.C.); scyohar@gmail.com (S.M.C.-Y.); jmhuerta.carm@gmail.com (J.M.H.C.)
- ⁸ Ministry of Health of the Basque Government, Sub Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20013 San Sebastian, Guipúzcoa, Spain
- ⁹ Biodonostia Health Research Institute, Epidemiology of Chronic and Communicable Diseases Group, 20014 San Sebastian, Guipúzcoa, Spain
- ¹⁰ Escuela Andaluza de Salud Pública (EASP), 18011 Granada, Granada, Spain; mariajose.sanchez.easp@juntadeandalucia.es (M.J.S.); miguel.rodriguez.barranco.easp@juntadeandalucia.es (M.R.-B.)
- ¹¹ Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, 18012 Granada, Granada, Spain
- ¹² Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; mp.guevara.eslava@navarra.es (M.G.); mc.moreno.iritas@navarra.es (C.M.-I.)
- ¹³ Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, 31003 Pamplona, Navarre, Spain; alba.gasque.satrustegui@navarra.es
- ¹⁴ Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), 31008 Pamplona, Navarre, Spain
- ¹⁵ Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council-IMIB, 30008 Murcia, Murcia, Spain
- ¹⁶ Social-Health Department, Murcia University, 30008 Murcia, Murcia, Spain
- ¹⁷ Research Group on Demography and Health, National Faculty of Public Health, University of Antioquia, Medellín 050010, Colombia
- ¹⁸ Blanquerna School of Health Sciences, Ramon Llull University, 08022 Barcelona, Catalonia, Spain
- * Correspondence: paujak@iconcologia.net



Citation: Rizzolo-Brime, L.; Farran-Codina, A.; Bou, R.; Luján-Barroso, L.; Quirós, J.R.; Amiano, P.; Sánchez, M.J.; Rodríguez-Barranco, M.; Guevara, M.; Moreno-Iribas, C.; et al. Nitrosyl-Heme and Heme Iron Intake from Processed Meats in Subjects from the EPIC-Spain Cohort. *Nutrients* **2024**, *16*, 878. <https://doi.org/10.3390/nu16060878>

Academic Editor: Joanna Stadnik

Received: 26 February 2024

Revised: 12 March 2024

Accepted: 15 March 2024

Published: 18 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: The consumption of processed and red meats is linked to the likelihood of developing colorectal cancer. Various theories have been proposed to explain this connection, focusing on nitrosyl-heme and heme iron intake. We hypothesized that differences in nitrosyl-heme and heme iron intakes will be associated with various sociodemographic and lifestyle factors. Methods: The study included 38,471 healthy volunteers (62% females) from five Spanish regions within the EPIC-Spain cohort. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) determined nitrosyl-heme and heme iron levels in the 39 most consumed PMs. Food intake was assessed using validated questionnaires in interviews. Nitrosyl-heme and heme iron intakes, adjusted for sex, age, body mass index (BMI), center, and energy intake, were expressed as geometric means due to their skewed distribution. Variance analysis identified foods explaining the variability of nitrosyl-heme and heme iron intakes. Results: The estimated intakes were 528.6 µg/day for nitrosyl-heme and 1676.2 µg/day for heme iron. Significant differences in nitrosyl-heme intake were found by sex, center,

energy, and education level. Heme iron intake varied significantly by sex, center, energy, and smoking status. “Jamón serrano” and “jamón cocido/jamón de York” had the highest intake values, while “morcilla asturiana” and “sangrecilla” were key sources of nitrosyl-heme and heme iron. Conclusions: This is the first study to estimate levels of nitrosyl-heme intake directly in PMs for a large sample, revealing variations based on sex, BMI, smoking, and activity. Its data aids future exposure estimations in diverse populations.

Keywords: nitrosyl-heme; heme iron; nitrosylation; processed meat; dietary intake; meat derivatives

1. Introduction

Intake of red meat and processed meat (PM) have been linked to different health outcomes, including increased risk of total mortality, type 2 diabetes, cardiovascular disease, and several cancer locations [1–3]. In 2015, the International Agency for Research on Cancer (IARC) [4] classified PMs as “carcinogenic” and red meat as “probably carcinogenic” for humans. In the same line, in 2018, the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Continuous Update Project (WCRF/AIRC CUP) published their third expert report, which recommends that red meat consumption be limited to moderate amounts and processed meats to as little as possible, if at all in, following the recommendations in order to reduce cancer risk [3].

A series of different mechanisms have been proposed to explain the relationship between red/processed meat intake and cancer risk. Explanations have mainly been grounded on their content in mutagenic and carcinogenic compounds [5]. The fact that polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines and exogenously formed *N*-nitroso compounds have become increasingly significant in colorectal carcinogenesis [6] could support this view. In parallel, there is evidence arising from meta-analyses of epidemiological studies that suggest that heme iron consumption may explain the association between red meat intake and different types of cancer [7,8]. It is precisely the high content of heme, in the form of myoglobin, that confers meat its dark red color. In PMs, it is the nitrite present in the curing salt that causes nitrosylation of the heme molecule and then results in heme iron-nitrosyl being released from myoglobin during the curing and/or the cooking process [9]. Some studies have proposed that heme iron-nitrosyl may be potentially more toxic than the heme molecule itself [10,11], which could be one of the explanations for why PMs are more strongly associated with cancer when compared to fresh red meat. Additionally, several authors demonstrated that free iron, heme iron and nitrosyl-heme iron could induce the formation of reactive oxygen species and that this might finally trigger gene mutations and cellular damage [12–14].

Previous studies have analyzed nitrosylated and heme iron content but have been done for specific types of PMs only [15–19]. To the best of our knowledge, one single study has attempted to estimate the nitrosyl-heme intake in a population. They used data from the French Pork Institute to perform an indirect analysis, using the same fixed value to calculate the nitrosylated heme iron content of all PM items [20]. Compared to nitrosyl-heme, heme iron intake has been more extensively researched, though usually just expressed as a percentage of total iron available in meat items [21] or by using food composition tables [22]. However, available data on heme iron content in PMs are limited to some given PM items [23,24]. These reasons complicate the deep study of the role of carcinogenesis.

To better understand the impact of nitrosyl-heme and heme iron on human health and cancer risk, this study aimed to (a) estimate intake in subjects from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain) based on laboratory determinations; (b) describe the differences according to sociodemographic and lifestyle variables and (c) identify those PM items that contributed the most to higher intake levels of nitrosyl-heme and heme iron in EPIC subjects.

2. Material and Methods

2.1. Study Population

EPIC is a large prospective cohort study involving more than half a million participants (ages 25–70) recruited across 10 European countries between 1992 and 1999. This study was conducted within the framework of the EPIC-Spain cohort study [25]. The EPIC-Spain prospective cohort included 41,437 participants (62%, women) recruited between 1992 and 1996 from five Spanish regions: Asturias, the Gipuzkoa, Navarra, Murcia and Granada. In this study, 1097 subjects without dietary information or who had extreme or implausible caloric intake (the lowest and highest 1% of the ratio of total energy intake to energy requirement), as well as large consumers of PMs, were excluded. The final study sample consisted of 38,471 healthy volunteers (23,839 females and 14,632 males).

All participants gave their written informed consent, and the study was approved by the Ethical Review Board of each center.

2.2. Diet Information

Dietary intake was assessed through a validated diet history questionnaire structured by meals administered face-to-face by interviewers [26]. Food items were recorded if eaten at least twice a month. For each item, the weekly frequency of consumption, preparation mode and usual portion size were noted. Variations between working days and weekends, as well as seasonal differences in the model of consumption, were considered [26].

2.3. Sociodemographic and Lifestyle Information

In order to collect information on sociodemographic and lifestyle factors, educational level, tobacco use, physical activity, reproductive history, and medical backgrounds, additional questionnaires were administered [26,27]. Trained nurses conducted anthropometric measurements, such as weight and height, during the recruitment process.

2.4. Estimation of Nitrosyl-Heme and Heme Iron Content in Processed Meats and Assessment of the Dietary Intakes in EPIC-Spain Cohort

In this study, the term ‘meat derivative’ (MD) includes the definition of meat preparations (meat products that still maintain the structure of the meat, even when ground, such as “hamburguesa” or “chorizo fresco”) and the definition of meat products (referring to meat which has undergone higher processing –in the form of cooking, fermentation or other), such as “Jamón cocido/jamón de York” or “salami”. This definition is provided by EU legislation [28]. Hereafter, we will use this term to refer to these types of products. The food consumption data of the EPIC-Spain cohort was used to compile a list of MDs.

Due to the highly inaccurate translations and the impracticality of using sausage descriptions, we decided to keep their original names in Spanish. The list of analyzed MD items (n = 52), along with their respective local names, English descriptions, and types of meat used in their production, are shown in Table 1.

Nitrosyl-heme and heme iron contents present in MDs were determined by the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method in 39 items and analyzed by the Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA). Convenience samples were obtained from delicatessen stores, food markets and supermarkets in different geographical locations of Spain and immediately transported to IRTA’s laboratory under refrigerated conditions when required. At least four brands were collected for each product type, ground, mixed, and vacuum-packaged at −20 °C. We conducted analyses on various types of “chorizo” and “morcilla” samples. Additionally, we examined “jamón serrano” and “jamón cocido/jamón de York” purchased in different conditions: sliced at butcher shops and pre-packaged in an industrial vacuum or modified atmosphere packaging (n = 4 for each condition). These samples were analyzed separately to evaluate differences in variability between samples and retail packaging conditions. For “chistorra” sausages, we divided them into two categories based on the presence or absence of nitrifying agents and analyzed them separately. It is important to highlight that during the 1990s, “chistorra” was commonly

prepared using nitrifying agents, but their usage has declined in recent times. As a result, factors such as alterations in ingredients or processing methods were taken into account to ensure the representativeness of current samples. Additionally, we included two additional categories: “*lacón tradicional*” (a regional product) and “*lacón industrial*” (more widespread nowadays). These categories were also analyzed separately. Moreover, certain products were analyzed before and after cooking using common Spanish household methods (pan-frying with minimal olive oil).

Table 1. List of meat derivatives analyzed, with their local product name and their English description and type of meat.

Local Product Name	English Description + Meat
Albóndigas de carne sin especificar	Meatballs, meat not specified
Albóndigas de carne sin especificar, caseras	Meatballs, meat not specified, homemade
Albóndigas de cerdo	Meatballs, pork
Albóndigas de ternera	Meatballs, veal
Bacon	Cured pork bacon
Bratwurst	Bratwurst type pork sausage
Cabeza de jabalí	Pork head cheese
Carne en lata	Canned pork meat/corned beef
Cecina	Dry-cured beef leg
Chicharrones	Greaves, pork
Chistorra	Small caliber raw pork paprika sausage
Chóped/Chopped	Pork meat luncheon/jagdwurst
Chorizo curado	Fermented dry-cured pork paprika sausage
Chorizo fresco oreado	Aired raw pork paprika sausage
Chorizo de Pamplona	Fermented dry-cured pork paprika sausage, Pamplona type
Chorizo tipo vela	Fermented dry-cured pork paprika sausage, Revilla type
Croquetas de carne sin especificar	Croquettes, meat not specified
Fiambre de pavo	Turkey meat luncheon
Frankfurt	Frankfurter type sausage (chicken and/or pork)
Fuet	Small caliber dry-cured pork sausage, Catalan specialty
Hamburguesa de carne sin especificar	Hamburger, meat not specified
Hamburguesa de carne sin especificar, bar/restaurante	Hamburger, meat not specified, bar / restaurant
Hamburguesa de carne sin especificar, casera	Hamburger, meat not specified, homemade
Hamburguesa de pollo	Hamburger, chicken
Hamburguesa de ternera	Hamburger, veal
Jamón cocido/Jamón de York	Cooked pork ham
Jamón serrano	Dry-cured pork ham
Lacón, industrial	Cooked pork ham, industrial elaboration, Galician specialty
Lacón, tradicional	Cooked pork ham, traditional elaboration, Galician specialty
Lomo embuchado	Dry-cured pork loin
Longaniza de payés/llonganissa de pagés	Dry-cured pork sausage, Catalan specialty
Longaniza imperial	Fermented dry-cured pork sausage, Murcian specialty
Longaniza murciana/salchicha de pellizco	Dry-cured pork sausage, Murcian specialty
Longaniza seca	Dry-cured pork sausage
Morcilla asturiana	Smoked pork blood sausage, Asturian specialty
Morcilla de arroz	Pork blood sausage with rice
Morcilla de cebolla	Pork blood sausage with onion
Morcilla murciana	Pork blood sausage Murcian specialty
Morcón	Bung cap fermented dry-cured pork paprika sausage
Morcón blanco	Pork bung cap sausage
Morcón con sangre	Pork bung cap blood and liver sausage
Mortadela	Pork mortadella
Panceta de cerdo	Dry-cured pork belly
Paté/Fuagrás/Foie-gras	Pork liver paté/duck liver foie gras
Relleno	Pork sausage, with egg, rice and onion
Salami	Fermented pork salami
Salchicha fresca del país	Sausage, country style, fresh
Salchicha de pollo	Chicken sausage, fresh
Salchicha fresca murciana	Pork sausage, Murcian specialty, fresh
Salchichón	Dry-cured pork sausage
Sangrecilla	Cooked blood curd (chicken, pork or veal)
Sobrasada/sobrassada	Cured pork paprika sausage and spread
Tocino	Salted pork backfat

For the determination of NO-heme and total heme pigment concentrations, we followed the procedure described in Bou et al. (2024) [29]. These pigments were extracted in triplicates using final solutions of 80% acetone and 80% acidified acetone, respectively, considering the sample's moisture as described by Hornsey (1956) [30]. Briefly, for NO-heme and heme determination, 2 g of ground samples were weighed under subdued light conditions into 50 mL capacity centrifuge tubes. Aliquots of the aqueous and acidified acetone extracts were injected (40 μ L) into an Agilent 1100 series HPLC system (Waldbronn, Germany) equipped with a Synergi Fusion-RP column (150 $\times$ 4.6 mm, 4 μ m, 80 Å) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and using a UV/Vis detector set at 400 and 414 nm. Water with 0.05% trifluoroacetic acid and acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid were used as mobile phases A and B, respectively. In the aqueous acetone extracts, porphyrins were eluted with a gradient in which phase B increased from 20% to 70% in 5 min and then increased to 100% in 15 min at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. In the acidified acetone extract, total heme was eluted with a gradient in which phase B increased from 20% to 70% in 5 min and then increased to 100% in 10 min at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹.

Nitrosyl-heme and heme iron dietary intake were calculated by multiplying data on nitrosyl-heme and heme iron in MDs by the mean daily intake of related food items for each subject of the cohort. Dietary intakes of nitrosyl-heme and heme iron were based on previously described laboratory determinations available for most consumed EPIC items (39 MDs, 75% of total). For the rest (n = 13), classified as “fresh” MDs (“*albóndigas*”, “*hamburguesas*”, “*salchichas*”, etc.), the dietary intakes of both compounds were indirectly estimated. This approach was chosen as these samples were not considered nutritionally significant sources, with zero or near-zero values, as explained below. A total of 52 items were included in this study to estimate the nitrosyl-heme and heme dietary iron intakes.

For 25% of MD items, heme iron values were estimated, assuming that 40% of total iron was heme iron. Ingredients with non-heme sources were considered, utilizing data from scientific literature [31–33]. For those items, nitrosyl-heme estimates fell into two categories: (1) estimated as zero for MDs lacking nitrifying salts or without high nitrate content (“*albóndigas*” or “*hamburguesas*”), and (2) calculated based on recipes and the nitrosyl-heme content of individual ingredients, such as “*croquetas de carne sin especificar*”.

In the EPIC-Spain study, some records did not specify the types of MDs consumed. These unspecified records were originally grouped together under the label “Not specified (n.s.) MDs”. This aggregated item consumption stood at the beginning of the ranking for most consumed items, both by sex and in all regions of Spain. In order to avoid this, we decided to disaggregate them for this study. For that, we used weighing factors, eliminating the “Not specified (n.s.) MDs” from the list and distributing its consumption among the rest of the MDs.

Spanish MDs information regarding heme iron and nitrosyl-heme was added to the EPIC-Spain food composition database [34].

2.5. Statistical Analysis

Nitrosyl-heme and heme iron were expressed in hemin form (651.94 g/mol molecular weight). Because nitrosyl-heme and heme iron content were right-skewed, we applied the natural logarithm transformation to conduct a symmetric and normal distribution. Arithmetic means for the log-transformed dietary intakes were later exponentiated to obtain the geometric means and the standard deviation. Means were reported as μ g/day. Based on descriptive analysis, linear regression analysis (LRA) included the following variables: sex, age, center, BMI (≤ 25 , 25–30, ≥ 30 kg/m²), waist-to-hip ratio (WHR) (low: <0.71 for women and <0.78 , for men; normal: ≥ 0.71 to <0.84 for women and ≥ 0.78 to <0.94 for men; and high, ≥ 0.84 for women and ≥ 0.94 for men), physical activity level (inactive, moderately inactive, moderately active, active) [35], educational level (none, primary school, technical or professional education, secondary school, longer education and not specified) smoking (non-smoker, smoker, ex-smoker and not specified) and energy intake.

The Spearman correlation coefficient between daily consumption of MDs and daily intake of nitrosyl-heme and heme iron was calculated in order to quantify the strength of the linear relationship between the variables.

In our study of 38,471 subjects, we conducted analyses to identify the major contributors to nitrosyl-heme and heme iron dietary intake. For both components, we calculated the per-item consumption and ranked items by their contribution, from highest to lowest. Additionally, we assessed the influence of different sociodemographic and lifestyle categories on log-transformed nitrosyl-heme and heme iron dietary intakes using *t*-tests, adjusting for sex, age, BMI, center, and energy intake. We also ranked items based on the proportion of variance (R^2); they explained nitrosyl-heme and heme iron dietary intake to determine the most influential MD by using LRA with stepwise forward selection. Dietary items were included in the regression if they met the 0.05 significance level [36]. In order to carry out this analysis, the logarithms of all items were performed to work under the assumption of normality. Moreover, “*chóped/chopped*” was excluded to avoid collinearity.

All the analyses were conducted using RStudio (4.1.3) with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

Table 2 ranks the most consumed MD items in EPIC Spanish centers, showing their nitrosyl-heme and heme iron contents. Nitrosylation percentages varied by item, reflecting their curing efficiency.

Table 2. Top 10 most consumed meat derivative items globally and nitrosyl-heme and heme iron content measured by HPLC method.

Items	Mean (g/d)	NOheme * ($\mu\text{g/g}$) **	Heme Iron ($\mu\text{g/g}$) **	Curing Efficiency (%)
Jamón serrano	5.30	39	41	95.1
Jamón cocido/jamón de York	5.04	22	27	81.5
Albóndigas de carne sin especificar, caseras	2.62	0 ***	105	0.0
Croquetas de carne sin especificar	1.70	1 ****	1	100.0
Chorizo curado	1.67	53	53	100.0
Tocino	1.33	1	1	100.0
Panceta de cerdo	1.11	6	17	35.3
Chorizo fresco oreado	1.01	31	29	106.9
Albóndigas de ternera	0.88	0 ***	143	0
Salchichón	0.58	44	56	78.6

* NOheme—Nitrosyl-heme. ** data expressed as hemin (651.94 g/mol). *** Values estimated as zero. **** Value computed using the nitrosyl-heme content of ingredients.

Table 3 shows the top 10 most consumed items by EPIC centers. Differences in MD items and their amounts are noticeable among centers. In parallel, some MD items were consumed in all of the centers. In this regard, 30% of MD items were consumed in the five EPIC-Spain centers; 20% of MD items were consumed in four EPIC-Spain centers, and 30% of the MD items were consumed in three EPIC-Spain centers. MD intake was lowest in Granada (31.7 g/day) and highest in Navarra (45.4 g/day), with significant differences. Overall, our results showed that this Spanish cohort consumed almost 40 g/day of MDs, with a mean daily intake of 7.14 g/day and nearly 79.0 g/day, in the 10 and 90 percentiles, respectively.

Table 3. Top 10 most consumed items by EPIC-Spain center (Asturias, Navarra, Granada, Murcia, and Gipuzkoa) (Mean intake + SD).

EPIC-Center	% Non Consumers	Items	Mean (g/d)	SD
Asturias	55.6	Jamón cocido/jamón de York	3.21	7.4
	58.9	Jamón serrano	2.93	7.0
	62.7	Chorizo curado	2.76	6.0
	23.2	Tocino	2.54	2.9
	41.4	Lacón	2.15	2.9
	88.2	Albóndigas de carne sin especificar, caseras	1.85	5.9
	84.7	Croquetas de carne sin especificar	1.75	5.0
	96.1	Chorizo fresco oreado	1.16	7.0
	79.3	Panceta de cerdo	0.70	1.8
	58.3	Morcilla asturiana	0.57	0.9
Granada	22.1	Jamón serrano	7.28	7.0
	40.2	Jamón cocido/jamón de York	6.80	7.4
	61.7	Salchichón	2.00	1.5
	84.9	Croquetas de carne sin especificar	1.76	5.0
	91.3	Albóndigas de carne sin especificar, caseras	1.25	5.9
	54.6	Tocino	1.26	2.9
	94.2	Frankfurt	0.42	2.4
	94.8	Chorizo fresco oreado	0.37	7.0
	96.4	Chóped/Chopped	0.36	1.1
	97.6	Albóndigas de cerdo	0.34	0.7
Murcia	24.5	Jamón serrano	6.46	7.0
	26.7	Jamón cocido/jamón de York	5.57	7.4
	68.6	Croquetas de carne sin especificar	1.12	5.0
	59.8	Morcilla murciana	1.06	0.0
	95.8	Albóndigas de carne sin especificar	1.00	1.4
	82.0	Salchicha fresca murciana	0.56	0.0
	32.0	Tocino	0.45	2.9
	39.0	Longaniza de payés	0.42	0.0
	89.7	Frankfurt	0.30	2.4
	91.3	Longaniza imperial	0.26	0.1
Navarra	28.8	Jamón serrano	6.88	6.4
	45.0	Jamón cocido/Jamón de York	5.36	7.4
	70.1	Albóndigas de carne sin especificar, caseras	4.46	5.9
	34.0	Panceta de cerdo	3.88	1.8
	84.3	Albóndigas de ternera	2.42	2.7
	75.1	Chistorra	2.04	0.0
	79.3	Croquetas de carne sin especificar	2.91	5.0
	82.7	Chorizo curado	1.86	6.0
	57.1	Tocino	1.74	2.9
	89.7	Salchicha del país	1.02	1.2
Gipuzkoa	91.8	Chorizo de Pamplona	0.73	2.6
	62.6	Albóndigas de carne sin especificar, caseras	5.44	5.9
	56.0	Jamón cocido/Jamón de York	4.42	7.4
	64.4	Chorizo curado	3.60	6.0
	61.8	Chorizo fresco oreado	3.39	7.0
	57.2	Jamón serrano	3.11	7.0
	79.6	Croquetas de carne sin especificar	1.96	5.0
	89.4	Hamburguesa de carne sin especificar, casera	1.93	2.9
	90.1	Albóndigas de ternera	1.31	2.7
	88.1	Morcilla de cebolla	1.14	0.0
	85.7	Panceta de cerdo	0.78	1.8

With reference to the correlation coefficient between daily consumption of MDs and daily intake of nitrosyl-heme in MD, a very strong correlation was observed ($p < 0.05$). In relation to heme iron from MD, the correlation with MDs was lower but still statistically significant and considered strong ($p < 0.05$).

With regard to the contribution of nitrosyl-heme dietary intake in MDs for the EPIC-Spain cohort (Table 4), five items accounted for nearly 25% of the cohort's nitrosyl-heme dietary intake from MDs. The items explaining most of the variance in nitrosyl-heme were "jamón serrano" (17.6%), "jamón cocido/jamón de York" (20.4%), and "chorizo curado" (21.9%) when all MDs were considered (expressed as cumulative R²). For heme iron intake, ten

items represented just over 30% of the cohort's heme iron dietary intake, with “chorizo curado” contributing the most to the variance (8.7%).

Table 4. Contribution to the variability of nitrosyl-heme and heme iron based on meat derivatives in the EPIC-Spain cohort.

Contribution to Total Intake of Nitrosyl-Heme		Contribution to Total Intake of Heme Iron	
Food Item	Adj. R ²	Food Item	Adj. R ²
LRA 1: adjusted by Jamón serrano	0.176	LRA 1: adjusted by Chorizo curado	0.087
LRA 2: LRA 1 + Chorizo curado	0.204	LRA 2: LRA 1 + Albóndigas de carne sin especificar, caseras	0.124
LRA 3: LRA 2 + Jamón cocido/Jamón de York	0.219	LRA 3: LRA 2 + Jamón serrano	0.160
LRA 4: LRA 3 + Tocino	0.234	LRA 4: LRA 3 + Lacón	0.195
LRA 5: LRA 4 + Albóndigas de carne, sin especificar	0.245	LRA 5: LRA 4 + Albóndigas de ternera	0.225
LRA 6: LRA 5 + Chorizo fresco oreado	0.252	LRA 6: LRA 5 + Morcilla de cebolla	0.249
LRA 7: LRA 6 + Lacón	0.260	LRA 7: LRA 6 + Longaniza de payés/lloganissa de pagés	0.264
LRA 8: LRA 7 + Chorizo tipo Pamplona	0.267	LRA 8: LRA 7 + Salchichón	0.279
LRA 9: LRA 8 + Sobrasada/sobrassada	0.275	LRA 9: LRA 8 + Hamburguesa de carne sin especificar, casera	0.294
LRA 10: LRA 9 + Frankfurt	0.282	LRA 10: LRA 9 + Albóndigas de carne sin especificar	0.306
LRA 11: LRA 10 + Longaniza de payés/lloganissa de pagés	0.286	LRA 11: LRA 10 + Chorizo fresco oreado	0.318
LRA 12: LRA 11 + Panceta de cerdo	0.291	LRA 12: LRA 11 + Morcilla asturiana	0.329
LRA 13: LRA 12 + Lomo embuchado	0.295	LRA 13: LRA 12 + Morcilla murciana	0.339
LRA 14: LRA 13 + Salchichón	0.298	LRA 14: LRA 13 + Jamón cocido/Jamón de York	0.348
LRA 15: LRA 14 + Chistorra	0.306	LRA 15: LRA 14 + Morcilla de arroz	0.357
LRA 16: LRA 15 + Morcilla asturiana	0.305	LRA 16: LRA 15 + Hamburguesa de ternera	0.366
LRA 17: LRA 16 + Paté/Fuagrás/Foie-gras	0.308	LRA 17: LRA 16 + Frankfurt	0.369
LRA 18: LRA 17 + Albóndigas de ternera	0.310	LRA 18: LRA 17 + Sobrasada/sobrassada	0.374
LRA 19: LRA 18 + Hamburguesa de carne sin especificar, casera	0.313	LRA 19: LRA 18 + Salchicha fresca del país	0.379
LRA 20: LRA 19 + Morcilla de cebolla	0.314	LRA 20: LRA 19 + Sangrecilla	0.383
LRA 21: LRA 20 + Morcilla murciana	0.315	LRA 21: LRA 20 + Lomo embuchado	0.387
LRA 22: LRA 21 + Croquetas de carne sin especificar	0.316	LRA 22: LRA 21 + Panceta de cerdo	0.389
LRA 23: LRA 22 + Chorizo tipo vela	0.317	LRA 23: LRA 22 + Albóndigas de cerdo	0.392
LRA 24: LRA 23 + Sangrecilla	0.318	LRA 24: LRA 23 + Chorizo de Pamplona	0.394
LRA 25: LRA 24 + Longaniza murciana/salchicha de pellizco	0.319	LRA 25: LRA 24 + Hamburguesa de pollo	0.396
LRA 26: LRA 25 + Longaniza imperial	0.319	LRA 26: LRA 25 + Paté/Fuagrás/Foie-gras	0.398
LRA 27: LRA 26 + Morcilla de arroz	0.319	LRA 27: LRA 26 + Hamburguesa de carne sin especificar, bar/restaurante	0.400
LRA 28: LRA 27 + Bacon	0.320	LRA 28: LRA 27 + Chóped/Chopped	0.402
LRA 29: LRA 28 + Hamburguesa de ternera	0.320	LRA 29: LRA 28 + Tocino	0.403
LRA 30: LRA 29 + Salami	0.320	LRA 30: LRA 29 + Relleno	0.403
LRA 31: LRA 30 + Longaniza seca	0.320	LRA 31: LRA 30 + Longaniza murciana/salchicha de pellizco	0.404
LRA 32: LRA 31 + Cecina	0.320	LRA 32: LRA 31 + Salchicha fresca murciana	0.405
LRA 33: LRA 32 + Embutido de pavo	0.320	LRA 33: LRA 32 + Chorizo tipo Vela	0.405
LRA 34: LRA 33 + Carne en lata	0.321	LRA 34: LRA 33 + Salami	0.406
LRA 35: LRA 34 + Salchicha de pollo	0.321	LRA 35: LRA 34 + Longaniza imperial	0.406
LRA 36: LRA 35 + Albóndigas de carne sin especificar	0.321	LRA 36: LRA 35 + Cecina	0.406
LRA 37: LRA 36 + Mortadela	0.321	LRA 37: LRA 36 + Salchicha de pollo	0.407
LRA 38: LRA 37 + Hamburguesa de carne sin especificar, bar/restaurante	0.321	LRA 38: LRA 37 + Croquetas de carne sin especificar	0.407

p-value for entrance forward stepwise regression < 0.05. LRA—Linear regression analysis.

Table 5 shows the adjusted geometric means of nitrosyl-heme and heme iron separately for categories of sex, age, center, WHR, BMI, smoking status and physical activity. In the Spanish cohort, adjusted geometric means were 528.6 µg/day for nitrosyl-heme and 1676.2 µg/day for heme iron, considering adjustments for sex, age, BMI, center, and energy intake. A significant pattern of differences was found for the daily intake of nitrosyl-heme across the categories of sex, center, energy and educational level. For heme iron, significant differences were found by sex, center, energy, and smoking status.

Table 5. Adjusted nitrosyl-heme and heme iron intakes by lifestyle and sociodemographic characteristics in EPIC-Spain participants.

	n	Nitrosyl-Heme (µg/d) §**			Heme Iron (µg/d) ‡***		
		Geometric Mean	SD	Median	Geometric Mean	SD	Median
Total *	38,471	529	470.9	397	1676	1057.9	1396
Sex §‡							
Male	14,632	705	632.2	534	2267	1312.6	1936
Female	23,839	420	305.5	344	1312	650.6	1165
Age (y)							
<33	16	533	236.0	456	1504	694.6	1238
33 to <44	11,689	528	524.3	406	1624	979.2	1361
44 to <54	15,420	550	558.5	411	1764	1110.2	1462
54 to < 64	10,371	492	494.2	375	1604	999.3	1342
≥64	975	421	343.1	335	1347	786.1	1126
BMI (kg/m²)							
<25	8533	493	394.9	398	1644	890.1	1429
>25–30	18,549	546	474.3	411	1749	1079.0	1460
>30	11,389	527	516.1	377	1579	1115.8	1261
Center §‡							
Asturias	8052	418	250.9	351	1466	785.3	1256
Granada	7223	356	238.9	294	1255	746.0	1061
Murcia	7956	509	354.6	412	1740	1065.4	1449
Navarra	7638	567	389.5	452	1942	1185.0	1604
Gipuzkoa	7602	527	342.2	430	1839	1066.1	1554
WHR (cm)							
Low	531	402	285.8	336	1410	745.6	1247
Normal	19,650	512	434.4	395	1702	1081.8	1407
High	18,290	550	510.0	403	1781	1265.7	1437
Cambridge Physical Activity Index (Met-h/week)							
Inactive	14,771	459	380.0	361	1397	787.8	1183
Moderately inactive	12,773	508	447.1	391	1584	930.7	1325
Moderately active	6799	596	533.8	446	1968	1186.2	1663
Active	4128	728	629.6	555	2246	1292.6	1937
Level School §							
None	13,110	486	435.9	362	1455	919.2	1178
Primary School	14,891	526	483.4	392	1712	1055.8	1401
Technical, Professional	3180	573	502.9	431	1985	1146.8	1690
Secondary School	2525	591	504.3	467	1776	1063.5	1504
Longer Education	4509	598	476.2	479	1725	931.1	1478
Not specified	256	491	341.6	404	1481	772.5	1280
Smoking Status ‡							
Never	21,211	448	372.8	348	1420	835.1	1180
Former	6815	641	557.5	494	1918	1094.8	1625
Current	10,423	620	459.4	471	1948	1169.1	1633
Not specified	22	518	581.3	242	1476	841.3	1330

* Adjusted by sex, age, BMI, center and energy intake. § *p*-value was significant (*p*-value < 0.05) in sex, energy, center and level school for nitrosyl-heme intake ‡ *p*-value were significant (*p*-value < 0.05) in sex, energy, center and smoking status for heme iron intake ** data expressed as hemin (molecular weight: 651.94 g/mol).

The daily geometric mean intake of nitrosyl-heme from MD was highest in men, adults aged 44 to 54 years, overweight individuals, those with high WHR, former smokers and those with longer education. Nitrosyl-heme daily intake consumption seemed to increase with higher levels of physical activity (58.60% difference between active and inactive groups). As to the regional distribution, Navarra had the highest nitrosyl-heme intake,

while Granada had the lowest ($p < 0.05$). The same pattern was found for daily heme iron intake, except that, unlike nitrosyl-heme, higher intakes were observed in individuals with technical/professional education and smokers.

The complete list of MDs with nitrosyl-heme and heme iron content is in Table S1. “Sangrecilla” was the item with the highest heme iron content even though its content of nitrosyl-heme was not high. Following in the ranking of items with the highest content of heme iron, we found the different types of “*morcillas*”: “*morcilla de cebolla*”, “*morcilla de arroz*”, “*morcilla asturiana*” and “*morcilla murciana*”. In regard to the content of nitrosyl-heme, “*morcilla asturiana*” was the item with the highest values, which differentiates it from other “*morcillas*”, due to the specific methods of smoking, drying, and fermentation utilized in their production. Next were “*cecina*”, “*paté/fuagrás/foie-gras*”, “*frankfurt*” and “*chorizo tipo vela*”.

We also calculated the average consumption per item, given the fact that some MDs may not be high in nitrosyl-heme or heme iron content but still be highly consumed by the EPIC-Spain cohort. This is what happens, for instance, with “*jamón serrano*”, “*jamón cocido/jamón de York*”, and “*chorizo curado*”. These are all low nitrosyl-heme-containing foods, but they are highly consumed by this Spanish population. Conversely, some items present a high content of nitrosyl-heme, but their daily intakes in the EPIC-Spain cohort were low. Examples of this include “*cecina*”, “*chorizo tipo vela*”, or “*longaniza imperial*” (Table S1). The same pattern was observed for heme iron content with “*jamón cocido/jamón de York*”, “*croquetas de carne sin especificar, caseras*”, and “*jamón serrano*”, which had low heme iron content but remained at high daily intake by the EPIC-Spain cohort.

Table S2 shows the ranking of the most consumed MD items that contribute the most to total nitrosyl-heme dietary intake for EPIC-Spain cohort. “*Jamón serrano*” had the highest contribution, followed by “*jamón cocido/jamón de York*” and various “*chorizo*” types. When considering only the consumers of those items, we observed significant variations in the results, with “*carne en lata*” as the top contributor (1038.22 µg/d), followed by “*frankfurt*” (692.0 µg/d), “*cecina*” (585.9 µg/d) and “*chorizo curado*” (524.2 µg/d).

Regarding the items that contribute the most to total heme iron dietary intake to EPIC-Spain cohort, Table S3 shows that “*albóndigas de carne sin especificar caseras*”, “*jamón serrano*”, “*morcilla de cebolla*”, and “*jamón cocido/jamón de York*”, were the highest contributors. Some MD items, such as “*hamburguesa de carne sin especificar*”, “*cecina*”, or “*sangrecilla*”, contained large amounts of heme iron, but their contribution in the cohort was low. When considering only the consumers of those items, it was observed that “*sangrecilla*” was the leading contributor to the total dietary intake of heme iron (16,612.3 µg/d), followed by “*morcilla de arroz*” (13,075.8 µg/d) and “*morcilla de cebolla*” (6208.3 µg/d).

4. Discussion

To the best of our knowledge, no data on the levels of nitrosyl-heme consumption for any population were available prior to this study. Moreover, any available information on nitrosyl-heme and heme iron content in MDs was very scarce [15–19]. Our study is the first to present data based on direct content measurements by HPLC in MDs, and it does so for a large ($n = 38,471$) prospective cohort.

Among the top 10 globally consumed MD items in the EPIC Spanish population, “*jamón serrano*” and “*jamón cocido/jamón de york*” were the most popular. In contrast, different trends were observed in other populations, even when they are similar, such as Italy or Germany where the most consumed MD items were dry-fermented sausages [37] and bratwurst [38], respectively.

Regarding differences between EPIC centers our study shows that the consumption of several MDs was variable, possibly because of local gastronomic differences. Although the 10 most-consumed items were mostly the same for all centers (but with varying rankings of consumption), some centers such as Murcia, Asturias or Gipuzkoa presented typical regional foods (like “*morcilla murciana*”, “*lacón*” and “*morcilla de cebolla*”, respectively) amidst one of their most consumed MD items. Even though the percentage of non-consumers for

some MDs is very high, they still stand within the top 10 of most consumed MD items. This evidence suggests high dietary intakes for those individuals who indeed consumed them.

With regard to sociodemographic and lifestyle characteristics, once adjusted for energy intake, males reported higher daily intakes of nitrosyl-heme and heme iron compared to females. This could be attributed to men generally consuming more meat and MDs [39,40], both rich in nitrosyl-heme and heme iron. Nowadays, the tendency for higher dietary intake of MDs by men appears to be extensive globally, as has already been reported in Europe, Australia and the USA [41]. In our study, “*jamón cocido/jamón de York*” was the most-consumed MD item among women, while “*jamón serrano*” was preferred by men. These results seem to be different compared to those in other populations [41,42].

As anticipated, a notably positive correlation was observed between MDs and nitrosyl-heme dietary intake. This strong positive correlation can be attributed to the analysis of foods known to be rich in heme iron/nitrosyl-heme, exclusively considering heme iron/nitrosyl-heme derived from these food sources. Furthermore, these findings align with expectations, given that MDs represent the sole source of nitrosyl-heme within the diet [43], while heme iron is derived from a broader range of protein foods [44]. Considering these correlations, we compared our results with those of Rouhani et al. 2014 [45], which showed a similar association between red meat and MD consumption and obesity risk, higher BMI, and waist circumference. While our findings align in the same direction, they were not statistically significant ($p > 0.05$).

The items that contributed the most to dietary intakes of nitrosyl-heme and heme iron were also identified. It explains how foods contribute to their total dietary intake and to between-person variance. In this study, five food items alone explained 24.5% of nitrosyl-heme intake variance. For heme iron, nine MD items explained almost 30% of the variance. Contrary to findings in other studies, where fewer items are needed to explain a given proportion of between-person variance in a single nutrient/component than the same proportion of between-person variance in total intake [46,47], our study presents a distinct pattern. As observed, more than five items are needed for this purpose.

Regarding the amount of nitrosyl-heme and heme iron present in each of the MDs, we categorized and ordered those items from highest to lowest mean daily intake (g/day), presenting their amounts per gram of MDs. There is only one literature source from which we are able to compare our results on curing efficiency. It is a single study that estimated the nitrosylated heme iron content for each type of MDs by applying a fixed value provided by the French Pork Institute [20], resulting in higher curing efficiency (67%) than our study, with which average curing efficiencies were 44% for raw MDs and 52% for cooked MDs using HPLC data.

Referring to the curing efficiency, some items presented 100% or more of nitrosylated heme iron due to analytical error with random components, producing random variations in the data, but when analyzed, they tend to compensate for each other. The mean error tended to be 0, but the quantities were not to induce bias that could create a random error.

Our results showed an appreciable variability in the proportion of nitrosylated heme iron, dependent on the type of MDs. For example, referring to “*sangrecilla*” was the item with the highest heme iron content because it is made from coagulated blood. Still, its nitrosylation percentage is one of the lowest, so its contribution to the dietary intake of nitrosyl-heme was unexpected since there is no added nitrifying agents in their formulation. “*Morcilla asturiana*” stood out with higher values of nitrosyl-heme due to unique smoking, drying, and fermentation methods in its production, setting it apart from other “*morcillas*” and showing a 55% nitrosylation. Conversely, “*cecina*” had high nitrosylation, likely due to its high heme iron (183 mg/kg) and nitrosyl-heme (105 mg/kg) content, resulting from rich protein and heme proteins in beef meat.

The proportion of nitrosylated heme iron could potentially elucidate the conversion of nitrate and/or nitrite into NO, resulting in an elevated nitrosyl-heme content while also providing insights into the equilibrium and stability of various heme species under different conditions. In this study, we present the nitrosyl-heme and heme iron determination using

the results obtained from the HPLC method. We did so to avoid potential overestimations of some MDs if the Hornsey (classical spectrophotometric) method had been used. This finding could provide an explanation for curing efficiencies that surpass 100% in products that include paprika as an ingredient due to induced analytical error, which resulted in random variations in the data.

We calculated the average consumption per item due to varying nitrosyl-heme content. Some low-nitrosyl-heme foods like *“jamón serrano”* and *“jamón cocido/jamón de York”*, were highly consumed in this cohort. Conversely, some items with high nitrosyl-heme had low intakes (e.g., *“cecina”* or *“chorizo tipo vela”*). Notably, for consumers of those items, *“carne en lata”*, *“cecina”*, and *“sangrecilla”*, usually low contributors in the cohort, ranked high, indicating significant consumption.

A similar situation was observed for heme iron content; *“jamón cocido/jamón de York”*, *“croquetas de carne sin especificar, caseras”* or *“jamón serrano”* presented low heme iron contents but high daily intake by the EPIC-Spain cohort. In contrast, MDs like *“hamburguesa de carne sin especificar”*, *“cecina”* or *“sangrecilla”* contained significant heme iron amounts, but their contribution in the cohort was low. Concerning the top contributors to heme iron intake among consumers of those items, there was variability. *“Sangrecilla”* topped the list, followed by *“morcilla de arroz”* and *“morcilla de cebolla”*. Conversely, *“jamón cocido/jamón de York”* or *“chorizo curado”* made smaller contributions to heme iron intake. This highlights that consumers of those items, which are less commonly consumed overall, consumed significant quantities of them.

It is important to note that most studies presented PM dietary intake data as a global value and did not differentiate items by their subtype, cooking or curing processes, or added ingredients [48–50]. Quantifying the mean consumption of different PMs, as well as their treatments, cooking and added ingredients, is important since differences in processing and composition could be associated with health outcomes [51]. To date, very few studies have assessed PMs according to their subtypes [41,52,53]. This is the reason why one of our research goals was to identify the different types of PMs consumed in the EPIC-Spain cohort and to analyze their composition. Furthermore, up to the present time, not many studies have assessed the combined analysis of nitrosyl-heme and heme iron content in MDs [54,55], making our research valuable in this context.

An important limitation to our analysis is that the Spanish EPIC study was based on a non-representative sampling of the Spanish general population. However, the prospective design precluded recall bias, while selection bias was minimized by the very high rate of follow-up over a long period of time. Moreover, subjects came from different socio-economic backgrounds and different geographical regions, and the pattern of dietary intake and other lifestyle factors was very similar to those observed in population surveys performed in the Spanish areas included in the present study [51,56]. Regarding the strengths of the study, dietary intakes of nitrosyl-heme and heme iron contents were calculated based on laboratory measurements of selected food items using the HPLC method. We also observed a very large dataset (38,471 subjects); a large number ($n = 52$) of MD items were included, most of them analyzed ($n = 39$) and used through validated methodology in the dietary estimation [57]. Furthermore, the MD samples analyzed were obtained from different geographical locations, including different elaboration methods, commercial brands and packaging, and the changes in manufacturing that have occurred from the 90s until now have been taken into account. This is important considering that even high-quality food composition tables will produce poor estimates when combined with low-quality data because of the lack of validity and/or reliability of a dietary questionnaire.

5. Conclusions

In conclusion, we have assessed nitrosyl-heme iron and heme iron intake in the EPIC-Spain cohort, identifying the major contributors and exploring sociodemographic and lifestyle factors. This contributes valuable insights into nitrosyl-heme exposure, particularly its association with processed meat and colorectal cancer risk.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu16060878/s1>, Table S1. All meat derivatives mean intake (g/d) from EPIC-Spain cohort and their levels of nitrosyl-heme and heme iron content measured by HPLC method. Table S2. Ranking of most consumed meat derivatives items that contribute most to total nitrosyl-heme intake in EPIC-Spain cohort. Table S3. Ranking of most consumed meat derivatives items that contribute most to total heme iron intake.

Author Contributions: P.J., L.L.-B., A.F.-C. and L.R.-B. conceptualization; L.L.-B. and L.R.-B. formal analysis, investigation, methodology, visualization, and data curation; L.R.-B.: writing—original draft, and writing—review and editing; P.J. and L.R.-B.: funding acquisition, project administration, resources. P.J.: supervision, validation, and writing—review and editing. L.L.-B. and A.F.-C. writing—review and editing; R.B., J.R.Q., P.A., M.J.S., M.R.-B., M.G., C.M.-I., A.G., M.-D.C., S.M.C.-Y., J.M.H.C. and A.A. writing—review and editing; P.J. had primary responsibility for the final content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Instituto de Salud Carlos III through the PI19/00817 project (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe) and through the PFIS FI20/00006 predoctoral funding (co-funded by the European Social Fund (ESF), investing in your future). The coordination of EPIC is financially supported by the European Commission (DG-SANCO) and the International Agency for Research on Cancer. This study is part of the EPIC-Spain Study. The EPIC-Spain cohort is supported by the Health Research Fund (FIS)—Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), the Regional Governments of Andalucía, Asturias, Gipuzkoa, Murcia, and Navarra, and the Catalan Institute of Oncology (ICO). We thank the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of The Declaration of Helsinki, and the ethical approval for the EPIC study was obtained from the ethical review board (Ref: PR098/21, approved on 25 March 2021) of the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the local ethics committees in the participating countries.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on reasonable request. The data are not publicly available due to the research group's policy.

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

References

1. Battaglia Richi, E.; Baumer, B.; Conrad, B.; Darioli, R.; Schmid, A.; Keller, U. Health Risks Associated with Meat Consumption: A Review of Epidemiological Studies. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2015**, *85*, 70–78. [\[CrossRef\]](#)
2. Jakszyn, P.; Luján-Barroso, L.; Agudo, A.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Molina, E.; Sánchez, M.J.; Fonseca-Nunes, A.; Siersema, P.D.; Mattiello, A.; Tumino, R.; et al. Meat and heme iron intake and esophageal adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 2744–2750. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. World Cancer Research Fund AI for CR. Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer. Continuous Update Project Expert Report. 2018. Available online: <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/> (accessed on 21 August 2023).
4. Bouvard, V.; Loomis, D.; Guyton, K.Z.; Grosse, Y.; Ghissassi, F.E.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 1599–1600. [\[CrossRef\]](#)
5. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Red Meat and Processed Meat*; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2018. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507971/> (accessed on 10 October 2023).
6. Steinberg, P. Red Meat-Derived Nitroso Compounds, Lipid Peroxidation Products and Colorectal Cancer. *Foods* **2019**, *8*, 252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Cao, H.; Wang, C.; Chai, R.; Dong, Q.; Tu, S. Iron intake, serum iron indices and risk of colorectal adenomas: A meta-analysis of observational studies. *Eur. J. Cancer Care* **2017**, *26*, e12486. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Ma, J.; Li, Q.; Fang, X.; Chen, L.; Qiang, Y.; Wang, J.; Wang, Q.; Min, J.; Zhang, S.; Wang, F. Increased total iron and zinc intake and lower heme iron intake reduce the risk of esophageal cancer: A dose-response meta-analysis. *Nutr. Res.* **2018**, *59*, 16–28. [\[CrossRef\]](#)
9. Pegg, R.B.; Shahidi, F. *Nitrite Curing of Meat: The N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*; Trumbull, C.T., Ed.; Food and Nutrition Press Inc.: Trumbull, CT, USA, 2000; Available online: <https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=j9D9tgg5Nh8C&>

- oi=fnd&pg=PP1&ots=hmBDBszYUe&sig=WKdxwq0pmg74dIGGwYBS5H9DzYo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed on 25 August 2023).
10. Santarelli, R.L.; Pierre, F.; Corpet, D.E. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr. Cancer* **2008**, *60*, 131–144. [CrossRef]
 11. Pierre, F.H.F.; Santarelli, R.L.; Allam, O.; Tache, S.; Naud, N.; Gueraud, F.; Corpet, D.E. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 567–573. [CrossRef]
 12. Wolk, A. Potential health hazards of eating red meat. *J. Intern. Med.* **2017**, *281*, 106–122. [CrossRef]
 13. Kruger, C.; Zhou, Y. Red meat and colon cancer: A review of mechanistic evidence for heme in the context of risk assessment methodology. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *118*, 131–153. [CrossRef]
 14. Kostka, T.; Fohrer, J.; Guigas, C.; Briviba, K.; Seiwert, N.; Fahrer, J.; Steinberg, P.; Empl, M.T. Synthesis and in vitro characterization of the genotoxic, mutagenic and cell-transforming potential of nitrosylated heme. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 3911–3927. [CrossRef] [PubMed]
 15. Borrajo, P.; Karwowska, M.; Stasiak, D.M.; Lorenzo, J.M.; Żyśko, M.; Solska, E. Comparison of the Effect of Enhancing Dry Fermented Sausages with *Salvia hispanica* and *Nigella sativa* Seed on Selected Physicochemical Properties Related to Food Safety during Processing. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 9181. [CrossRef]
 16. Higuero, N.; Moreno, I.; Lavado, G.; Vidal-Aragón, M.C.; Cava, R. Reduction of nitrate and nitrite in Iberian dry cured loins and its effects during drying process. *Meat Sci.* **2020**, *163*, 108062. [CrossRef] [PubMed]
 17. Higuero, N.; Ramírez, M.R.; Vidal-Aragón, M.d.C.; Cava, R. Influence of high-pressure processing and varying concentrations of curing salts on the color, heme pigments and oxidation of lipids and proteins of Iberian dry-cured loins during refrigerated storage. *LWT* **2022**, *160*, 113251. [CrossRef]
 18. Magrinyà, N.; Bou, R.; Rius, N.; Codony, R.; Guardiola, F. Use of tocopherol extract and different nitrite sources and starter cultures in the production of organic botifarra catalana, a cooked cured sausage. *Food Sci. Technol. Int.* **2016**, *22*, 221–234. [CrossRef]
 19. Terns, M.J.; Milkowski, A.L.; Rankin, S.A.; Sindelar, J.J. Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 311–318. [CrossRef]
 20. Bastide, N.; Morois, S.; Cadeau, C.; Kangas, S.; Serafini, M.; Gusto, G.; Dossus, L.; Pierre, F.H.; Clavel-Chapelon, F.; Boutron-Ruault, M.-C. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2016**, *25*, 640–647. [CrossRef]
 21. He, J.; Fang, A.; Yu, S.; Shen, X.; Li, K. Dietary Nonheme, Heme, and Total Iron Intake and the Risk of Diabetes in Adults: Results from the China Health and Nutrition Survey. *Diabetes Care* **2020**, *43*, 776–784. [CrossRef]
 22. Luan, D.C.; Li, H.; Li, S.J.; Zhao, Z.; Li, X.; Liu, Z.M. Body iron stores and dietary iron intake in relation to diabetes in adults in North China. *Diabetes Care* **2008**, *31*, 285–286. [CrossRef]
 23. Marra, A.I.; Salgado, A.; Prieto, B.; Carballo, J. Biochemical characteristics of dry-cured lacon. *Food Chem.* **1999**, *67*, 33–37. [CrossRef]
 24. Hamdaoui, M.; Doghri, T.; Tritar, B. Bioavailability of Iron from a Traditional Tunisian Meal with Chickpeas Fed to Healthy Rats. *Ann. Nutr. Metab.* **2008**, *36*, 135–140. [CrossRef] [PubMed]
 25. Riboli, E. EPIC Project: Rationale and study design. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Epidemiol.* **1997**, *26* (Suppl. S1), S6–S14. [CrossRef] [PubMed]
 26. Riboli, E.; Hunt, K.J.; Slimani, N.; Ferrari, P.; Norat, T.; Fahey, M.; Charrondière, U.R.; Hémon, B.; Casagrande, C.; Vignat, J.; et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): Study populations and data collection. *Public Health Nutr.* **2002**, *5*, 1113–1124. [CrossRef]
 27. González, C.A.; Navarro, C.; Martínez, C.; Quirós, J.R.; Dorronsoro, M.; Barricarte, A.; Tormo, M.J.; Agudo, A.; Chirlaque, M.; Amiano, P.; et al. El estudio prospectivo europeo sobre cáncer y nutrición (EPIC). *Rev. Esp. Salud Pública* **2004**, *78*, 167–176. [CrossRef] [PubMed]
 28. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods [Internet]. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *7*, 9–25. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj> (accessed on 18 January 2022).
 29. Bou, R.; Farran-Codina, A.; Brime, L.R.; Arnau, J.; Sabeña, G.; Jakszyn, P. Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives. *J. Food Compos. Anal.* **2024**, *125*, 105832. [CrossRef]
 30. Horwitz, W.; Latimer, G.W. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; Association of Official Analytical Chemistry International: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
 31. Kojima, K.; Yasui, A. Selective Determination of Heme and Nonheme Iron in Animal Foods by Column Separation and Atomic Absorption Spectrophotometry. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **1993**, *40*, 35–41. [CrossRef]
 32. Kongkachuichai, R.; Napatthalung, P.; Charoensiri, R. Heme and Nonheme Iron Content of Animal Products Commonly Consumed in Thailand. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 389–398. [CrossRef]
 33. Carpenter, C.E. Evaluation of Methods Used in Meat Iron Analysis and Iron Content of Raw and Cooked Meats. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1824–1827. [CrossRef]
 34. Deharveng, G.; Riboli, E. Comparison of nutrients in the food composition tables available in the nine European countries participating in EPIC. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 60–79. [CrossRef]

35. Wareham, N.J.; Jakes, R.W.; Rennie, K.L.; Schuit, J.; Mitchell, J.; Hennings, S.; Day, N.E. Validity and repeatability of a simple index derived from the short physical activity questionnaire used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* **2003**, *6*, 407–413. [\[CrossRef\]](#)
36. Armitage, P.; Berry, G.; Matthews, J.N.S. *Statistical Methods in Medical Research*, 4th ed.; Malden, M.A., Ed.; Blackwell Science: Hoboken, NJ, USA, 2001; 817p. [\[CrossRef\]](#)
37. Toldrá, F. (Ed.) *Handbook of Meat Processing*, 1st ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2010; 566p, Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780813820897.fmatter> (accessed on 10 October 2023).
38. Spencer, J. Consumption. In *The International Meat Trade*, 1st ed.; Spencer, J., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2003; pp. 3–20. Available online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855735347500137> (accessed on 10 October 2023).
39. Linseisen, J. Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: Results from 24-h dietary recalls. *Public Health Nutr.* **2002**, *5*, 1243–1258. [\[CrossRef\]](#)
40. Ems, T.; St Lucia, K.; Huecker, M.R. Biochemistry, Iron Absorption. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448204/> (accessed on 10 October 2023).
41. Sych, J.; Kaelin, I.; Gerlach, F.; Wróbel, A.; Le, T.; FitzGerald, R.; Pestoni, G.; Faeh, D.; Krieger, J.-P.; Rohrmann, S. Intake of Processed Meat and Association with Sociodemographic and Lifestyle Factors in a Representative Sample of the Swiss Population. *Nutrients* **2019**, *11*, 2556. [\[CrossRef\]](#)
42. Ward, M.H.; Sinha, R.; Heineman, E.F.; Rothman, N.; Markin, R.; Weisenburger, D.D.; Correa, P.; Zahm, S.H. Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *Int. J. Cancer* **1997**, *71*, 14–19. [\[CrossRef\]](#)
43. Kuhnle, G.G.; Story, G.W.; Reda, T.; Mani, A.R.; Moore, K.P.; Lunn, J.C.; Bingham, S.A. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 1040–1047. [\[CrossRef\]](#)
44. Aglago, E.K.; Cross, A.J.; Riboli, E.; Fedirko, V.; Hughes, D.J.; Fournier, A.; Jakszyn, P.; Freisling, H.; Gunter, M.J.; Dahm, C.C.; et al. Dietary intake of total, heme and non-heme iron and the risk of colorectal cancer in a European prospective cohort study. *Br. J. Cancer* **2023**, *128*, 1529–1540. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Rouhani, M.H.; Salehi-Abargouei, A.; Surkan, P.J.; Azadbakht, L. Is there a relationship between red or processed meat intake and obesity? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obes. Rev.* **2014**, *15*, 740–748. [\[CrossRef\]](#)
46. Stryker, W.S.; Salvini, S.; Stampfer, M.J.; Sampson, L.; Colditz, G.A.; Willett, W.C. Contributions of specific foods to absolute intake and between-person variation of nutrient consumption. *J. Am. Diet. Assoc.* **1991**, *91*, 172–178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Byers, T.; Marshall, J.; Fiedler, R.; Zielezny, M.; Graham, S. Assessing nutrient intake with an abbreviated dietary interview. *Am. J. Epidemiol.* **1985**, *122*, 41–50. [\[CrossRef\]](#)
48. Nomura, A.M.Y.; Hankin, J.H.; Kolonel, L.N.; Wilkens, L.R.; Goodman, M.T.; Stemmermann, G.N. Case-control study of diet and other risk factors for gastric cancer in Hawaii (United States). *Cancer Causes Control* **2003**, *14*, 547–558. [\[CrossRef\]](#)
49. González, C.A.; Jakszyn, P.; Pera, G.; Agudo, A.; Bingham, S.; Palli, D.; Ferrari, P.; Boeing, H.; del Giudice, G.; Plebani, M.; et al. Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 345–354. [\[CrossRef\]](#)
50. Cross, A.J.; Freedman, N.D.; Ren, J.; Ward, M.H.; Hollenbeck, A.R.; Schatzkin, A.; Sinha, R.; Abnet, C.C. Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 432–442. [\[CrossRef\]](#)
51. Linseisen, J.; Rohrmann, S.; Norat, T.; Gonzalez, C.A.; Iraeta, M.D.; Gómez, P.M.; Chirlaque, M.-D.; Pozo, B.G.; Ardanaz, E.; Mattisson, I.; et al. Dietary intake of different types and characteristics of processed meat which might be associated with cancer risk—Results from the 24-h diet recalls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr.* **2006**, *9*, 449–464. [\[CrossRef\]](#)
52. Heuer, T. Food consumption of adults in Germany: Results of the German National Nutrition Survey II based on diet history interviews. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 1603–1614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Sui, Z.; Raubenheimer, D.; Rangan, A. Consumption patterns of meat, poultry, and fish after disaggregation of mixed dishes: Secondary analysis of the Australian National Nutrition and Physical Activity Survey 2011–2012. *BMC Nutr.* **2017**, *3*, 52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Sakata, R.; Oshida, T.; Jin, F.; Qi, X.H. *Red Pigment Features in Chinese Raw Ham*; Beijing, China, 2007. Available online: https://digicomst.ie/wp-content/uploads/2020/05/2007_05_12.pdf (accessed on 27 June 2022).
55. Bonifacie, A.; Gatellier, P.; Promeyrat, A.; Nassy, G.; Picgirard, L.; Scislowski, V.; Santé-Lhoutellier, V.; Théron, L. New Insights into the Chemical Reactivity of Dry-Cured Fermented Sausages: Focus on Nitrosation, Nitrosylation and Oxidation. *Foods* **2021**, *10*, 852. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Ward, H.A. Meat and haem iron intake in relation to glioma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Eur. J. Cancer Prev.* **2018**, *27*, 379–383. [\[CrossRef\]](#)
57. EPIC Group of Spain, European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain I. *Foods Int. J. Epidemiol.* **1997**, *26* (Suppl. S1), S91–S99. [\[CrossRef\]](#)

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

Nitrosyl-Heme and Heme Iron Intake from Processed Meats in Subjects from the EPIC-Spain Cohort

Lucía Rizzolo-Brime ^{1,2}, **Andreu Farran-Codina** ³, **Ricard Bou** ⁴, **Leila Luján-Barroso** ^{1,2,5}, **Jose Ramón Quirós** ⁶, **Pilar Amiano** ^{7,8,9}, **María José Sánchez** ^{10,11,12}, **Miguel Rodríguez-Barranco** ^{10,11}, **Marcela Guevara** ^{12,13,14}, **Conchi Moreno-Iribas** ^{12,13,14}, **Alba Gasque** ¹³, **María-Dolores Chirlaque** ^{7,15,16}, **Sandra M. Colorado-Yohar** ^{7,15,17}, **José María Huerta Castaño** ^{7,15}, **Antonio Agudo** ^{1,2} and **Paula Jakszyn** ^{1,18,*}

¹ Unit of Nutrition and Cancer, Catalan Institute of Oncology—ICO, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; lrizzolo@idibell.cat (L.R.-B.); llujan@iconcologia.net (L.L.-B.); a.agudo@iconcologia.net (A.A.)

² Nutrition and Cancer Group, Epidemiology, Public Health, Cancer Prevention and Palliative Care Program, Bellvitge Biomedical Research Institute—IDIBELL, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

³ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain; afarran@ub.edu

⁴ Food Safety and Functionality Program, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Girona, Spain; ricard.bou@irta.cat

⁵ Department of Public Health, Mental Health and Perinatal Nursing, Public Health, Mental Health and Perinatal Nursing, Universitat de Barcelona, Carrer de la Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁶ Public Health Directorate, 33001 Asturias, Spain; joseramon.quirosgarcia@asturias.org

⁷ CIBER Epidemiology and Public Health CIBERESP ISCIII, 28041 Madrid, Spain; p-amiano@euskadi.eus (P.A.); mdolores.chirlaque@carm.es (M.-D.C.); scyohar@gmail.com (S.M.C.-Y.); jmhuerta.carm@gmail.com (J.M.H.C.)

⁸ Ministry of Health of the Basque Government, Sub Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20013 San Sebastian, Guipúzcoa, Spain

⁹ Biodonostia Health Research Institute, Epidemiology of Chronic and Communicable Diseases Group, 20014 San Sebastian, Guipúzcoa, Spain

¹⁰ Escuela Andaluza de Salud Pública (EASP), 18011 Granada, Granada, Spain; mariajose.sanchez.casp@juntadeandalucia.es (M.J.S.); miguel.rodriguez.barranco.easp@juntadeandalucia.es (M.R.-B.)

¹¹ Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, 18012 Granada, Granada, Spain

¹² Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; mp.guevara.eslava@navarra.es (M.G.); mc.moreno.tribas@navarra.es (C.M.-I.)

¹³ Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, 31003 Pamplona, Navarre, Spain; alba.gasque.satruestegui@navarra.es

¹⁴ Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), 31008 Pamplona, Navarre, Spain

¹⁵ Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council-IMIB, 30008 Murcia, Murcia, Spain

¹⁶ Social-Health Department, Murcia University, 30008 Murcia, Murcia, Spain

¹⁷ Research Group on Demography and Health, National Faculty of Public Health, University of Antioquia, Medellín 050010, Colombia

¹⁸ Blanquerna School of Health Sciences, Ramon Llull University, 08022 Barcelona, Catalonia, Spain

* Correspondence: paujak@iconcologia.net

Supplementary Table S1. All meat derivatives mean intake (g/d) from EPIC-Spain cohort and their levels of nitrosyl-heme and heme iron content measured by HPLC method

Items	Mean intake (g/d)	SD	NOheme* (µg/g)**	Heme iron (µg/g)**
Jamón serrano	5.30	9.8	39	41
Jamón cocido / jamón de York	5.04	9.6	22	27
Albóndigas de carne sin especificar, caseras	2.62	6.8	0	105
Croquetas de carne sin especificar	1.70	4.8	53	53
Chorizo curado	1.67	5.9	1	1
Tocino	1.33	3.2	1	1
Panceta de cerdo	1.11	3.7	6	17
Chorizo fresco oreado	1.01	5.0	31	29
Albóndigas de ternera	0.88	4.1	0	143
Salchichón	0.58	2.8	44	56
Hamburguesa de carne sin especificar, casera	0.58	3.7	0	128
Chistorra	0.46	2.7	30	35
Lacón	0.46	1.6	43	43
Frankfurt	0.41	2.4	80	82
Chorizo de Pamplona	0.34	2.6	38	37
Albóndigas de carne sin especificar	0.33	2.0	0	105
Salchicha fresca del país	0.32	2.0	0	71
Hamburguesa de ternera	0.30	2.7	0	136
Morcilla de cebolla	0.27	2.0	40	669
Morcilla murciana	0.22	1.5	51	281
Mortadela	0.20	2.3	14	19
Paté / Fuagrás / Foie-gras	0.18	1.4	97	97
Morcilla de arroz	0.16	2.4	16	555
Bacon	0.16	1.4	21	30
Albóndigas de cerdo	0.13	1.5	0	87
Longaniza de payés / llonganissa de pagés	0.13	1.1	29	45
Chóped / Chopped	0.12	1.6	21	31
Morcilla asturiana	0.12	0.5	242	440
Salchicha fresca murciana	0.12	1.2	0	65
Hamburguesa de pollo	0.10	1.4	0	82
Hamburguesa de carne sin especificar, bar/restaurante	0.09	0.0	0	128
Lomo embuchado	0.09	1.5	28	31
Fiambre de pavo	0.08	1.2	6	7
Sobrasada / sobrasada	0.07	1.1	28	28
Relleno	0.07	1.3	0	75
Longaniza imperial	0.05	0.9	42	42
Morcón	0.05	0.7	51	51
Salchicha de pollo	0.04	1.0	0	45
Chorizo tipo vela	0.02	0.4	64	69
Morcón blanco	0.02	0.6	26	26
Salami	0.02	0.6	27	28
Cabeza de jabalí	0.01	0.5	42	57
Sangrecilla	0.01	0.5	49	1554
Longaniza murciana / salchicha de pellizco	0.01	0.3	24	41
Longaniza seca	0.01	0.3	40	40
Cecina	0.01	0.4	105	183
Carne en lata	0.01	0.5	46	55
Hamburguesa de carne sin especificar	0.00	0.2	0	103
Bratwurst	0.00	0.0	2	29
Chicharrones	0.00	0.0	0	93

*NOheme; Nitrosyl-heme

**Data expressed as hemin (651.94g/mol)

Supplementary Table S2. Ranking of most consumed meat derivatives items that contribute most to total nitrosyl-heme intake in EPIC-Spain cohort

Food item	Contribution to total NOheme* intake= (µg/d)**
Jamón serrano	206.7
Jamón cocido / jamón de York	110.9
Chorizo curado	88.4
Frankfurt	33.0
Chorizo fresco oreado	31.2
Morcilla asturiana	29.0
Salchichón	25.7
Lacón	19.4
Paté / Fuagrás / Foie-gras	17.6
Chistorra	13.9
Chorizo de Pamplona	12.9
Morcilla murciana	11.9
Morcilla de cebolla	10.6
Panceta de cerdo	6.7
Longaniza de payés / llonganissa de pagés	3.7
Bacon	3.4
Mortadela	2.7
Morcilla de arroz	2.6
Chóped / Chopped	2.6
Lomo embuchado	2.6
Morcón	2.5
Longaniza imperial	2.3
Sobrasada / sobrassada	1.9
Croquetas de carne sin especificar	1.7
Tocino	1.3
Chorizo tipo Vela	1.2
Cecina	0.6
Sangrecilla	0.6
Cabeza de jabalí	0.6
Morcón blanco	0.5
Fiambre de pavo	0.5
Salami	0.5
Longaniza seca	0.4
Longaniza murciana /salchicha de pellizco	0.3
Carne en lata	0.3

*NOheme: nitrosyl-heme

**Data expressed as hemin (651.94g/mol)

Supplementary Table S3. Ranking of most consumed meat derivatives items that contribute most to total heme iron intake

Food item	Contribution to total heme iron intake= (µg/d)*
Albóndigas de carne sin especificar, caseras	275.0
Jamón serrano	217.3
Morcilla de cebolla	177.4
Jamón cocido / Jamón de York	136.1
Albóndigas de ternera	125.6
Morcilla de arroz	91.4
Chorizo curado	88.4
Hamburguesa de carne sin especificar, casera	74.4
Morcilla murciana	65.6
Morcilla asturiana	52.8
Hamburguesa de ternera	40.9
Albóndigas de carne sin especificar	34.1
Frankfurt	33.9
Salchichón	32.7
Chorizo fresco oreado	29.2
Salchicha fresca del país	22.9
Sangrecilla	20.3
Lacón	19.4
Panceta de cerdo	18.9
Paté / Fuagrás / Foie-gras	17.6
Chistorra	14.6
Chorizo de Pamplona	12.6
Hamburguesa de carne sin especificar, bar/restaurante	11.8
Albóndigas de cerdo	11.2
Hamburguesa de pollo	8.4
Salchicha fresca murciana	7.5
Longaniza de payés / llonganissa de pagés	5.2
Relleno	4.9
Bacon	4.8
Chóped / Chopped	3.8
Mortadela	3.7
Salchicha de pollo	3.3
Lomo embuchado	2.9
Morcón	2.5
Longaniza imperial	2.3
Sobrasada / sobrassada	1.9
Croquetas de carne sin especificar	1.7
Tocino	1.3
Chorizo tipo Vela	1.3
Cecina	1.1
Cabeza de jabalí	0.8
Fiambre de pavo	0.5
Salami	0.5
Longaniza murciana /salchicha de pellizco	0.5
Morcón blanco	0.5
Longaniza seca	0.4
Carne en lata	0.3
Hamburguesa de carne sin especificar	0.2
Chicharrones	0.0
Bratwurst	0.0

*Heme iron expressed as hemin (molecular weight = 651.94 g/mol)

4.3 Artículo III: Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort

Se estima que en el año 2022 se diagnosticaron casi 2 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal, convirtiéndolo en el tercer cáncer más diagnosticado alrededor del mundo y la segunda causa más común de muerte por cáncer. Se considera que los aspectos ambientales, especialmente los hábitos alimentarios, desempeñan un papel significativo en su aparición y desarrollo. La ingesta de carne procesada, el consumo de alcohol y la grasa corporal son factores de riesgos para esta enfermedad. Una de las hipótesis en relación a la ingesta de carnes procesadas y el incremento de cáncer colorrectal está relacionada con el nitrosilhemo, compuesto que se forma durante el curado y/o cocción. Además, se ha sugerido que la presencia de nitrosilhemo, combinada con la presencia abundante de precursores de compuestos N-nitrosos naturalmente presentes en la carne procesada, puede resultar en una mayor exposición a compuestos N-nitrosos. Por otro lado, otro de los compuestos que se sugiere como posible implicado en la carcinogénesis del cáncer colorrectal es el hierro hemo. El hierro hemo es una forma de hierro que se encuentra en alimentos de origen animal. Se ha sugerido que el hierro hemo puede producir radicales libres de hidroxilo, los cuales se ha demostrado que causan daño directo al ADN. Asimismo, es también un agente nitrosante que podría contribuir indirectamente al aumento del riesgo de cáncer colorrectal al generar radicales de peróxido lípido y aumentar la producción de nitrosaminas carcinogénicas en el colon.

Si el nitrosilhemo y el hierro hemo juegan un papel en la carcinogénesis, individuos que presentan una ingesta alta de estos compuestos podrían estar en mayor riesgo de desarrollar un cáncer. Si bien el hierro hemo ha sido estudiado en más profundidad en relación al riesgo de cáncer colorrectal, los datos utilizados para estimar la ingesta de hierro hemo generalmente se expresan como un porcentaje del hierro total disponible en las carnes procesadas, o utilizando tablas de composición de alimentos. Solo un número limitado de estudios ha examinado el contenido de hierro hemo en carnes procesadas, aunque se han limitado a algunos tipos específicos y según el método espectrofotométrico de *Hornsey*. Teniendo en cuenta que el tipo de determinación

analítica en derivados cárnicos puede ser un factor crítico para estimar con precisión la ingesta en poblaciones, consideramos fundamental utilizar el método *HPLC* para esta estimación, dado que hemos observado que ofrece resultados más precisos en comparación con otros métodos disponibles.

Respecto al nitrosilhemo, el único estudio prospectivo hasta el momento que ha estudiado la relación entre la ingesta del nitrosilhemo y el riesgo de cáncer colorrectal ha mostrado asociaciones positivas en este tipo de cáncer y con el subtipo proximal. Sin embargo, la metodología utilizada para determinar los niveles de nitrosilhemo de las carnes procesadas estudiadas no se realizó a través de mediciones en el laboratorio.

En contraste, nuestro estudio es el primero en estimar la asociación entre la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal a partir de datos basados en mediciones directas de su contenido en derivados cárnicos, analizando una amplia variedad de ellos y pudiendo proporcionar estimaciones más precisas que las obtenidas en la literatura previa para la población europea.

ARTÍCULO III

Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort.

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Leila Lujan-Barroso, Andreu Farran-Codina, Ricard Bou, Cristina Lasheras, Pilar Amiano, Amaia Aizpurua, Maria-Jose Sánchez, Esther Molina-Montes, Marcela Guevara, Conchi Moreno-Iribas, Alba Gasque, María Dolores Chirlaque-López, Sandra M. Colorado-Yohar, José María Huerta, Raul Zamora-Ros, Antonio Agudo, Paula Jakszyn.

Artículo publicado en: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2024;33(6):

Nitrosyl-heme and Heme Iron Intake from Processed Meats and Risk of Colorectal Cancer in the EPIC-Spain Cohort



Lucía Rizzolo-Brime¹, Leila Lujan-Barroso^{1,2}, Andreu Farran-Codina³, Ricard Bou⁴, Cristina Lasheras⁵, Pilar Amiano^{6,7,8}, Amaia Aizpurua^{7,8}, Maria-Jose Sánchez^{6,9,10}, Esther Molina-Montes^{6,10,11,12}, Marcela Guevara^{6,13,14}, Conchi Moreno-Iribas^{6,13,14}, Alba Gasque¹³, María Dolores Chirlaque-López^{6,15,16}, Sandra M. Colorado-Yohar^{6,15,17}, José María Huerta^{6,15}, Raul Zamora-Ros^{1,18}, Antonio Agudo¹, and Paula Jakszyn^{1,19}

ABSTRACT

Background: The International Agency for Research on Cancer classified processed meats (PM) as “carcinogenic” and red meat as “probably carcinogenic” for humans. The possible relationship between colorectal cancer risk and the mechanisms involved in the carcinogenesis of PMs have not been established yet. Nitrosyl-heme and heme iron have been proposed as potential-related compounds. The aim of this study was to determine the association between nitrosyl-heme and heme iron intake and colorectal cancer risk among participants from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain study.

Methods: This prospective study included 38,262 men and women from the EPIC-Spain study. Food consumption was assessed using diet history and food composition tables. Heme iron and nitrosyl-heme intake were determined by estimating the intake of PM items and conducting laboratory analyses. HR estimates were obtained by proportional hazard models, stratified

by age at recruitment and study center and adjusted for sex, total energy intake, education, smoking, body mass index, waist size, physical activity, lifetime alcohol, fibre, calcium, and familiar colorectal cancer history.

Results: During a mean follow-up of 16.7 years, 577 participants were diagnosed with colorectal cancer. We found no overall association between nitrosyl-heme [HR_{T3vsT1}, 0.98; 95% confidence interval (CI), 0.79–1.21] or heme iron intakes (HR_{T3vsT1}, 0.88; 95% CI, 0.70–1.10) with colorectal cancer risk, nor according to tumor subtypes.

Conclusions: Our study found no evidence supporting a link between nitrosyl-heme or heme iron intake and colorectal cancer risk in Spanish subjects.

Impact: As research on nitrosyl-heme is preliminary, more heterogeneous studies are necessary to provide more convincing evidence on their role in colorectal cancer carcinogenesis.

Introduction

Colorectal cancer is the third most common type of cancer in adults worldwide with a high number of new cases and deaths annually. In 2022, Spain estimated almost 40,000 new colorectal cancer cases, becoming the most frequently diagnosed tumor, ranking as the second most common for both men and women (1). The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified processed meats (PM) as “carcinogenic” and red meat as “probably carcinogenic” for colorectal

cancer (2). Various mechanisms have been suggested to explain the link between red and PM consumption and colorectal cancer risk. Nevertheless, their specific key compounds remain unclear. Nitrosyl-heme has been suggested as a potential related compound (3). The aim of this study was to determine the association between nitrosyl-heme and heme iron intake and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Spain cohort.

¹Unit of Nutrition and Cancer, Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²Department of Public Health, Mental Health and Maternal and Child Health Nursing. Faculty of Nursing. University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ³Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴Food Safety and Functionality Program, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Girona, Spain. ⁵Functional Biology Department, School of Medicine, University of Oviedo, Asturias, Spain. ⁶Spanish Consortium for Research on Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁷Ministry of Health of the Basque Government, Sub Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, San Sebastian, Spain. ⁸BioGipuzkoa (BioDonostia) Health Research Institute, Epidemiology of Chronic and Communicable Diseases Group, San Sebastián, Spain. ⁹Escuela Andaluza de Salud Pública (EASP), Granada, Spain. ¹⁰Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. ¹¹Department of Nutrition and Food Science, Campus of Cartuja, University of Granada, Granada, Spain. ¹²Institute of Nutrition and Food Technology (INYTA) ‘José Mataix’, Biomedical Research Centre,

University of Granada, Granada, Spain. ¹³Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, Pamplona, Spain. ¹⁴Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Pamplona, Spain. ¹⁵Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council-IMIB, Murcia, Spain. ¹⁶Social-Health Department, Murcia University, Murcia, Spain. ¹⁷Research Group on Demography and Health, National Faculty of Public Health, University of Antioquia, Medellín, Colombia. ¹⁸Department of Nutrition, Food Sciences, and Gastronomy, Food Innovation Network (XIA), Institute for Research on Nutrition and Food Safety (INSA), Faculty of Pharmacy and Food Sciences University of Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁹Blanquerna School of Health Sciences, Ramon Llull University, Barcelona, Spain.

Corresponding Author: Paula Jakszyn, Unit of Nutrition and Cancer, Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08908, Spain. E-mail: paujak@iconcologia.net

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2024;33:854–6

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-24-0211

©2024 American Association for Cancer Research

Materials and Methods

Between 1992 and 1996, 41,437 healthy volunteers (ages, 25–70) from five Spanish regions were enrolled in the EPIC-Spain cohort study. Questionnaire information on sociodemographic characteristics, lifestyle factors, and medical history was gathered during personal interviews. Dietary intake was assessed through a validated diet history questionnaire (EPIC-DH; ref. 4).

To estimate the exposure to nitrosyl-heme and heme iron, we used biochemical data from a previous study from our group (5) which included a total of 52 PM items from EPIC-DH questionnaires. Food and nutrient intake, including PMs consumption, were estimated using the EPIC Nutrient Database (6). Finally, nitrosyl-heme and heme iron intake was estimated by multiplying this information by PMs by each subject's daily food intake in the cohort.

We included 38,262 individuals (61.5% females) after excluding prevalent cancer cases ($n = 612$) and incomplete/improbable dietary data ($n = 695$). Among them, 577 incident colorectal cancer cases were identified after a mean follow-up of 16.7 years. Proportional hazards models were used to examine the association between sex-specific tertiles of nitrosyl-heme and heme iron intake and colorectal cancer risk. Age served as the time scale, stratified by age and center with adjustments for sex, energy intake, body mass index (BMI), waist size, education, smoking, physical activity in mets (PA), lifetime alcohol, dietary fibre, calcium, and family colorectal cancer history. Interactions with smoking, BMI, PA, and alcohol were also examined.

Homogeneity of location subtype risk was assessed. Sensitivity analyses were conducted excluding the first three years of follow-up, but the results remained unchanged. R studio (4.1.3) was used for analysis, with significance set at $P < 0.05$.

The study has been performed in accordance to the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments and obtained ethical approval for the EPIC study was obtained from the ethical review board of the International Agency for Research on Cancer (IARC) ethics committee (PR098/21) and the local ethics committees in the participating centers. All participants gave written informed consent.

Data availability

EPIC data and biospecimens are accessible to researchers addressing significant inquiries regarding health and disease within projects aligning with the legal and ethical standard practices of IARC/WHO and the EPIC centers. The primary responsibility for data access rests with IARC and the EPIC centers. Requests should be sent to the corresponding author.

Results

No statistically significant association was observed between nitrosyl-heme and heme iron intake and colorectal cancer risk or subtypes (Table 1). In multivariate models, the HR for highest versus lowest

Table 1. Adjusted HR for full cohort and colorectal cancer risk by sex-specific tertiles of heme iron and nitrosyl-heme intake.

	Cases	Nitrosyl-heme ^{a,b}		Cases	Heme iron ^{c,d}	
		HR (95% CI)	HR (95% CI)		HR (95% CI)	HR (95% CI)
Colorectal cancer risk ^e		Basic model ^f	Multivariate model ^g		Basic model ^f	Multivariate model ^g
Full cohort = 38,262 ^h	577			577		
T1	214	Reference	Reference	204	Reference	Reference
T2	169	0.84 (0.68–1.03)	0.82 (0.67–1.01)	197	1.01 (0.82–1.23)	0.98 (0.81–1.20)
T3	194	1.04 (0.84–1.28)	0.98 (0.79–1.21)	176	0.93 (0.75–1.16)	0.88 (0.70–1.10)
Proximal colon cancer risk ⁱ						
T1	49	Reference	Reference	50	Reference	Reference
T2	38	0.85 (0.55–1.31)	0.83 (0.54–1.28)	42	0.89 (0.58–1.34)	0.86 (0.57–1.31)
T3	44	1.11 (0.71–1.73)	1.03 (0.65–1.61)	39	0.87 (0.55–1.38)	0.80 (0.51–1.29)
Distal colon cancer risk ^j						
T1	72	Reference	Reference	65	Reference	Reference
T2	53	0.78 (0.54–1.12)	0.77 (0.53–1.10)	65	1.07 (0.75–1.52)	1.04 (0.73–1.48)
T3	64	1.05 (0.73–1.52)	0.98 (0.67–1.42)	59	1.02 (0.70–1.50)	0.95 (0.65–1.41)
Rectum cancer risk ^e						
T1	59	Reference	Reference	59	Reference	Reference
T2	61	1.14 (0.79–1.64)	1.10 (0.76–1.58)	66	1.18 (0.83–1.69)	1.16 (0.81–1.66)
T3	55	1.12 (0.75–1.66)	1.04 (0.70–1.56)	50	0.90 (0.60–1.35)	0.84 (0.55–1.26)

^aNitrosyl-heme (μg/day) for women: T1, 0–≤321.21; T2, >321.21–≤739.91; T3, >739.91; Nitrosyl-heme (μg/day) for men: T1, 0–≤579.72; T2, >579.72–≤1370.54; T3, >1,370.54.

^bPerson-years by nitrosyl-heme tertiles: T1, 204,237.4 person-years; T2, 203,347.7 person-years and T3, 203,068.9 person-years.

^cHeme iron (μg/day) for women: T1, 0–≤882.0; T2, >882.0–≤2,341.41; T3, >2,341.41; Heme iron (μg/day) for men: T1, 0–≤1,652.30; T2, >1,652.30–≤2,341.41; T3, >2,341.41.

^dPerson-years by heme iron tertiles: T1, 202,420.2 person-years; T2, 203,479.1 person-years and T3, 204,754.8 person-years.

^e $P_{\text{homogeneity}}$ colon versus rectum = 0.12 and 0.51 for nitrosyl-heme and heme iron intake, respectively.

^fBasic model: stratified by age and center, and adjusted for sex and energy intake.

^gMultivariate model: basic model and further adjusted by: BMI (≤25, 25–30, ≥30 kg/m²), waist size (low:<88 cm for women and <102 cm for men; high: ≥88 cm for women and ≥102 cm for men), educational level (none, primary school, technical/professional school, secondary school, longer education, and unknown), smoking status (never, former, and current), physical activity in mets (as continuous variable), lifetime alcohol consumption (as continuous variable), fiber (as continuous variable), calcium (very low: <650.3 mg/day; low: >650.3 mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day) and family history (mother/father/siblings; no; no response).

^hEach tertile is divided by the same number of participants ($n = 12,754$), varying in the number of cases per tumor location.

ⁱ $P_{\text{homogeneity}}$ proximal versus distal = 0.77 and 0.37 for nitrosyl-heme and heme iron intake, respectively.

tertile of intake was 0.98 (95% CI, 0.79–1.21) for nitrosyl-heme and 0.88 (95% CI, 0.70–1.10) for heme iron intake, respectively.

We found a nonlinear relationship between nitrosyl-heme intake and colorectal cancer risk, with weaker associations at higher intakes. Despite no heterogeneity was observed in the associations between nitrosyl-heme and heme iron intake and the risk of colorectal cancer by tumor subtype, a nonstatistically significant positive association between nitrosyl-heme intake and proximal colon and rectum cancer was observed (for proximal colon cancer, HR = 1.03; 95% CI, 0.65–1.61; and for rectum cancer, HR = 1.04; 95% CI, 0.70–1.56). There were no relevant interactions between nitrosyl-heme and heme iron and smoking status, BMI, PA, nor lifetime alcohol consumption on colorectal cancer risk.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first prospective study that analyzed the exposure of nitrosyl-heme in relation to the risk of CRC using analytical data on their content for the most consumed PMs.

We observed no overall association between nitrosyl-heme and colorectal cancer risk, neither by subtypes. Only one prospective study has studied the relationship between nitrosyl-heme intake and colorectal cancer risk, whose results showed a positive association with proximal colon cancer (7). However, the study assigned a constant coefficient for the nitrosyl-heme content for all PMs (0.67). In contrast, our study is the first to present nitrosyl-heme data based on direct content measurements in PMs, analyzing a wide variety of them.

Regarding heme iron, a greater number of studies investigated its associations to colorectal cancer risk. Prior analysis in EPIC-Europe (8) revealed a positive association limited to the proximal colon for heme iron intake. However, our study, possibly due to different methodology, did not find a significant link between these subtypes and heme iron intake.

Concerning limitations, diet and lifestyle variables were measured only at the beginning; changes over the nearly 17-year follow-up cannot be assessed. Regarding the strengths, it includes data on nitrosyl-heme and heme iron derived from direct laboratory measurements in PMs, its prospective design and the inclusion of potential confounders.

In summary, our findings do not support the hypothesis that nitrosyl-heme is associated with the risk of developing colorectal cancer. Given the plausibility of the biological mechanism between nitrosyl-heme, heme iron intake, and the risk of colorectal cancer, additional research with heterogeneous cohorts is warranted, especially considering the currently scarce evidence on this topic.

Authors' Disclosures

No disclosures were reported.

Authors' Contributions

L. Rizzolo-Brime: Conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **A. Farran-Codina:** Formal analysis, methodology, writing—review and editing. **R. Bou:** Writing—review and editing. **C. Lasheras:** Writing—review and editing. **P. Amiano:** Writing—review and editing. **A. Aizpurua:** Writing—review and editing. **M. Sánchez:** Writing—review and editing. **E. Molina-Montes:** Writing—review and editing. **M. Guevara:** Writing—review and editing. **C. Moreno-Iribas:** Writing—review and editing. **A. Gasque:** Writing—review and editing. **M.D. Chirlaque-López:** Writing—review and editing. **S. Colorado-Yohar:** Writing—review and editing. **J. Huerta:** Writing—review and editing. **R. Zamora-Ros:** Writing—review and editing. **A. Agudo:** Writing—review and editing. **P. Jakszyn:** Conceptualization, supervision, funding acquisition, methodology, writing—review and editing.

Acknowledgments

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III through the PI19/00817 project [to P. Jakszyn; cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe] and through the PFIS FI20/00006 predoctoral funding, won by L. Rizzolo-Brime [cofunded by the European Social Fund (ESF), investing in your future]. The coordination of EPIC is financially supported by the European Commission (DG-SANCO) and the International Agency for Research on Cancer. This study is part of the EPIC-Spain Study. The EPIC-Spain cohort was supported by the Health Research Fund (FIS) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), the Regional Governments of Andalucía, Asturias, Gipuzkoa, Murcia, and Navarra, and the Catalan Institute of Oncology (ICO). We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Received February 5, 2024; revised March 14, 2024; accepted March 26, 2024; published first March 28, 2024.

References

1. GLOBOCAN 2022, International Agency for Research on Cancer 2023 (IARC). Global Cancer Observatory. Available online: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group=5B%5D=0&ages_group=5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0 (accessed on 03 April 2023).
2. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol* 2015; 114:1599–600.
3. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008;60: 131–44.
4. Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002;5: 1113–24.
5. Bou R, Farran-Codina A, Rizzolo-Brime L, Arnau J, Sabeña G, Jakszyn P. Iron, heme, and nitrosyl-heme content in Spanish meat derivatives. *J Food Compos Anal* 2023;125:105832.
6. Slimani N, Deharveng G, Unwin I, Southgate DA, Vignat J, Skeie G, et al. The EPIC nutrient database project (ENDB): a first attempt to standardize nutrient databases across the 10 European countries participating in the EPIC study. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1037–56.
7. Bastide N, Morois S, Cadeau C, Kangas S, Serafini M, Gusto G, et al. Heme iron intake, dietary antioxidant capacity, and risk of colorectal adenomas in a large cohort study of french women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25: 640–7.
8. Aglago EK, Cross AJ, Riboli E, Fedirko V, Hughes DJ, Fournier A, et al. Dietary intake of total, heme and non-heme iron and the risk of colorectal cancer in a European prospective cohort study. *Br J Cancer* 2023;128:1529–40.

4.4 Artículo IV: Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study

En la Unión Europea, se calculó que el cáncer colorrectal causaba aproximadamente el 12,1% de todas las muertes por cáncer, colocándolo como la tercera causa más frecuente después del cáncer de pulmón y de mama, y la segunda causa de muerte por cáncer después del cáncer de pulmón. Dado que se ha sugerido que el nitrosilhemo puede estar implicado en la asociación entre su ingesta y el aumento del riesgo de este tipo de cáncer, y considerando que la información disponible hasta el momento en estudios prospectivos es limitada, creemos que es importante investigar esta asociación en una muestra más diversa y heterogénea de participantes. Para ello, utilizamos los datos analíticos obtenidos del método *HPLC* de las carnes procesadas españolas y extrapolamos los datos de nitrosilhemo a carnes procesadas europeas. Durante este proceso de extrapolación, se tuvo en cuenta la formulación, ingredientes y cocción de los derivados cárnicos europeos para poder garantizar una buena aproximación con sus respectivos derivados cárnicos españoles.

En este estudio se realizó un análisis descriptivo de la ingesta de nitrosilhemo en cada uno de los países europeos incluidos (Francia, Italia, España, Reino Unido, Alemania, Países Bajos y Dinamarca). Alemania fue el país con más ingesta de nitrosilhemo, seguido de Dinamarca, y Francia. Por el contrario, Reino Unido fue el país con menos consumo, seguido de Italia, España y Países Bajos. De los derivados cárnicos españoles con el que se hizo el *“matching alimentario”*, el *jamón cocido/jamón de york* fue el ítem que se situó entre los más consumidos por todos los países, mientras que en Alemania y Dinamarca destacaron, además, el *frankfurt* y la *salchicha fresca del país*.

Se incluyeron un total de 5.115 casos de cáncer colorrectal ocurridos en una mediana de casi 15 años de seguimiento. Se estimaron los HR y los intervalos de confianza al 95% para calcular el riesgo de cáncer colorrectal a partir de las extrapolaciones de nitrosilhemo.

Tras ajustar por factores de confusión (altura, peso, circunferencia de cintura, hábito de fumar, nivel de actividad física, nivel educativo, consumo de fibra, calcio e ingesta de alcohol a lo largo de la vida), no encontramos ninguna asociación significativa entre

la ingesta de nitrosilhemio específica por sexo y el riesgo de cáncer colorrectal (HR T_3 vs. T_1 : 1.01; 95% IC= 0.93-1.09), ni por los subtipos tumorales. Separando los análisis por sexo, se observó una asociación positiva no estadísticamente significativa entre la ingesta de nitrosilhemio y riesgo de cáncer colorrectal, colon distal y cáncer de colon en mujeres (HR T_3 vs. T_1 : 1.06, 95% IC= 0.94-1.18; HR T_3 vs. T_1 : 1.13, 95% IC= 0.91-1.40; HR T_3 vs. T_1 : 1.08, 95% IC= 0.94-1.24, respectivamente). En hombres, se encontró una asociación positiva no estadísticamente significativa entre la ingesta de nitrosilhemio y el riesgo de cáncer rectal, con asociaciones más fuertes a menores ingestas (HR T_2 vs. T_1 : 1.17, 95% IC= 0.97-1.41). Además, se realizaron pruebas de Wald para evaluar la posible homogeneidad de la asociación entre los subtipos de localización y no se observaron diferencias significativas en las asociaciones entre la ingesta diaria de nitrosilhemio específica para sexo y el riesgo de cáncer de colon en comparación con el cáncer rectal, ni entre el cáncer de colon distal y proximal.

Tras realizar análisis de sensibilidad excluyendo los cinco primeros años de seguimiento, así como a los participantes de Reino Unido (mayormente vegetarianos), nuestros resultados se mantuvieron sin cambios.

En conclusión, no encontramos evidencia para confirmar una asociación significativa entre la ingesta de nitrosilhemio y el riesgo de cáncer colorrectal.

ARTÍCULO IV

Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study.

Autores: **Lucía Rizzolo-Brime**, Leila Lujan-Barroso, Andreu Farran-Codina, Ricard Bou, Genevieve Nicolas, Inge Huybrechts, Cristina Lasheras, Esther Molina Montes, Sandra Colorado-Yohar, Alba Gasque, Christina C. Dahm, Niels Bock, Anja Olsen, Anne Tjønneland, Verena Katzke, Charlotte le Cornet, Matthias B. Schulze, Calogero Saieva, Sabina Sieri, Maria Santucci De Magistris, Rosario Tumino, Alessandra Macciotta, Elisabete Weiderpass, Chrysovalantou Chatzioannou, Paolo Vineis, Paula Jakszyn.

Artículo no publicado, manuscrito en preparación.

Dietary nitrosyl-heme from processed meats and its association with colorectal cancer risk: Findings from the EPIC cohort study.

Authors: Lucía Rizzolo-Brime^{1,2}, Leila Lujan-Barroso^{1,2,3}, Andreu Farran-Codina⁴, Ricard Bou⁵, Genevieve Nicolas⁶, Inge Huybrechts⁶, Cristina Lasheras⁷, Esther Molina Montes^{8,9,10,11}, Sandra Colorado-Yohar^{11,12,13}, Alba Gasque¹⁴, Christina C. Dahm¹⁵, Niels Bock¹⁵, Anja Olsen^{15,16}, Anne Tjønneland^{16,17}, Verena Katzke¹⁸, Charlotte le Cornet¹⁸, Matthias B. Schulze^{19,20}, Calogero Saieva²¹, Sabina Sieri²², Maria Santucci De Magistris²³, Rosario Tumino²⁴, Alessandra Macciotta^{25,26}, Elisabete Weiderpass⁶, Chrysovalantou Chatziioannou⁶, Paolo Vineis²⁷, Paula Jakszyn^{1,28}

Affiliations:

¹ Unit of Nutrition and Cancer, Catalan Institute of Oncology - ICO, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

² Nutrition and Cancer Group; Epidemiology, Public Health, Cancer Prevention and Palliative Care Program; Bellvitge Biomedical Research Institute - IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

³ Department of Nursing of Public Health, Mental Health and Maternity and Child Health Faculty of Nursing. University of Barcelona, Carrer de la Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, Santa Coloma de Gramenet, E-08921 Barcelona, Spain.

⁵ Food Safety and Functionality Program, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121- Monells, Girona, Spain.

⁶ Nutrition and Metabolism Branch, International Agency for Research on Cancer (IARC-WHO), 69008 Lyon, France.

⁷ Department of Functional Biology, Oviedo University, 330066, Asturias, Spain

⁸ Department of Nutrition and Food Science, University of Granada, 18071, Granada, Spain.

⁹ Institute of Nutrition and Food Technology (INYTA) 'Jose Mataix', Biomedical Research Centre, University of Granada, 18071, Granada, Spain.

¹⁰ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, 18012, Granada, Spain.

¹¹ CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029, Madrid, Spain.

¹² Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, 30120, Murcia, Spain.

¹³ Research Group on Demography and Health, National Faculty of Public Health, University of Antioquia, 050010, Medellín, Colombia.

¹⁴ Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, 31003 Pamplona, Spain.

¹⁵ Department of Public Health, Aarhus University, DK-8000, Aarhus, Denmark.

¹⁶ Danish Cancer Society Research Center, DK-2100, Copenhagen, Denmark (C.K., A.T.).

¹⁷ Department of Public Health, University of Copenhagen, DK-1165, Copenhagen, Denmark.

¹⁸ Division of Cancer Epidemiology, Germany Cancer Research Center (DKFZ), 69120, Heidelberg, Germany.

¹⁹ Department of Molecular Epidemiology, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, 14558, Nuthetal, Germany.

²⁰ Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, 14467, Potsdam, Germany.

²¹ Istituto per lo Studio la Prevenzione e la Rete Oncologica (ISPRO), 5013, Florence, Italy.

²² Epidemiology and Prevention Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, 20133, Milan, Italy.

²³ A.O.U. Federico II, 80131, Naples, Italy.

²⁴ Hyblean Association for Epidemiological Research, AIRE ONLUS, 97100, Ragusa, Italy.

²⁵ Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, 10124, Orbassano (TO), Italy.

²⁶ Department of Translational Medicine, University of Piemonte Orientale, 28100, Novara, Italy.

²⁷ Department of Epidemiology and Biostatistics, Imperial College, SW7 2AZ, London, United Kingdom.

²⁸ Blanquerna School of Health Sciences, Ramon Llull University, 08022 - Barcelona, Spain.

Not published

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer globally, with over 1.93 million cases and 935,000 deaths each year. It is also the second leading cause of cancer-related deaths worldwide for both men and women (1). Its incidence is expected to increase, mainly in people under 50 years of age, in the coming years, particularly in high-income countries (2). In 2015, the International Agency for Research on Cancer classified processed meat (PM) as a carcinogen for humans and concluded that each 50-gram serving of PM consumed daily increases the risk of CRC by 18% (3).

Most epidemiological and experimental evidence on the potential compounds from PMs supports a significant role of heme iron in promoting CRC associated with both red and PM (4-6). However, in PM, by adding nitrite and/or nitrate salts, the heme molecule is nitrosylated, promoting the formation of nitrosyl-heme, which is released from myoglobin during cooking and/or curing (7). The nitrosylation of heme iron could possibly explain the greater carcinogenic effects found compared to red meat (7, 8).

One of the leading hypothesis for explaining how nitrosyl-heme contributes to the promotion of CRC carcinogenesis is that this compound, combined with the high levels of N-nitroso compound precursors in PM, increases exposure to N-nitroso compounds, which are formed both externally and within the body (8). This combination could be the cause behind the more pronounced carcinogenic effects in PM compared to red meat.

Despite heme iron and the risk of CRC research has been extensively studied, research on nitrosyl-heme remains scarce, especially concerning evidence from cohort studies. Only two prospective studies have attempted to examine the relationship between nitrosyl-heme intake and CRC risk. One such study, conducted in a French cohort, found positive associations with the proximal colon cancer subtype. However, this study used a fixed coefficient (0.67) to estimate nitrosyl-heme content across all PM products (9). In contrast, the second study (10), conducted by our group within the EPIC-Spain cohort, used direct laboratory measurements of nitrosyl-heme in PM products to extrapolate its intake in the cohort. This study found no overall association between nitrosyl-heme and 577 CRC cases in Spanish subjects, nor when analysed by cancer subtypes.

Given the biological plausibility of a link between nitrosyl-heme intake and CRC risk observed in vivo (11), in animal studies (12), and in human research (13), we found it important to investigate further in a larger and heterogeneous population. So, the aim of this study was to investigate the relationship between nitrosyl-heme intake and the risk of CRC in men and women from the EPIC Europe cohort.

Materials and Methods

Study population

The EPIC cohort is a multicentre prospective study designed to examine the relationship between lifestyle factors and cancer in Europe, including diet. The study involved over 500,000 million volunteers (mostly aged 35-70 years and approximately two-thirds were women) who were recruited between 1992 and 1999 from 23 centres in 10 European countries (Spain, France, Italy, Denmark, Germany, Norway, Sweden, the Netherlands, Greece and UK) (12-13). The rationale, data collection and study population were described by Riboli et al. 1997 (12).

The following exclusions were made: 1) Participants who had cancer other than non-melanoma skin cancer when the study began, or those whose diagnosis date is unknown or who have incomplete follow-up data (n=29,331). 2) Subjects with no dietary information (i.e. did not complete the questionnaire) or extreme ranking on the ratio energy intake/energy requirement (top and bottom 1%) (n=13,281). 3) Participants from Greece, Sweden and Norway due to data restriction issues (n=111,248). In total,

153,860 participants were excluded. The final number of EPIC cohort participants available for this analysis was 367,463 (109,120 men and 258,343 women).

Ethical approval was secured from both the IARC Ethical Committee and the local ethics committees associated with each EPIC centre (reference number 20-02). Every participant in the cohort provided written informed consent before enrolment.

Dietary and lifestyle factors assessment

Questionnaire information on sociodemographic characteristics, lifestyle factors, and medical history was gathered during personal interviews through the use of a lifestyle questionnaire. In Oxford and France, participants provided self-reported values for baseline weight and standing height. For participants from other locations, these measurements were measured directly. Regular physical activity (PA) was assessed using the validated EPIC-PAQ questionnaire (16). Dietary intake was assessed through country-specific validated questionnaires, with most countries employing extensive quantitative or semiquantitative food-frequency questionnaires (FFQs) (15). Additionally, all participants completed questionnaires on education, alcohol intake, smoking status, reproductive health, and previous disease history.

Nitrosyl-heme was expressed as hemin form (651.94 g/mol molecular weight). To assess its exposure, we employed food composition data obtained in our prior study (17) concerning nitrosyl-heme levels. Our study included a total of 52 food items derived from the EPIC-DH questionnaires. We estimated food and nutrient intake, including consumption of PMs using the EPIC Nutrient Database (ENDB), and we calculated the daily intake of nitrosyl-heme by multiplying the intake of each PM item (in grams/day) by its assigned content in nitrosyl-heme and then adding up the estimated intakes from all PM items together. Finally, we extrapolated data on nitrosyl-heme, obtained from the 52 Spanish PMs, to PMs obtained in each country from the EPIC questionnaires. In order to carry out this extrapolation more rigorously, the ingredients of each PM were taken into account according to the country, as well as the addition of nitrate salts in the items or lack thereof. We used a direct approach for items that showed similarity in ingredients, recipes, and available literature, while an indirect approach was utilised in cases where a direct approximation was not feasible. This indirect approach was based on: 1. Averages of two or more items with similar ingredients or recipes; 2. The median of all Spanish items in cases where the generic item lacked specific information; and 3.

The most consumed item by the country when estimating a generic item was challenging. Ultimately, extrapolation was conducted for a total of 157 European PMs, with 138 items being extrapolated using a direct approach (87.90%).

PMs information regarding nitrosyl-heme was added into the EPIC food composition database (16).

Follow-up for cancer incidence

The identification of new cancer cases was done by linking records with cancer registries or using a mix of health data sources such as health insurance records, pathology registries, or actively following up with participants and their relatives. We defined CRC based on the definitions by the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O; codes: C18 (for colon cancer) and C19-C20 (for rectal cancer)). Proximal colon cancer included those tumours of the area of the splenic flexure (cecum, transverse colon and ascending colon) and were coded as C18.0-C18.5. Distal colon cancers were classified when tumours originated in the descending (C18.6) or sigmoid colon (C18.7). For overlapping tumours were categorised as C18.8 and for those with unspecified location as C18.9. For colon cancer the latter three were included in its definition (proximal, distal and overlapping). Rectal cancer comprised new tumours occurring from the rectosigmoid junction to the rectum (C19: rectosigmoid junction, C20: rectum).

Statistical analyses

For descriptive analyses, frequencies for categorical variables of baseline characteristics were calculated. Because nitrosyl-heme content was right-skewed, median and its respective range interquartile was reported.

We used restricted cubic splines (RCS) to evaluate linearity in the trend in the CRC with dietary nitrosyl-heme intake by sex. Despite testing various transformations (logarithm, square root), the relationship remained nonlinear. Finally, we used the Akaike Information Criterion to select the best representation of the relationship between dietary nitrosyl-heme intake and CRC risk, favouring the three knots. Analyses were conducted using Cox regression to estimate Hazard ratios(HRs) and 95% confidence intervals(CIs) separately for the associations between sex-specific tertiles of nitrosyl-heme and CRC risk. Additional analyses separating men and women were also

conducted. HRs were determined by comparison with the lowest tertile of intake. Age served as the time scale, and different models were run: Model 1: stratified by age at recruitment in 10-year categories and centre with adjustments for sex and energy intake; Model 2: was model 1 additionally adjusted by height, weight, waist circumference, education, smoking status, PA, lifetime alcohol consumption, dietary fibre and calcium. Family CRC history was not included in the model because it was not available in all centres.

For Model 2, a sensitivity analysis was conducted excluding the first five years of follow-up in order to assess the potential influence of reverse causality, which describes how the outcome can influence the proposed exposure variables, thus altering the direction of their relationship.

We also performed an additional sensitivity analysis by removing participants from the UK (mostly vegetarians in the EPIC-Oxford centre). We assessed interactions with smoking, BMI, PA, fibre and calcium intake, energy and alcohol consumption. Finally, we ran homogeneity of location subtype risk using Wald tests.

Rstudio (4.1.3) was used for analyses, with significance set at $p < 0.05$.

Results

Among the 367,463 participants included in this analysis (258,343 women), 5,115 subjects were diagnosed with incident CRC (2,887 women) after a median of follow-up of almost 15 years. **Table 1** summarises the baseline characteristics of both men and women. In both sexes, higher BMI and waist circumference showed, on average, higher intakes of nitrosyl-heme., as well as in current smokers and in German subjects.

Table 1. Population characteristics according nitrosyl-heme intake in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study

		Nitrosyl-heme intake (µg/d)			
		N (%)	p25	Median	p75
Total		367,463	239.20	659.26	1,445.11
Sex					
	Men	109,120 (29.7)	379.73	1,006.80	2,047.18
	Women	258,343 (70.3)	208.56	559.25	1,205.15
Age (y)					
	<33	17,227 (4.7)	2.996	58.20	497.53
	≥33-<44	59,890 (16.3)	173.00	610.98	1,466.00
	≥44 - <54	139,629 (38.0)	305.73	746.0	1,554.68
	≥54- <64	121,426 (33.0)	300.00	729.27	1,518.21
	≥64	29,291 (8.0)	181.86	458.49	974.99
BMI (kg/m2)					
	<25	191,966 (52.2)	187.71	571.82	1,297.76
	≥25-30	127,652 (34.7)	301.60	742.35	1,568.57
	≥30	47,845 (13.0)	328.57	800.18	1,726.04
Country					
	France	67,403 (18.3)	406.71	883.86	1,689.43
	Italy	44,545 (12.1)	196.99	412.48	766.32
	Spain	39,989 (10.9)	242.00	603.77	1,218.80
	UK	75,416 (20.5)	21.40	181.86	431.69
	The Netherlands	36,539 (9.9)	348.74	797.21	1,519.65
	Germany	48,557 (13.2)	1,002.37	1,888.89	3,030.28
	Denmark	55,014 (15.0)	494.03	1,018.92	1,783.28
Waist circumference (cm)^a					
	Normal	249,985 (68.0)	197.05	575.23	1,320.12
	High	69,886 (19.0)	341.49	803.62	1,672.99
	Missing/Unknown	47,592 (13.0)	409.89	896.97	1,716.81
Cambridge Physical Activity Index (Met-h/week)					
	Inactive	76,536 (20.8)	201.03	532.98	1,208.60
	Moderately Inactive	125,365 (34.1)	239.71	654.83	1,419.98
	Moderately Active	88,121 (24.0)	261.95	715.68	1,531.78
	Active	70,697 (19.2)	263.37	745.71	1,603.73
	Missing/Unknown	6,744 (1.8)	307.80	780.75	1,559.92
Educational level					
	None	14,874 (4.0)	205.09	549.65	1,157.88
	Primary School	86,998 (23.7)	325.53	746.76	1,561.17
	Technical, professional	80,035 (21.8)	286.08	753.23	1,617.91
	Secondary School	75,015 (20.4)	254.19	656.43	1,364.08
	Longer Education	93,882 (25.5)	165.00	603.65	1,464.21
	Not specified	16,659 (4.5)	61.19	309.78	707.92

Smoking status					
	Never	183,880 (50.0)	205.82	583.17	1,303.24
	Former	99,571 (27.1)	245.71	678.08	1,496.41
	Current	77,838 (21.2)	343.07	834.39	1,727.81
	Missing/Unknown	6,174 (1.7)	279.52	678.35	1,380.55
Alcohol lifetime (g/day)^b					
	Non alcohol	24,396 (6.6)	171.43	442.83	942.86
	Never heavy	32,945 (89.7)	245.79	674.85	1,465.78
	Heavy	13,610 (3.7)	300.35	879.82	1,953.99
Family history of colorectal cancer					
	Yes	12,120 (30.5)	281.57	655.24	1,316.68
	No	9,300 (2.5)	286.14	664.64	1,319.19
	Not specified	246,043 (67.0)	220.79	662.18	1,521.6
Calcium (mg/day)^c					
	Very Low	91,863 (25.0)	227.08	642.33	1,454.05
	Low	106,118 (28.9)	248.95	654.90	1,422.57
	Normal	169,482 (46.1)	240.00	673.44	1,454.52
Fibre (g/day)					
	<30	301,493 (82.0)	257.14	662.75	1,417.94
	≥30	65,970 (18.0)	141.91	642.01	1,583.51

^aWaist circumference (cm) (normal: <88 cm in women & <102 in men; high ≥88cm in women & ≥102 in men; missing/unknown).

^bAlcohol lifetime (g/day) (0=no alcohol in the past, i.e. at all ages in the past the alcohol use is 0; 1=never heavy (all past points in time g/d alcohol <60 (men) or <30 (women)) as the reference; 2=heavy alcohol use in the past (≥60 (men) or ≥30 (women) at least at one age in the past).

^cCategorization of calcium intake was performed based on the population distribution in the calcium variable (continuous) and according to the daily intake recommendations found in the following document: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-DatosEnEspanol/>: (very low: ≤743.68 mg/day; low: >743.68mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

BMI body mass index

In men, nitrosyl-heme daily intake consumption seemed to be higher with elevated levels of PA and in heavy alcohol intake (Supplementary Table 1). Among women, the group classified as moderately active in PA exhibited the highest nitrosyl-heme intake, as well as those who reported never consuming large amounts of alcohol (Supplementary Table 2).

Table 2. Multivariable HR (95% CI) of colorectal adenomas by site according to sex-specific tertile of nitrosyl-heme intake

Tertiles of nitrosyl-heme intake ^{a,b}						
	HR (95% CI) T1	HR (95% CI) T2	HR (95% CI) T3	p- trend	Continuous (per 400 µg increment) ^c	AIC ^f
Colorectal Cancer						
N Cases	1,630	1,894	1,591		5,115	
Model1	Referent	1.01 (0.94-1.08)	1.03 (0.95-1.11)	0.52	1.01 (1.00-1.02)	63,976.9
Model2	Referent	0.99 (0.93-1.06)	1.01 (0.93-1.09)	0.87	1.00 (0.99-1.01)	63,806.8
Distal colon Cancer^d						
N Cases	455	514	427		1,396	
Model1	Referent	1.02 (0.89-1.16)	1.02 (0.87-1.20)	0.77	1.00 (0.98-1.02)	17,405.9
Model2	Referent	1.01 (0.88-1.15)	1.02 (0.87-1.20)	0.83	0.99 (0.97-1.01)	17,339.0
Proximal colon Cancer^d						
N Cases	487	531	410		1,428	
Model1	Referent	1.04 (0.91-1.19)	1.00 (0.85-1.17)	0.98	0.99 (0.97-1.01)	17,713.9
Model2	Referent	1.03 (0.90-1.17)	0.97 (0.83-1.14)	0.74	0.98 (0.96-1.01)	17,651.4
Colon Cancer^e						
N Cases	1,018	1,131	908		3,057	
Model1	Referent	1.04 (0.95-1.14)	1.03 (0.93-1.15)	0.55	1.00 (0.99-1.02)	38,042.1
Model2	Referent	1.02 (0.93-1.12)	1.01 (0.90-1.13)	0.86	0.99 (0.98-1.01)	37,901.8
Rectal Cancer^e						
N Cases	489	610	531		1,630	
Model1	Referent	1.06 (0.93-1.20)	0.97 (0.84-1.12)	0.64	1.01 (1.00-1.03)	20,665.2
Model2	Referent	1.04 (0.91-1.18)	0.95 (0.82-1.10)	0.48	1.01 (0.99-1.02)	20,639.3

^aThe analyses were run using sex-specific tertiles. Nitrosyl-heme (µg/day) for women: T1, 0–≤307.49; T2, >307.49–≤927.92; T3: >927.92; Nitrosyl-heme (µg/day) for men: T1, 0–≤560.80; T2, >560.80–≤1,620.57; T3:>1,620.57.

^bPerson-years by nitrosyl-heme tertiles: T1, 1,784881.17 person-years; T2, 1,725064.45 person-years and T3, 1,595336.01 person-years.

Model 1 stratified by age and centre, and adjusted for sex and energy intake.

Model 2: Model 1 and further adjusted by: height (in cm), weight (in kg), education level (none, primary school, technical/professional school, secondary school, longer education, and unknown), smoking status (never, former, and current), waist circumference (low: <88 cm in women & <102 cm in men; high: ≥88cm in women & ≥102cm in men), physical activity (inactive, moderately inactive, moderately active, active, unknown/missing), lifetime alcohol consumption (as continuous variable), fibre (as continuous variable), calcium (very low: ≤743.68 mg/day; low: >743.68mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

^cContinuous variables: the HR (95% CI) corresponds to an increase of: 400 µg/day for nitrosyl-heme

^dP homogeneity proximal vs. distal colon cancer = 0.16 for nitrosyl-heme iron intake.

^eP homogeneity colon vs. rectum cancer = 0.32 for nitrosyl-heme iron intake.

There were 233 and 184 overlapping /non-specified colon or in situ cancer cases in men and women, respectively.

^fAIC Akaike information criterion

Associations between nitrosyl-heme intake and CRC risk by site are reported in **Table 2**. There was no statistically significant association between nitrosyl-heme and CRC risk (Model2:, HRT3vsT1 1.01, 95% CI = 0.93-1.09). Additionally, no evidence of an association was found when analysing distal and proximal colon adenomas and (HRT3vsT1= 1.02, 95CI%: 0.87-1.20); P-trend = 0.83, and (HRT3vsT1 = 0.97, 95CI%: 0.83-1.14); P-trend = 0.74, respectively. Regarding colon and rectal cancer, no association was found either (HRT3vsT1 = 1.01, 95CI%: 0.90-1.13); P-trend= 0.86 and (HRT3vsT1 = 0.95, 95CI%: 0.82-1.10); P-trend= 0.48, respectively.

For Model2, Wald tests showed no significant differences in the association between daily sex-specific nitrosyl-heme intake and the risk of colon versus rectal cancer, or between distal versus proximal colon cancer (**Table 2**). In women, there were significant differences between distal and proximal colon cancer but not between colon and rectal cancer (Supplementary Table 3). In men, no significant differences were found for any tumour subtypes (Supplementary Table 4).

We tested for potential interactions between sex-specific tertiles of nitrosyl-heme intake and CRC risk; however, the tests for interactions were not statistically significant (**Table 3**). Analyses excluding participants with <5 years of follow-up did not materially change the associations. In addition, excluding participants from the UK (health-conscious) from the regression models also did not materially change the findings (Supplementary Table 5).

Table 3. Interactions between sex-specific tertiles of nitrosyl-heme intake and confounders in relation to colorectal cancer risk

Colorectal Cancer	Cases (%)	Sex-specific tertiles of nitrosyl-heme intake ^{a,b}			p-interaction
		HR (95% CI) T1	HR (95% CI) T2	HR (95% CI) T3	
N Cases	5,115	1,630	1,894	1,591	
BMI (kg/m²)^c					
Model2	5,115 (100.0)	Referent	1.43 (0.93-2.19)	1.00 (0.65-1.54)	0.1457
Fibre (g/day)^c					
Model2	5,115 (100.0)	Referent	1.18 (0.96-1.45)	1.12 (0.89-1.40)	0.3452
Calcium (mg/day)^c					
Model2	5,115 (100.0)	Referent	1.08 (0.95-1.24)	1.01 (0.87-1.17)	0.8499
Cambridge Physical Activity Index (Met-h/week)					
Model2					0.8683
Inactive	1,288 (25.2)	Referent	0.94 (0.82-1.08)	0.98 (0.83-1.16)	
Moderately Inactive	1,686 (33.0)	Referent	0.98 (0.87-1.11)	0.94 (0.81-1.09)	
Moderately Active	1,061 (20.7)	Referent	1.01 (0.86-1.18)	0.95 (0.79-1.15)	
Active	989 (19.3)	Referent	1.02 (0.86-1.21)	0.98 (0.81-1.19)	
Missing/Unknown	91 (1.8)	Referent	1.18 (0.70-1.99)	0.79 (0.42-1.50)	
Smoking Status					
Model2					0.7176
Never	2,119 (41.4)	Referent	1.04 (0.96-1.17)	1.02 (0.89-1.16)	
Former	1,688 (33.0)	Referent	0.95 (0.84-1.08)	0.96 (0.83-1.11)	
Current	1,240 (24.2)	Referent	1.02 (0.88-1.18)	0.95 (0.80-1.12)	
Missing/Unknown	68 (1.3)	Referent	0.73 (0.37-1.41)	0.91 (0.44-1.87)	
Energy intake (kcal/day)^c					
Model2	5,115 (100.0)	Referent	1.22 (0.96-1.56)	1.18 (0.91-1.53)	0.259
Alcohol lifetime (g/day)^{cd}					
Model2	5,115 (100.0)	Referent	0.96 (0.73-1.26)	0.84 (0.60-1.17)	0.7544

^aThe analyses were run using sex-specific tertiles. Nitrosyl-heme intake (µg/day) for women: T1, 0–≤307.49; T2, >307.49–≤927.92; T3: >927.92; Nitrosyl-heme intake (µg/day) for men: T1, 0–≤560.80; T2, >560.80–≤1,620.57; T3:>1,620.57.

^bPerson-years by nitrosyl-heme tertiles: T1, 1,784881.17 person-years; T2, 1,725064.45 person-years and T3, 1,595336.01 person-years.

Model 1 stratified by age and centre, and adjusted for sex and energy intake.

Model 2: Model 1 and further adjusted by: height (in cm), weight (in kg), education level (none, primary school, technical/professional school, secondary school, longer education, and unknown), smoking status (never, former, and current), waist circumference (low: <88 cm in women & <102 cm in men; high: ≥88cm in women & ≥102cm in men), physical activity (inactive, moderately inactive, moderately active, active, unknown/missing), lifetime alcohol consumption (as continuous variable), fibre (as continuous variable), calcium (very low: ≤743.68 mg/day; low: >743.68mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

^c Expressed as a continuous variable.

^dAlcohol lifetime (g/day) (0=no alcohol in the past, i.e. at all ages in the past the alcohol use is 0; 1=never heavy (all past points in time g/d alcohol <60 (men) as the reference; 2=heavy alcohol use in the past (≥60 (men) at least at one age in the past).

BMI body mass index

All p-interactions were >0.05

Discussion

This study is the first to extrapolate nitrosyl-heme values for a wide range of European PMs using data from nitrosyl-heme levels in Spanish PMs. In this prospective European cohort, no significant association was observed between nitrosyl-heme intake and CRC risk, either overall or by tumour subtypes.

Our findings contrast with those of Bastide et al. (2016) (9), who have examined the relationship between nitrosyl-heme intake and CRC risk. Bastide's study found a significant positive association between nitrosyl-heme intake and proximal colon cancer (comparing the highest to the lowest quartile) among women in a French cohort. However, in our study, although the observations did not reach statistical significance, a trend towards a higher risk of distal colon cancer in women was observed, as well as a trend towards a greater risk of both colon and CRC, though these associations diminished at higher intake levels. Several methodological differences may account for our differing results. Bastide et al. used a fixed coefficient for nitrosyl-heme content across all PM products, potentially resulting in less precise estimations. In contrast, our approach involved direct laboratory measurements of nitrosyl-heme in Spanish PMs, to provide more accurate assessments.

Despite potential mechanisms linking nitrosyl-heme intake to CRC risk (18-23), our findings suggest nitrosyl-heme intake in this cohort might not significantly increase CRC risk. Although the EPIC study has identified a positive association between CRC risk and PM intake (24), the overall lack of significant impact on CRC risk suggests that other factors may play a more crucial role in the development of this type of cancer. This may be due to a combination of factors, including complex interactions between dietary compounds such as fibre and calcium. Additionally, the presence of other substances like nitrates/nitrites or carcinogens resulting from different cooking methods might also be influencing the risk. Moreover, the lack of information regarding timing and eating occasions could affect additional non studied interactions among relevant factors.

Our study has some limitations. First, dietary intakes were collected only once at baseline which may not fully capture changes over time. Second, the EPIC study sample is not representative of the entire European population. Additionally, the dietary data from the 1990s may not reflect current consumption trends, which could affect the

accuracy of PM intake reported after years of follow-up. However, issues that could affect the representativeness of the current samples were considered, such as changes in ingredients or procedures. Finally, although we aimed to provide an accurate estimation of nitrosyl-heme content in European PMs, the lack of validation for these estimates, represents a limitation of the study. Nevertheless, the large number of PMs analysed through direct extrapolation strengthens our findings, mitigating the impact of regional variations.

This study's strengths include its prospective design within the EPIC study, minimising selection and recall biases. Its large sample size and extended follow-up bolster the reliability and applicability of findings across diverse European populations. Additionally, robust adjustments for numerous confounders related to diet, lifestyle, and health status were incorporated into the statistical models. Laboratory measurements using the HPLC method to quantify nitrosyl-heme levels in Spanish PMs further strengthen the study's methodology.

Conclusion

Given the biological plausibility between nitrosyl-heme and CRC risk, and despite not finding an association, these findings emphasise the need for further research, including repeated measurements of PM intake, timing and eating occasion data, and precise assessments of nitrosyl-heme in typical/regional PMs to confirm these results.

Acknowledgments

Funding

This study was supported by grant from the Instituto de Salud Carlos III through the PI19/00817 project (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe) and through the PFIS FI20/00006 predoctoral funding (co-funded by the European Social Fund (ESF), investing in your future).

The coordination of EPIC-Europe is financially supported by International Agency for Research on Cancer(IARC) and also by the Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Imperial College London which has additional infrastructure support provided by the NIHR Imperial Biomedical Research Centre (BRC). The national cohorts are supported by: Danish Cancer Society (Denmark);Ligue Nationale Contre le Cancer, Institut Gustave Roussy, Mutuelle Générale de l'Education

Nationale (MGEN), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), French National Research Agency (ANR, reference ANR-10-COHO-0006), French Ministry for Higher Education (subsidy 2102918823, 2103236497, and 2103586016) (France); German Cancer Aid, German Cancer Research Center (DKFZ), German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke (DIfE), Federal Ministry of Education and Research (BMBF) (Germany); Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro-AIRC-Italy, Italian Ministry of Health, Italian Ministry of University and Research (MUR), Compagnia di San Paolo (Italy); Dutch Ministry of Public Health, Welfare and Sports (VWS), the Netherlands Organisation for Health Research and Development (ZonMW), World Cancer Research Fund (WCRF), (The Netherlands); UiT The Arctic University of Norway; Health Research Fund (FIS) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Regional Governments of Andalucía, Asturias, Basque Country, Murcia and Navarra, and the Catalan Institute of Oncology - ICO (Spain); Swedish Cancer Society, Swedish Research Council and County Councils of Skåne and Västerbotten (Sweden); Cancer Research UK (C864/A14136 to EPIC-Norfolk; C8221/A29017 to EPIC-Oxford), Medical Research Council (MR/N003284/1, MC-UU_12015/1 and MC_UU_00006/1 to EPIC-Norfolk; MR/Y013662/1 to EPIC-Oxford) (United Kingdom). Previous support has come from “Europe against Cancer” Programme of the European Commission (DG SANCO).

We thank CERCA Programme / Generalitat de Catalunya for institutional support.

Disclaimer

Where authors are identified as personnel of the International Agency for Research on Cancer / World Health Organization, the authors alone are responsible for the views expressed in this article and they do not necessarily represent the decisions, policy or views of the International Agency for Research on Cancer / World Health Organization.

Institutional Review Board Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of the International Agency for Research on Cancer (IARC) and local ethical committees pertaining to EPIC Centers.

Informed Consent Statement

Written informed consent was obtained from all participants involved in the study.

Data Availability Statement

EPIC data and biospecimens are available for investigators who seek to answer important questions on health and disease in the context of research projects that are consistent with the legal and ethical standard practices of the International Agency for Research on Cancer (IARC), WHO, and the EPIC centres. The primary responsibility for accessing the data, obtained in the frame of the present publication, belongs to the EPIC centres that provided them. Access to EPIC data can be requested to the EPIC Steering Committee, as detailed in the EPIC-Europe Access Policy.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. GLOBOCAN 2020, International Agency for Research on Cancer 2023 (IARC). Global Cancer Observatory. Available online: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0 (accessed on 03 April 2023)
2. Akimoto, Naohiko et al. "Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action." *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 18,4 (2021): 230-243. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00445-1>
3. International Agency for Research on Cancer. (IARC Working Group). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat [Internet]. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum; 2015 [cited 2022 Aug 22]. Report No.: Volume 114. Available from: www.thelancet.com/oncology
4. Fonseca-Nunes A, Jakszyn P, Agudo A. Iron and cancer risk--a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Jan;23(1):12-31. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0733>
5. Lee DH, Anderson KE, Harnack LJ, Folsom AR, Jacobs DR Jr. Heme iron, zinc, alcohol consumption, and colon cancer: Iowa Women's Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:403-7.
6. Bastide NM, Chenni F, Audebert M, Santarelli RL, Tache S, Naud N, et al A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 2015;75:870-9.
7. Possible Substitutes for Nitrite [Internet]. Nitrite Curing of Meat. Wiley; 2004. p. 209-53. Available on: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470385081.ch9>
8. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer.* 2008;60(2):131-44. <https://doi.org/10.1080/01635580701684872>
9. Bastide N, Morois S, Cadeau C, Kangas S, Serafini M, Gusto G, Dossus L, Pierre FH, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Apr;25(4):640-7. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0724>.

10. Rizzolo-Brime L., Lujan-Barroso L., et al, Nitrosyl-heme and heme iron intake from processed meats and risk of colorectal cancer in the EPIC-Spain cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
11. Kuhnle GGC, Bingham SA. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1355–7.
12. Pierre FHF, Santarelli RL, Allam O, Tache S, Naud N, Gueraud F, et al. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer.* 2010;62(5):567–73.
13. Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis.* 2001 Jan;22(1):199–202.
14. Riboli, E. The EPIC Project: Rationale and study design. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int. J.Epidemiol.* 1997, 26, S6–S14. https://doi.org/10.1093/ije/26.suppl_1.s6
15. Riboli, E.; Hunt, K.J.; Slimani, N.; Ferrari, P.; Norata, T.; Fahey, M.; Charrondiere, U.R.; Hemon, B.; Casagrande, C.; Vignata, J.; et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): Study populations and data collection. *Public Health Nutr.* 2002, 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1079/PHN2002394>
16. Cust, A.E., Smith, B.J., Chau, J. et al. Validity and repeatability of the EPIC physical activity questionnaire: a validation study using accelerometers as an objective measure. *Int J Behav Nutr Phys Act* 5, 33 (2008). <https://doi.org/10.1186/1479-5868-5-33>
17. Ricard Bou, Andreu Farran-Codina, Lucía Rizzolo-Brime, Jacint Arnau, Gerard Sabeña and Paula Jakszyn, IRON, HEME, AND NITROSYL-HEME CONTENT IN SPANISH MEAT DERIVATIVES, *Journal of Food Composition and Analysis*, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105832>
18. Deharveng G, Riboli E (1999). Comparison of nutrients in the food composition tables available in the nine European countries participating in EPIC |. *European Journal of Clinical Nutrition.* 53:60–79. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600677>.
19. Kuhnle G.G.C., Story G.W., Reda T., Mani A.R., Moore K.P., Lunn J.C., Bingham S.A. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;43:1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.011>.
20. Lala P.K., Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2001;2:149–156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00256-4).

21. Rao C.V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* 2004;555:107–119. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.05.022>.
22. Alam A, Smith SC, Gobalakrishnan S, McGinn M, Yakovlev VA, Rabender CS. Uncoupled nitric oxide synthase activity promotes colorectal cancer progression. *Front Oncol.* 2023 Mar 14;13:1165326. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1165326>. PMID: 36998441; PMCID: PMC10046306.
23. B.C. Cupid, et al. Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay *Chem. Res. Toxicol.*, 17 (2004), p. 294
24. Le Leu RK, Winter JM, Christophersen CT, Young GP, Humphreys KJ, Hu Y, et al. Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: a randomised clinical trial. *Br J Nutr.* 2015;114:220–30. <https://doi.org/10.1017/S0007114515001750>.
25. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jun;97(12):906–16.

Supplementarial Material

Supplementary Table 1. Population characteristics according nitrosyl-heme intake in men within European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

Men

		Nitrosyl-heme intake (µg/d)			
		N (%)	p25	Median	p75
Total		109,120 (29.7)	379.73	1,006.80	2,047.18
Age (y)					
	<33	4,272 (3.9)	21.40	269.01	1,443.62
	≥33-<44	17,156 (15.7)	280.83	910.87	2,101.7
	≥44 - <54	38,751 (35.5)	430.44	1,071.93	2,100.53
	≥54- <64	40,003 (36.7)	492.22	1,161.93	2,157.32
	≥64	8,938 (8.2)	215.97	555.24	1,208.10
BMI (kg/m2)					
	<25	38,461 (35.2)	249.83	800.74	1,861.44
	>25-30	53,779 (49.3)	431.92	1,064.96	2,075.50
	>30	16,880 (15.5)	543.17	1,237.59	2,352.82
Country					
	France	/	/	/	/
	Italy	14,032 (12.9)	279.71	537.94	952.01
	Spain	15,139 (13.9)	385.71	894.77	1,637.71
	UK	22,850 (20.9)	42.80	254.16	598.63
	The Netherlands	9,627 (8.8)	686.25	1,415.98	2,472.02
	Germany	21,178 (19.4)	1,395.43	2,368.99	3,832.29
	Denmark	26,294 (24.1)	882.44	1,467.05	2,284.12
Waist circumference (cm)^a					
	Normal	85,274 (78.1)	338.96	930.36	1,955.65
	High	23,846 (21.9)	563.98	1261.81	2,337.58
Cambridge Physical Activity Index (Met-h/week)					
	Inactive	18,357 (16.8)	300.00	771.43	1,814.27
	Moderately Inactive	32,821 (30.1)	371.38	961.58	1,968.52
	Moderately Active	25,955 (23.8)	392.92	1,042.76	2,064.67
	Active	28,984 (26.6)	450.30	1,164.42	2,215.86
	Missing/Unknown	3,003 (2.8)	435.21	1,116.60	2,068.44
Educational level					
	None	4,183 (3.8)	377.79	910.03	1,728.62
	Primary School	29,610 (27.1)	531.15	1,195.79	2,250.46
	Technical, professional	27,851 (25.5)	475.02	1,172.77	2,260.60
	Secondary School	12,736 (11.7)	302.10	735.77	1,512.72
	Longer Education	31,008 (28.4)	280.47	952.73	2,042.84
	Not specified	3,732 (3.4)	61.19	314.64	690.07
Smoking status					
	Never	34,402 (31.5)	269.01	821.37	860.96
	Former	41,094 (37.7)	375.48	978.91	2,013.54
	Current	32,452 (27.7)	551.36	1,239.25	2,277.27
	Missing/Unknown	1,172 (1.1)	217.56	497.25	867.39

Alcohol lifetime (g/day)^b					
	Non alcohol	1,301 (1.2)	222.94	589.22	1,319.46
	Never heavy	100,239 (91.9)	373.38	995.68	2,028.75
	Heavy	7,580 (6.9)	537.00	1,235.03	2,380.76
Family history of colorectal cancer					
	Yes	23,974 (22.0)	274.29	639.23	1,247.57
	No	1,611 (1.5)	271.74	610.20	1,138.11
	Not specified	83,535 (76.6)	435.03	1,179.18	2,278.2
Calcium (mg/day)^c					
	Very Low	28,357 (26.0)	411.17	1,107.29	2,155.87
	Low	29,510 (27.0)	387.92	1,013.57	2,057.43
	Normal	51,253 (47.0)	360.71	950.24	1,975.18
Fibre (g/day)					
	<30	82,449 (75.6)	393.12	982.03	1,986.72
	≥30	26,671 (24.4)	321.03	1,095.46	2,213.78

^aWaist circumference (cm) (normal: <102 cm; high: ≥102 cm)

^bAlcohol lifetime (g/day) (0=no alcohol in the past, i.e. at all ages in the past the alcohol use is 0; 1=never heavy (all past points in time g/d alcohol <60 (men) as the reference; 2=heavy alcohol use in the past (≥60 (men) at least at one age in the past).

^cCategorization of calcium intake was performed based on the population distribution in the calcium variable (continuous) and according to the daily intake recommendations found in the following document: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-DatosEnEspanol/> (very low: ≤743.68 mg/day; low: >743.68mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

BMI body mass index

Supplementary Table 2. Population characteristics according nitrosyl-heme intake in women within European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

Women

		Nitrosyl-heme intake (µg/d)			
		N (%)	p25	Median	p75
Total		258,343 (70.3)	208.56	559.25	1,205.15
Age (y)					
	<33	12,955 (5.0)	3.00	42.8	312.49
	≥33-<44	42,734 (16.5)	146.03	512.83	1,244.08
	≥44 - <54	100,878 (39.0)	270.30	661.37	1,359.94
	≥54- <64	81,423 (31.5)	246.96	585.39	1,190.79
	≥64	20,353 (7.9)	169.88	423.54	890.16
BMI (kg/m2)					
	<25	153,505 (59.4)	178.73	527.80	1,177.77
	≥25-30	73,873 (28.6)	239.20	583.13	1,209.21
	≥30	30,965 (12.0)	260.57	638.58	1,343.0
Country					
	France	67,403 (26.1)	406.71	883.86	1,689.43
	Italy	30,513 (11.8)	168.61	363.85	677.77
	Spain	24,850 (9.6)	189.18	485.18	952.74
	UK	52,566 (20.3)	21.40	141.91	388.88
	The Netherlands	26,912 (10.4)	282.84	677.98	1,268.69
	Germany	27,379 (10.6)	798.63	1,555.27	2,526.11
	Denmark	28,720 (11.1)	363.05	687.67	1,161.48
Waist circumference (cm)^a					
	Normal	164,711 (63.8)	146.94	448.67	1,026.12
	High	46,040 (17.8)	272.57	641.80	1,309.33
	Missing/Unknown	47,592 (18.4)	409.89	896.97	1,716.80
Cambridge Physical Activity Index (Met-h/week)					
	Inactive	58,179 (22.5)	181.86	471.98	1,057.04
	Moderately Inactive	92,544 (35.8)	217.48	571.87	1,231.51
	Moderately Active	62,166 (24.1)	230.96	620.00	1,316.27
	Active	41,713 (16.1)	196.39	559.39	1,177.02
	Missing/Unknown	3,741 (1.4)	238.92	647.80	1,282.47
Educational level					
	None	10,691 (4.1)	171.43	458.57	934.01
	Primary School	57,388 (22.2)	266.16	593.24	1,207.89
	Technical, professional	52,184 (20.2)	231.77	602.46	1,264.28
	Secondary School	62,279 (24.1)	247.26	641.00	1,332.04
	Longer Education	62,874 (24.3)	128.92	477.82	1,191.12
	Not specified	12,927 (5.0)	61.19	307.64	709.16
Smoking status					
	Never	149,478 (57.9)	193.94	541.75	1,190.21
	Former	58,477 (22.6)	188.42	528.79	1,159.99
	Current	45,386 (17.6)	258.33	630.05	1,288.73
	Missing/Unknown	5,002 (1.9)	299.04	744.78	1,496.63

Alcohol lifetime (g/day)^b					
	Non alcohol	23,095 (8.9)	168.39	437.14	927.23
	Never heavy	229,218 (88.7)	216.09	574.08	1,231.17
	Heavy	6,030 (2.3)	112.92	523.18	1,307.85
Family history of colorectal cancer					
	Yes	88,146 (34.1)	282.64	662.32	1,336.23
	No	7,689 (3.0)	290.95	675.87	1,365.71
	Not specified	162,508 (62.9)	158.48	491.82	1,129.5
Calcium (mg/day)^c					
	Very Low	63,506 (24.6)	183.96	512.40	1,147.10
	Low	76,608 (29.7)	219.79	562.88	1,197.35
	Normal	118,229 (45.8)	215.47	581.92	1,242.03
Fibre (g/day)					
	<30	219,044 (84.8)	224.97	575.52	1,214.54
	≥30	39,299 (15.2)	79.60	436.67	1,149.70

^aWaist circumference (cm) (normal: <88cm ; high: ≥88cm; missing/unknown).

^bAlcohol lifetime (g/day) (0=no alcohol in the past, i.e. at all ages in the past the alcohol use is 0; 1=never heavy (all past points in time g/d alcohol <30 (women)) as the reference; 2=heavy alcohol use in the past (≥30 (women) at least at one age in the past).

^cCategorization of calcium intake was performed based on the population distribution in the calcium variable (continuous) and according to the daily intake recommendations found in the following document: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-DatosEnEspanol/> (very low: ≤743.68 mg/day; low: >743.68mg/day-<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

BMI body mass index

Supplementary Table 3. Multivariable HR (95% CI) of colorectal adenomas by site according to tertile of nitrosyl-heme intake in men

Tertiles of nitrosyl-heme intake ^{a,b}						
	HR (95% CI) T1	HR (95% CI) T2	HR (95% CI) T3	p-trend	Continuous (per 400 µg increment) ^c	AIC [†]
Colorectal Cancer						
N Cases	717	814	697		2,228	
Model1	Referent	1.04 (0.93-1.16)	1.03 (0.90-1.17)	0.69	1.00 (0.99-1.02)	24,628.9
Model2	Referent	0.98 (0.88-1.09)	0.94 (0.82-1.08)	0.40	0.99 (0.98-1.01)	23,920.0
Distal colon Cancer^d						
N Cases	211	225	185		621	
Model1	Referent	0.99 (0.81-1.22)	1.06 (0.82-1.35)	0.68	1.00 (0.97-1.02)	6,678.5
Model2	Referent	0.93 (0.76-1.14)	0.95 (0.74-1.23)	0.72	0.98 (0.96-1.01)	6,597.7
Proximal colon Cancer^d						
N Cases	190	178	149		517	
Model1	Referent	0.94 (0.75-1.18)	0.96 (0.72-1.26)	0.73	0.99 (0.96-1.02)	5,667.9
Model2	Referent	0.89 (0.71-1.12)	0.89 (0.67-1.17)	0.38	0.98 (0.95-1.01)	5,440.6
Colon Cancer^e						
N Cases	717	814	697		1,242	
Model1	Referent	0.97 (0.84-1.13)	1.02 (0.85-1.21)	0.88	1.00 (0.98-1.02)	13,598.3
Model2	Referent	0.92 (0.79-1.06)	0.93 (0.78-1.11)	0.40	0.99 (0.97-1.01)	13,492.5
Rectal Cancer^e						
N Cases	225	324	274		823	
Model1	Referent	1.23 (1.02-1.48)	1.10 (0.88-1.37)	0.48	1.00 (0.98-1.03)	9,285.0
Model2	Referent	1.17 (0.97-1.41)	1.02 (0.81-1.27)	0.97	1.00 (0.98-1.02)	9,260.5

^a Nitrosyl-heme intake (µg/day) for men: T1, 0–≤560.80; T2, >560.80–≤1,620.57; T3:>1,620.57.

^b Person-years by nitrosyl-heme tertiles: T1, 1784881.17 person-years; T2, 1725064.45 person-years and T3, 1595336.01 person-years.

Model 1 stratified by age and centre, and adjusted for energy intake.

Model 2: Model 1 and further adjusted by: height (in cm), weight (in kg), education level (none, primary school, technical/professional school, secondary school, longer education, and unknown), smoking status (never, former, and current), waist circumference (low: <102 cm in men; high: ≥102cm in men), physical activity (inactive, moderately inactive, moderately active, active, unknown/missing), lifetime alcohol consumption (as continuous variable), fibre (as continuous variable), calcium (very low: ≤ 734.50 mg/day; low: >734.50 mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

^c Continuous variables: the HR (95% CI) corresponds to an increase of: 400 µg/day for nitrosyl-heme

^d P homogeneity proximal vs. distal colon cancer = 0.29 for nitrosyl-heme iron intake.

^e P homogeneity colon vs. rectum cancer = 0.10 for nitrosyl-heme iron intake.

There were 66 and 51 overlapping /non-specified colon or in situ cancer cases in women, respectively

^f AIC Akaike information criterion

Supplementary Table 4. Multivariable HR (95% CI) of colorectal adenomas by site according to tertile of nitrosyl-heme intake in women

Tertiles of nitrosyl-heme intake ^{a,b}						
	HR (95% CI) T1	HR (95% CI) T2	HR (95% CI) T3	p-trend	Continuous (per 400 µg increment) ^c	AIC ^f
Colorectal Cancer						
N Cases	913	1,080	894		2,887	
Model1	Referent	1.10 (1.00-1.21)	1.11 (1.00-1.24)	0.045*	1.02 (1.00-1.03)	33,804.5
Model2	Referent	1.07 (0.98-1.18)	1.06 (0.94-1.18)	0.33	1.01 (0.99-1.02)	33,261.2
Distal colon Cancer^d						
N Cases	244	289	242		775	
Model1	Referent	1.10 (0.92-1.32)	1.16 (0.95-1.43)	0.15	1.02 (0.99-1.03)	9,090.3
Model2	Referent	1.09 (0.91-1.31)	1.13 (0.91-1.40)	0.26	1.01 (0.98-1.05)	9,092.3
Proximal colon Cancer^d						
N Cases	297	353	261		911	
Model1	Referent	1.12 (0.95-1.31)	1.04 (0.86-1.27)	0.60	1.00 (0.96-1.03)	10,532.8
Model2	Referent	1.10 (0.93-1.29)	1.00 (0.82-1.21)	0.98	0.99 (0.95-1.02)	10,525.1
Colon Cancer^e						
N Cases	581	692	542		1,815	
Model1	Referent	1.13 (1.00-1.26)	1.13 (0.99-1.30)	0.07	1.01 (0.99-1.03)	21,106.0
Model2	Referent	1.09 (0.96-1.23)	1.08 (0.94-1.24)	0.28	1.00 (0.98-1.05)	20,780.5
Rectal Cancer^e						
N Cases	264	286	257		807	
Model1	Referent	0.99 (0.83-1.18)	1.03 (0.84-1.26)	0.75	1.03 (1.00-1.06)	9,621.1
Model2	Referent	0.97 (0.81-1.16)	0.99 (0.8-1.22)	0.90	1.03 (1.00-1.06)	9,636.4

^aNitrosyl-heme intake (µg/day) for women: T1, 0–≤307.49; T2, >307.49–≤927.92; T3: >927.92

^bPerson-years by nitrosyl-heme tertiles: T1, 1784881.17 person-years; T2, 1725064.45 person-years and T3, 1595336.01 person-years.

Model 1 stratified by age and centre, and adjusted for energy intake.

Model 2: Model 1 and further adjusted by: height (in cm), weight (in kg), education level (none, primary school, technical/professional school, secondary school, longer education, and unknown), smoking status (never, former, and current), waist circumference (low: <88 cm in women; high: ≥88cm), physical activity (inactive, moderately inactive, moderately active, active, unknown/missing), lifetime alcohol consumption (as continuous variable), fibre (as continuous variable), calcium (very low: ≤ 747.61 mg/day; low: >747.61mg/day–<1,000 mg/day and normal: ≥1,000 mg/day).

^cContinuous variables: the HR (95% CI) corresponds to an increase of: 400 mcg/day for nitrosyl-heme

^dP homogeneity proximal vs. distal colon cancer = 0.02 for nitrosyl-heme iron intake.

^eP homogeneity colon vs. rectum cancer = 0.10 for nitrosyl-heme iron intake.

There were 129 and 130 overlapping /non-specified colon or in situ cancer cases in women, respectively.

^fAIC Akaike information criterion

Supplementary Table 5 . Risk of colorectal cancer and tumour subtypes from nitrosyl-heme intake: hazard ratios and 95% CI, EPIC study sensitivity analyses

Sex-specific tertiles of nitrosyl-heme intake							
	N cases	HR (95% CI) T1	HR (95% CI) T2	HR (95% CI) T3	p-trend	Continuous (per 400 µg increment) ^a	AIC ^b
Colorectal Cancer							
Excluding the first 5 years of follow-up							
Model 1	3,928	Referent	1.04 (0.96-1.13)	1.01 (0.92-1.11)	0.86	1.01 (1.00-1.02)	48,795.8
Model 2		Referent	1.03 (0.95-1.11)	0.99 (0.90-1.09)	0.83	1.00 (0.99-1.01)	48,662.2
Additional excluding participants from UK ^c							
Model 1	3,131	Referent	1.03 (0.95-1.13)	0.98 (0.89-1.09)	0.79	1.00 (0.99-1.01)	38,937.0
Model 2		Referent	1.02 (0.93-1.11)	0.97 (0.88- 1.08)	0.66	1.00 (0.98-1.01)	38,833.1
Distal Colon Cancer							
Excluding the first 5 years of follow-up							
Model 1	1,051	Referent	0.99 (0.85-1.16)	1.01 (0.84-1.21)	0.92	1.01 (0.98-1.03)	12,991.1
Model 2		Referent	0.99 (0.54-1.15)	1.00 (0.84-1.21)	0.93	1.00 (0.97-1.02)	12,936.4
Additional excluding participants from UK ^c							
Model 1	876	Referent	1.00 (0.85-1.18)	0.97 (0.80-1.17)	0.79	1.00 (0.98-1.02)	10,799.2
Model 2		Referent	1.00 (0.85-1.18)	0.98 (0.81-1.19)	0.86	0.99 (0.97-1.02)	10,759.6
Proximal Colon Cancer							
Excluding the first 5 years of follow-up							
Model 1	1,134	Referent	1.05 (0.91-1.22)	1.01 (0.85-1.20)	0.89	0.99 (0.97-1.02)	13,954.0
Model 2		Referent	1.04 (0.90-1.20)	0.98 (0.82-1.17)	0.84	0.98 (0.96-1.01)	13,908.2
Additional excluding participants from UK ²							
Model 1	865	Referent	1.08 (0.92-1.27)	1.04 (0.85-1.26)	0.67	0.99 (0.96-1.01)	10,679.8
Model 2		Referent	1.06 (0.90-1.26)	1.01 (0.83-1.22)	0.79	0.98 (0.95-1.01)	10,644.5
Colon Cancer							
Excluding the first 5 years of follow-up							
Model 1	2,351	Referent	1.03 (0.93-1.14)	1.04 (0.92-1.17)	0.53	1.00 (0.99-1.02)	29,051.3
Model 2		Referent	1.02 (0.92-1.13)	1.02 (0.90-1.15)	0.79	0.99 (0.98-1.01)	28,936.6

Additional excluding participants from UK^c

Model 1	1,871	Referent	1.07 (0.96-1.20)	1.04 (0.91-1.18)	0.51	1.00 (0.98-1.02)	23,133.9
Model 2		Referent	1.06 (0.94-1.18)	1.02 (0.90-1.17)	0.68	0.99 (0.97-1.01)	23,043.4

Rectal Cancer

Excluding the first 5 years of follow-up

Model 1	1,222	Referent	1.07 (0.93-1.24)	0.93 (0.79-1.11)	0.42	1.01 (0.99-1.03)	15,360.6
Model 2		Referent	1.05 (0.90-1.21)	0.91 (0.77-1.09)	0.31	1.00 (0.98-1.02)	15,350.4

Additional excluding participants from UK^c

Model 1	980	Referent	1.00 (0.85-1.17)	0.94 (0.79-1.12)	0.51	1.01 (0.99-1.03)	12,320.9
Model 2		Referent	0.98 (0.84-1.15)	0.94 (0.78-1.13)	0.25	1.00 (0.98-1.02)	12,319.3

^aModels were run per 400µg of increment of nitrosyl-heme intake. Models were adjusted for sex, height, weight, education, physical activity, smoking, calcium intake, fibre intake, alcohol lifetime consumption and for energy intakes and stratified by age at recruitment and centre.

^bAIC Akaike information criterion

^cMostly vegetarians

5. DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral se centró en investigar en profundidad el papel del nitrosilhemo en el riesgo de cáncer colorrectal. Este compuesto, que se forma durante la elaboración de ciertas carnes procesadas, ha sido recientemente identificado como un posible factor clave en la asociación entre el consumo de dichas carnes y el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Adicionalmente, se estudió el rol del hierro hemo, otro compuesto ampliamente relacionado con el cáncer colorrectal. Dado que los datos disponibles sobre ambos compuestos en carnes procesadas son limitados y la evidencia científica sobre la relación entre la ingesta de nitrosilhemo y el riesgo de cáncer colorrectal es aún escasa, los artículos presentados en esta tesis representan un avance significativo en la investigación de los compuestos presentes en la carne procesada y su posible impacto en el riesgo de esta enfermedad. Dada la plausibilidad del mecanismo biológico entre la ingesta de nitrosilhemo, hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal, es necesaria la realización de investigaciones adicionales que incluyan cohortes más heterogéneas, de distintas etnias y regiones geográficas. Además, estos hallazgos podrían servir como punto de partida para futuros estudios a largo plazo e investigaciones que exploren su posible asociación con otros tipos de tumores.

Los artículos presentados en esta tesis cuentan con una sección de discusión proporcionando una interpretación de los resultados encontrados en cada artículo. No obstante, algunos temas no fueron discutidos con tanto detalle en los mismos, por lo tanto, serán analizados con más profundidad en esta sección.

5.1 Determinación de hierro hemo y nitrosilhemo en carnes procesadas

Tanto el nitrosilhemo como el hierro hemo han sido señalados como posibles responsables de la asociación entre la ingesta de carnes procesadas y el cáncer colorrectal. Para poder estudiar esta relación, es esencial contar con datos sobre sus niveles en carnes procesadas con el fin de proporcionar evidencia sólida.

Para estimar sus niveles de exposición, se han seguido diferentes enfoques: el hierro hemo ha sido expresado en estudios previos como porcentaje del hierro total disponible en productos cárnicos (215) o mediante el uso de tablas de composición de alimentos (216). Además, existen bases de datos sobre hierro hemo en países como Tailandia (213) y Estados Unidos (214). Por otro lado, hasta la fecha, el nitrosilhemo ha sido analizado en estudios previos pero solo para tipos específicos de carnes procesadas (217–220) o como resultado de una multiplicación por un factor fijo para todas las carnes procesadas (221). Sin embargo, la disponibilidad de datos sobre carnes procesadas en Europa, abarcando ambos compuestos, es limitada. Considerando lo anterior, el artículo I de esta tesis proporciona una base de datos representativa y fiable que puede ser utilizada para realizar una evaluación más precisa de la ingesta de estos compuestos en la población española, ofreciendo estimaciones más exactas que las encontradas en la literatura previa para poblaciones europeas. En el artículo I, se presenta, además, la comparativa de dos métodos analíticos: el método clásico de *Hornsey* y el método por *HPLC*.

Los resultados indican una buena concordancia entre las dos metodologías para la determinación de hierro hemo y nitrosilhemo. Sin embargo, se recomienda el método cromatográfico, ya que algunos compuestos pueden interferir y causar una sobreestimación al usar la determinación espectrofotométrica clásica. Por ejemplo, algunos derivados cárnicos que incluyen ingredientes como la paprika (que contiene carotenoides, azorrubina y carmín) pueden ser la causa de la discrepancia en los resultados entre los dos métodos de determinación. Por lo tanto, el uso del método por *HPLC* puede ser más crítico y más aconsejable en muestras de jamón curado donde podemos encontrar Cinc-Protoporfirinas, muestras con pimentón/paprika (como la “sobrasada” y “chistorra”) y muestras con mucho hierro hemo (embutidos con sangre

o hígado). Por otro lado, la variabilidad observada en el contenido de hierro hemo y nitrosilhemo incluso dentro del mismo tipo de producto refuerza la idea de que la formulación (tipo de animal y músculo), el procesamiento y las condiciones de almacenamiento pueden ser determinantes. En relación con el primer objetivo planteado, este estudio representa la primera vez que los niveles de nitrosilhemo y hierro hemo han sido medidos en una gran cantidad de derivados cárnicos comparando dos métodos analíticos.

5.2 Estimación de la ingesta de hierro hemo y nitrosilhemo en carnes procesadas a nivel español y europeo

La evidencia disponible hasta el momento sobre el consumo de nitrosilhemo en cohortes prospectivas es escasa (221,222). En contraste, hay más investigaciones disponibles sobre la ingesta del hierro hemo (223–225). Sin embargo, hasta donde sabemos, ningún estudio previo ha investigado conjuntamente la estimación de la ingesta de ambos compuestos mediante la determinación directa por el método *HPLC*.

El único estudio previo al nuestro que ha reportado estimaciones de ingesta de ambos compuestos es la submuestra francesa del estudio EPIC (estudio E3N) liderado por el grupo de *Bastide et al.*, (2016) (221).

Hierro hemo

El artículo II presentado en esta tesis reportó valores de ingesta de hierro hemo más altos (226) en comparación con los reportados por *Bastide et al.*, (2016) (221). No obstante, cabe destacar que las metodologías para estimar la ingesta de este compuesto fueron diferentes en ambos estudios. El grupo de *Bastide et al.*, (2016) siguió la metodología descrita por *Balder et al.*, (2006) (227), en el que el contenido de hierro hemo se calculó multiplicando el contenido de hierro (en mg/g) del alimento por un porcentaje específico según el tipo de carne. En cambio, nuestro estudio presentó mediciones mediante la determinación directa por el método *HPLC*, ofreciendo estimaciones más precisas. Además, hay que considerar que la cohorte de *Bastide et al.*, (2016) estaba formada únicamente por mujeres, quienes tienden a tener una menor ingesta de carne y derivados cárnicos.

En relación a la ingesta de hierro hemo, más investigaciones han estudiado su posible asociación con diversas enfermedades (205,215,228). En una reciente publicación de *Aglago EK, et al., (2023) (225)* sobre el consumo de hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal para la cohorte europea EPIC, se obtuvieron ingestas ligeramente superiores a las encontradas en nuestro estudio. No obstante, es importante considerar que el enfoque de estimación utilizado por el grupo de *Aglago EK et al., (2023) (225)*, sigue la misma metodología que el grupo de *Bastide et al., (2016) (221)*, basada en lo descrito por *Balder et al., (2006) (227)*.

Nitrosilhemo

Aunque el consumo medio de carne procesada al día fue similar para el grupo de *Bastide et al., (2016) (222)* y nuestro estudio (226), los resultados sobre la ingesta de nitrosilhemo del artículo II presentan algunas discrepancias con los observados en los de este grupo.

Estas diferencias no solo se presentan en los resultados, sino también en la metodología empleada por ambos estudios. El grupo de *Bastide et al., (2016) (221)* obtuvo los datos de ingesta alimentaria mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria, una metodología que tiende a generar sobreestimaciones. Además, la estimación del nitrosilhemo se realizó multiplicando el contenido de hierro hemo por un factor fijo de 0,67 para todas las carnes procesadas, suponiendo una estimación menos precisa, considerando la variabilidad observada de este compuesto incluso en productos similares. Asimismo, este factor fijo corresponde a una eficiencia de curado del 67%, un valor que está muy por encima de las eficiencias de curado calculadas con nuestros datos mediante el método *HPLC*.

Es posible que las diferencias de ingesta observadas en cuanto al nitrosilhemo se deban a que, más allá del tipo de formulación y procesamiento tenga un embutido, en la cohorte francesa se hace una doble estimación: primero del hierro hemo y luego del nitrosilhemo, lo que podría generar resultados menos precisos que los nuestros.

De acuerdo con nuestra hipótesis III, los resultados del artículo II mostraron que el consumo de estos compuestos variaron según diferencias sociodemográficas,

regionales y de estilo de vida. Observamos que la media geométrica diaria de la ingesta de nitrosilhemio y hierro hemo fue mayor en hombres, personas con un IMC alto (≥ 25 - 30 kg/m^2), fumadores o exfumadores (para hierro hemo y nitrosilhemio, respectivamente), personas con una educación prolongada (para nitrosilhemio) o técnica/profesional (para hierro hemo), así como aquellos con niveles más altos de actividad física, donde el consumo diario de estos compuestos parecía aumentar.

Estimación de los datos Europeos: “*Matching alimentario*”

Dado que la cohorte EPIC no disponía de información sobre los niveles de nitrosilhemio en derivados cárnicos europeos, se implementó el concepto de “*Matching alimentario*”. Este término se refiere al sistema de correspondencia que empareja los niveles de nitrosilhemio de carnes procesadas españolas con los de carnes procesadas a nivel europeo. En este sentido, se extrapolaron los niveles de nitrosilhemio obtenidos en los derivados cárnicos españoles a los derivados cárnicos europeos registrados en los cuestionarios específicos de cada país dentro del estudio EPIC. Para realizar esta extrapolación, se tuvo en cuenta la formulación, ingredientes y cocción de las carnes procesadas europeas para poder garantizar una buena aproximación con sus respectivos derivados cárnicos españoles.

Como resultado de esta extrapolación, la submuestra francesa del artículo IV muestra ingestas considerablemente superiores a las reportadas en la cohorte francesa del grupo de *Bastide et al., (2016)*. Estas diferencias también pueden atribuirse a que en nuestro estudio se incluyen tanto hombres como mujeres, a diferencia de la cohorte francesa, que solo incluye mujeres. Sin embargo, es fundamental considerar las diferencias metodológicas entre ambos estudios, especialmente debido a las significativas variaciones en la determinación del nitrosilhemio, tal como se ha discutido anteriormente.

Biomarcadores de la ingesta alimentaria

Dada la variabilidad en los niveles de nitrosilhemo y hierro hemo en las carnes procesadas, y las limitaciones de los cuestionarios dietéticos para evaluar con precisión su consumo, es fundamental explorar métodos alternativos, como el uso de biomarcadores alimentarios. Los cuestionarios dietéticos presentan varias limitaciones, entre ellas la falta de detalles específicos sobre los derivados cárnicos procesados y las imprecisiones en las mediciones de ingesta debido al sesgo de memoria de los participantes. Además, considerando la evolución en las tendencias de consumo de estos alimentos y el largo periodo de seguimiento del estudio EPIC, los biomarcadores alimentarios podrían ofrecer una evaluación más precisa de la exposición a estos compuestos y su relación con el riesgo de cáncer.

En este contexto, se han identificado biomarcadores para la ingesta de carne ahumada como metabolitos alcaloides de la pimienta, en el que destaca la piperina (229). Estos biomarcadores se han encontrado tras la ingesta de salami y salchichas fritas, tanto en sangre como en orina, demostrando que la piperina es ampliamente metabolizada y conjugada en los tejidos humanos (229). Otros prometedores biomarcadores de la ingesta de carne ahumada son los sulfatos de siringol (230). Estos compuestos son el resultado de la combustión de ligninas, que se encuentran principalmente en el condensado del humo de la madera (230). La identificación de biomarcadores específicos de la ingesta de carnes procesadas depende tanto de la naturaleza como de la cantidad de ingredientes utilizados en su elaboración. Este enfoque es determinante para mejorar la evaluación de la ingesta de estos alimentos en estudios epidemiológicos. No obstante, son necesarios biomarcadores adicionales para otros tipos de carnes procesadas, por lo que es necesario profundizar en este campo.

Considerando que nuestro estudio, junto con el de *Bastide et al., (2016)* (221), son de los pocos que reportan conjuntamente el consumo de nitrosilhemo y hierro hemo en cohortes prospectivas hasta la fecha, creemos que es importante tener en cuenta no sólo la metodología utilizada para determinar el contenido de de estos compuestos en carnes procesadas, sino también para recopilar la información dietética. Este hecho subraya la necesidad de llevar a cabo más investigaciones en diversas cohortes para mejorar nuestra comprensión sobre la posible asociación entre estos compuestos y el

riesgo de cáncer colorrectal, enfocándose especialmente en la incorporación de nuevos biomarcadores de la ingesta de carnes procesadas que puedan mejorar la metodología utilizada hasta el momento.

5.3 El papel de la ingesta de hierro hemo y nitrosilhemo en el riesgo de cáncer colorrectal

Hierro hemo

El equipo liderado por *Lee DH. et al., (2004)* (231) reportó una asociación positiva y estadísticamente significativa entre el hierro hemo y el cáncer de colon proximal, mostrando que las mujeres que consumieron alcohol en comparación con aquellas que no lo hicieron, tuvieron un incremento de más del doble de riesgo. Siguiendo estos resultados, *Larsson SC. et al., (2005)* (232) analizaron esta asociación en una cohorte Sueca, y encontraron también una asociación positiva con el cáncer de colon, pero únicamente en mujeres que consumían al menos 20 gramos de alcohol por semana, con un incremento del riesgo del 129% al comparar los quintiles superiores e inferiores de ingesta de hierro hemo. Asimismo, un metaanálisis de cinco estudios prospectivos (233), encontró un aumento significativo en el riesgo de cáncer colorrectal del 8% por cada aumento de 1 mg en la ingesta de hierro hemo.

Por otro lado, otro estudio prospectivo encontró asociaciones positivas no estadísticamente significativas entre la ingesta de hierro hemo y el riesgo de este tipo de cáncer (227). En contraste, el grupo de *Zhang X. et al., (2011)* (224) no encontró ningún tipo de asociación entre la ingesta de hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal en mujeres. Así mismo, el último estudio de la cohorte EPIC publicado al respecto (225) mostró resultados diferentes según sexo y localización tumoral. En dicho estudio, la ingesta de hierro hemo en hombres mostró una asociación estadísticamente no significativa con el riesgo de cáncer colorrectal; mientras que en mujeres no se asoció con más riesgo. No obstante, en hombres, los análisis por subtipo tumoral sugirieron una asociación positiva más fuerte con el hierro hemo en el colon proximal en comparación con el colon distal, así como una asociación positiva estadísticamente significativa en el recto. En mujeres no se observó diferencia en la asociación de riesgo entre los diferentes subtipos tumorales. A diferencia de lo

reportado por *Aglago EK, et al. (2023)* el artículo III que se incluye en esta tesis (234), no mostró ningún tipo de asociación entre la ingesta de hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal independientemente del sexo y la localización tumoral.

Diferentes hipótesis han surgido como posible explicación de la asociación entre la ingesta de hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal. La mayoría de ellas basadas en la formación endógena de *NOCs* (93), los cuales podrían contribuir indirectamente a aumentar el riesgo de cáncer colorrectal al generar radicales de peróxido lipídico y aumentar la producción de nitrosaminas carcinogénicas en el colon. Los mecanismos mediante los cuales se ha vinculado estos compuestos con un mayor riesgo de cáncer colorrectal se centran en la creación de nuevos aductos de ADN, lo que podría provocar mutaciones y dar inicio al proceso de cáncer (179,180).

No se comprenden bien las variaciones en la forma en que el riesgo de cáncer colorrectal se relaciona con las diferentes localizaciones tumorales, especialmente en el colon. Una explicación plausible del por qué puede observarse esta asociación puede ser las acciones del microbioma y sus interacciones con el hierro disponible en el colon. La microbiota del colon se ve significativamente afectada por la cantidad de hierro disponible. El hierro juega un papel fundamental en el crecimiento y las funciones bacterianas en esta área, pero niveles elevados de hierro hemo pueden favorecer el crecimiento de bacterias patógenas (235,236).

El centro de la molécula hemo, donde se encuentra el hierro, puede convertir el nitrito en óxido nítrico. Este óxido nítrico, junto con los nitritos presentes en la carne, puede contribuir a la formación de nitrosaminas durante la digestión (237). Se ha demostrado que una mayor ingesta de carne roja procesada aumenta los niveles de algunos aductos de ADN, los cuales pueden causar mutaciones durante la división celular (195). Concretamente, el O6-metil-2-desoxiguanosina derivado de las nitrosaminas en el colon distal (238), se ha encontrado en biopsias rectales humanas (239), lo que indica que es posible que las acciones mutagénicas de las nitrosaminas puedan potenciarse también en el recto. Es probable que la producción de estos compuestos sea un factor importante en el desarrollo del cáncer colorrectal (225).

Si bien existen una gran cantidad de investigaciones sobre el consumo de hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal (174,233), la mayoría de ellos recogen la información dietética a través de cuestionarios de frecuencia alimentaria (172,224,231,232), el hierro hemo es estimado mediante un factor fijo (223,231) o se basa en valores medidos en carnes mediante el método espectrofotométrico clásico de *Hornsey* (240).

Dado que la evidencia sobre la asociación entre la ingesta del hierro hemo y el riesgo de cáncer colorrectal sigue siendo limitada (10) y, considerando que el método espectrofotométrico clásico de *Hornsey* puede tener interferencias al medir este compuesto en algunos derivados cárnicos, es importante destacar la relevancia de utilizar los datos obtenidos por el método *HPLC*. Este método ofrece estimaciones más precisas de los niveles de hierro hemo en carnes procesadas. Contar con estos datos permitiría evaluar de manera más específica la ingesta de este compuesto en la población y estudiar con mayor rigor su relación con posibles efectos adversos en la salud, contribuyendo a abordar las limitaciones actuales de la evidencia.

Nitrosilhemo

Se ha propuesto una hipótesis en relación a la ingesta de nitrosilhemo y el riesgo de cáncer colorrectal. El grupo de *Pierre FH et al., (2008)* (182) evaluó la hipótesis que planteaba que el nitrosilhemo presente en la carne procesada presentaba una mayor toxicidad en comparación con el hierro hemo encontrado en la carne fresca. Sus hallazgos confirmaron que el consumo de carne curada puede inducir la carcinogénesis de colon en ratas (209) y que es la adición de un grupo nitroso al hierro hemo, lo que juega un papel fundamental en el desarrollo de estos efectos adversos (210). Por otro lado, el grupo de *Hughes R et al., (2001)* (184) descubrió que el método para detectar los *NOCs*, incluía la detección de nitrosilhemo y S-nitrosotioles, además de nitrosaminas y nitrosamidas. Todos estos compuestos son conocidos como compuestos N-nitrosos totales aparentes (*ATNC*, por sus siglas en inglés). En este contexto, el grupo de *Kunhle et al., (2007)* planteó la posibilidad de que los compuestos de nitrosilhemo y los S-nitrosotioles podrían estar implicados en el potencial cancerígeno de la dieta (241). Un estudio observó que los participantes que consumieron una dieta rica en carne roja excretaron una cantidad considerablemente

mayor de *ATNC* en sus heces en comparación con los controles que consumieron poca o ninguna carne roja, o solo carne blanca (185,242). Además, otro estudio observó que la concentración fecal de *ATNC* en los individuos que ingirieron carne curada fue 60 veces superior a la observada en aquellos que siguieron una dieta vegetariana (243). En esta misma línea, el grupo de *Mirvish SS, et al., (2001)* observó que los hot dogs contienen 10 veces más compuestos N-nitrosos que la carne roja fresca (186), lo que sugiere la posibilidad de que el procesamiento de la carne esté involucrado en este fenómeno.

La abundante presencia de precursores de compuestos N-nitrosos ya presentes en la carne procesada, junto con el nitrosilhemio, podría conducir a una mayor exposición a compuestos N-nitrosos, tanto los formados exógenamente como los formados endógenamente. Esta combinación podría ser la causa detrás de los efectos cancerígenos más pronunciados en la carne procesada en comparación con la carne roja (182,194,195).

En este contexto, los estudios prospectivos realizados hasta el momento son escasos (*Bastide, et al., 2016*) (221). Tal y como se ha comentado y comparado anteriormente, el tipo de estimaciones realizadas en nuestros estudios y en el mencionado son diferentes. A partir de aquí, el grupo de *Bastide et al., (2016)* obtuvo una asociación positiva entre la ingesta de nitrosilhemio con el riesgo de cáncer de colon proximal (221). Respecto al riesgo de cáncer colorrectal y los demás subtipos tumorales, se observaron asociaciones positivas no estadísticamente significativas. Los resultados del artículo III mostraron una relación no lineal entre la ingesta de nitrosilhemio y el riesgo de cáncer colorrectal, con asociaciones más débiles en ingestas más altas (234). A pesar de que no se observó heterogeneidad en las asociaciones entre la ingesta de nitrosilhemio y el riesgo de cáncer colorrectal por subtipo de tumor, se observó una asociación positiva no estadísticamente significativa entre la ingesta de nitrosilhemio y el cáncer de colon proximal y recto. Tras la extrapolación realizada de carnes procesadas españolas a carnes procesadas europeas (con sus respectivos valores de nitrosilhemio), los resultados del artículo IV tampoco mostraron ningún tipo de asociación significativa entre la ingesta de nitrosilhemio específica por sexo y el cáncer colorrectal, ni por ninguno de los subtipos tumorales. Separando los análisis por sexo,

las mujeres presentaron una asociación positiva no estadísticamente significativa entre la ingesta de nitrosilhemio y el riesgo de cáncer colorrectal, colon distal y cáncer de colon. Por otro lado, los hombres presentaron una asociación positiva no estadísticamente significativa con el cáncer de recto.

Es importante destacar que existe poca evidencia al respecto, ya que solo un estudio ha investigado esta asociación y únicamente en mujeres (221). Teniendo en cuenta que las metodologías utilizadas para estimar el nitrosilhemio son diferentes en ambos estudios, la plausibilidad biológica existente, y la alta variabilidad observada en los niveles de nitrosilhemio en la carne procesada, es crucial disponer de tablas de composición específicas de carnes procesadas típicas de cada país y realizar investigaciones adicionales no sólo con cohortes heterogéneas sino que también incorporen otros métodos para estimar la ingesta dietética, especialmente destacando el uso de biomarcadores.

Por otro lado, en el estudio EPIC se ha observado un aumento del riesgo de cáncer colorrectal asociado al consumo de carnes procesadas (244). A pesar de la alta correlación entre el nitrosilhemio y estas carnes, la falta de influencia significativa en este riesgo sugiere que otros factores podrían estar desempeñando un papel más importante en el desarrollo de este tipo de cáncer. Entre estos factores se incluyen otros compuestos presentes en las carnes procesadas, como los nitratos/nitritos, contaminantes ambientales o carcinógenos provenientes de los diferentes métodos de preparación (como el ahumado, la fritura o el asado a altas temperaturas). Además, la influencia protectora de nutrientes como la fibra y el calcio, podrían contrarrestar el efecto potencialmente negativo del nitrosilhemio. En resumen, la falta de una influencia significativa del nitrosilhemio podría ser el resultado de una combinación de factores, incluyendo otros que en este caso no han sido estudiados como el horario y la ocasión de ingesta.

La plausibilidad biológica subyacente entre el nitrosilhemio y el riesgo de cáncer colorrectal, como se ha observado en estudios in vivo (241), estudios en animales (209) y estudios en humanos (184), hace que consideremos explorar el uso de biomarcadores para estimar la ingesta de carne procesada, lo que podría proporcionar datos más precisos sobre el consumo actual de este tipo de alimentos. Además, la

medición del nitrosilhemo en las carnes procesadas típicas de cada país proporciona datos más exactos de los niveles de este compuesto en los derivados cárnicos tradicionales, permitiendo obtener una evaluación más completa de su impacto en la salud.

Asimismo, considerando que los datos dietéticos fueron recopilados en los años 90 y los cambios en las tendencias alimentarias desde entonces, sería importante realizar estudios adicionales. Estos estudios deberían abordar estas cuestiones para comprender mejor la posible relación entre el nitrosilhemo y el riesgo de cáncer colorrectal, así como para confirmar nuestros hallazgos.

5.4 De las carnes procesadas a sus alternativas vegetales: nuevas tendencias alimentarias

Los derivados cárnicos están presentes en el consumo habitual de una parte importante de la población europea. Dentro del estudio EPIC (245), Noruega y Alemania son los países que más consumo de carne procesada presentan, mientras que Grecia y Reino Unido son los países que presentan menos. Además, las cohortes de EPIC en Países Bajos, Alemania, Dinamarca, Suecia y Noruega presentan patrones de consumo similares, con una alta ingesta de carne procesada y un menor consumo de carne de ave en comparación con los centros mediterráneos y del Reino Unido (246).

No obstante, es importante tener en cuenta que las tendencias alimentarias han variado desde los años 90 hasta la actualidad (247–249). No solo por la aparición de los conocidos como *UPFs* (cuya categorización aparece en 2009) (95), sino también tras la clasificación en 2015 de las carnes procesadas como cancerígenas (grupo 1) para los seres humanos por el *WCRF/AICR* (53). Los motivos por los que la población ha ido reduciendo el consumo de carnes procesadas se basan principalmente en la preocupación por la salud, la sostenibilidad y el bienestar animal (110). Además, el consumo de carne procesada varía según el estatus socioeconómico, como el ingreso o la educación (247). En este contexto, ha ido aumentando el número de personas que eliminan la carne de sus dietas, o al menos reducen su consumo, y/o buscan productos alternativos (110,111). En consecuencia, ha habido una necesidad considerable de

aumentar la oferta de *PBMAs* para complacer a los consumidores. Sin embargo, estos productos suelen presentar una larga lista de ingredientes y valores nutricionales que varían considerablemente en comparación con sus contrapartes de origen animal. Un estudio realizado por *Pointke et al., (2022)* (250) en Alemania, reveló diferencias significativas en la clasificación de los *PBMAs* según el sistema NutriScore. De manera similar, en Suecia, el grupo de *Bryngelsson S. et al. (2022)* (251) confirmó la heterogeneidad en la calidad nutricional de estos productos. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación (123) sobre *PBMAs* españoles, se observó que estos productos presentaban un alto contenido de sal y la gran mayoría se clasificaron como *UPFs* según el sistema NOVA, cuyo sistema de clasificación tiene en cuenta el grado de procesamiento del producto. Estos hallazgos resaltan la necesidad de evaluar críticamente la calidad nutricional de los *PBMAs*, ya que, a pesar de su creciente popularidad, pueden no ser siempre la opción más saludable.

Así como la ingesta de carnes procesadas ha mostrado una asociación positiva con el aumento del riesgo del cáncer colorrectal (118,153), la asociación entre el consumo de *UPFs* y el riesgo de este tipo de cáncer ha sido estudiado durante los últimos años, mostrando un aumento del riesgo a ingestas más altas de *UPFs* (102,103). Algunos de los potenciales mecanismos que pueden explicar esta asociación incluyen: su relación con un mayor aumento de peso y obesidad, ambos factores de riesgo bien conocidos para este tipo de cáncer (97); su alto contenido en azúcares y grasas añadidas que puede alterar la microbiota intestinal, un factor clave en el desarrollo del cáncer colorrectal (252); algunos aditivos alimentarios como el dióxido de titanio, el cual está actualmente evaluado por la OMS y la IARC como "probablemente carcinogénico para los humanos" en relación con el cáncer (grupo 2B) (253). Así como el contenido de algunas sustancias cancerígenas provenientes del plástico que entran en contacto con los alimentos, como el bisfenol A. Este último ha sido clasificado como "una sustancia de muy alta preocupación" por la Agencia Europea de Productos Químicos (254).

Dado el cambio en las tendencias alimentarias hacia una reducción del consumo de carnes procesadas y un aumento en el consumo de *PBMAs* (110,111), se hace evidente que la interacción compleja entre diversos alimentos y nutrientes en la dieta dificulta evaluar el efecto de un solo factor dietético. Esta complejidad es un desafío para los

estudios que se centran en factores individuales. Por ello, examinar los patrones dietéticos en su conjunto en relación con los resultados de enfermedades se presenta como un enfoque complementario fundamental. Recientemente, han surgido patrones alimentarios que consideran el grado de adherencia a una dieta que priorice el consumo de alimentos de origen vegetal, evaluando la calidad nutricional de este tipo de alimentos y clasificándolos como saludables o no saludables. Todos ellos penalizan la ingesta de alimentos de origen animal, pero valoran de manera diferente los alimentos vegetales según su calidad nutricional. Así, algunos estudios han comenzado a investigar la asociación entre estos patrones y el riesgo de cáncer colorrectal (122,255,256), entre otros tumores y patologías. En ellos, se observa que los individuos que tienen una mayor adherencia a un patrón dietético basado en alimentos de origen vegetal poco saludable, presentaron una mayor incidencia de cáncer colorrectal. Por otro lado, un patrón dietético basado en alimentos de origen vegetal saludable, se asocia con una menor incidencia de este tipo de cáncer (122,255,256). Sin embargo, el informe del *WCRF* y *AICR* de 2018 indicó que, aunque se dispone de evidencia convincente o probable sobre la relación entre ciertos factores dietéticos individuales y el riesgo de cáncer colorrectal, las pruebas acerca de la asociación entre los patrones alimentarios y este tipo de cáncer son, por ahora, insuficientes y poco concluyentes (10), posiblemente debido a que es una línea de investigación reciente y serán necesarios más años de seguimiento para valorar dichos efectos. Por otro lado, hasta la fecha la comunidad científica no ha evaluado específicamente el impacto de las alternativas vegetales a la carne con el riesgo de cáncer colorrectal, por motivos similares a los comentados anteriormente. Serán necesarios nuevos estudios para entender los efectos a largo plazo de este cambio en las tendencias alimentarias y su impacto en la salud.

5.5 Fortalezas y limitaciones

Fortalezas

Los artículos presentados en esta tesis representan algunas de las primeras investigaciones que estudian la asociación entre el riesgo de cáncer colorrectal y la ingesta de nitrosilhemo. Estos hallazgos son de gran interés para la comunidad científica que investiga la epidemiología nutricional y el cáncer. El presente trabajo tiene importantes fortalezas que se destacan a continuación.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, esta es la primera vez que los contenidos de hierro hemo y nitrosilhemo se han medido en una gran cantidad de derivados cárnicos empleando el método *HPLC*, proporcionando así datos más precisos para la evaluación del consumo de estos compuestos que los encontrados en la literatura previa para poblaciones europeas. Además, es importante resaltar el diseño del estudio EPIC, que se caracteriza por incluir a un gran número de participantes y por seguirlos durante un extenso período de tiempo. Asimismo, la naturaleza prospectiva del estudio EPIC aborda de manera efectiva los posibles sesgos de selección y memoria, reforzando la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Otra fortaleza es que, para la estimación de la ingesta alimentaria habitual, se llevó a cabo una combinación de métodos que incluyen diferentes cuestionarios dietéticos validados. La ingesta de alimentos y de nutrientes, incluido el consumo de carnes procesadas, se estimó utilizando la base de datos de nutrientes EPIC (*ENDB*, por sus siglas en inglés). A partir de estas estimaciones de ingesta, se calcularon las cantidades de nitrosilhemo y hierro hemo, basándose no sólo en el consumo estimado de carnes procesadas por sujeto, sino que también mediante análisis directos de laboratorio (Método *HPLC*).

Por otro lado, la extrapolación realizada de los niveles de nitrosilhemo en carnes procesadas españolas a carnes procesadas a nivel europeo, representa la primera vez en obtener una estimación del contenido de estos compuestos basados en su determinación a partir de ítems españoles. Hasta el momento, la determinación de este compuesto para su utilización en estudios prospectivos se ha basado en la

multiplicación del hierro hemo por un coeficiente fijo (0.67) para todas las carnes procesadas (221). Teniendo en cuenta las diferencias encontradas respecto a los niveles de este compuesto en los diferentes derivados cárnicos, obtener estimaciones más precisas del contenido de nitrosilhemo en varios tipos de carnes procesadas según el país, podría conducir a estimaciones más exactas del riesgo en futuros estudios epidemiológicos.

La extrapolación abarca una gran variedad de derivados cárnicos procesados consumidos en diferentes países europeos. De esta manera, cabe señalar que, dado que el objetivo era obtener datos representativos confiables para estimar la ingesta utilizando registros dietéticos obtenidos en los años 90, se tuvieron en cuenta aspectos que podrían afectar la representatividad de las muestras actuales, como cambios en ingredientes o procesamiento. Es importante señalar que muchos de estos productos son tradicionales y, según nuestra comprensión, han mantenido una estabilidad notable a lo largo de las décadas. Por ejemplo, se espera que los métodos de elaboración de jamones curados en seco apenas hayan cambiado, ya que implican simplemente la salazón de piezas enteras de músculo. Actualmente, el control y seguimiento del procesamiento de estos productos es más preciso y uniforme, mejorando la calidad y reduciendo pérdidas. Sin embargo, el producto en sí sigue siendo el mismo. Estas aproximaciones podrían ser utilizadas en cohortes de otros países, más grandes o heterogéneas.

Limitaciones

Es importante tener en cuenta que los artículos mencionados en esta tesis tienen limitaciones específicas que han sido discutidas en cada uno de ellos. No obstante, en esta sección se ofrece un resumen de las limitaciones más relevantes.

La principal limitación radica en la sensibilidad del nitrosilhemo y el hierro hemo a una variedad de factores durante su formación y composición. Esto impacta en la precisión de los resultados y la fiabilidad de las estimaciones, dificultando la evaluación exacta de su concentración y su papel en procesos fisiológicos o patológicos. Esta variabilidad puede ser atribuida a diversos aspectos: Por un lado, el tipo de animal y el músculo utilizado. Los productos elaborados con carne roja no son iguales que los elaborados

con carne blanca en términos de contenido de nitrosilhemo, donde pueden surgir diferencias debido al uso de carne de res (más rica en proteínas de hemo), en lugar de carne de cerdo.

Por otro lado, las condiciones de procesamiento y almacenamiento desempeñan un papel importante. Por ejemplo, el método de cocción, especialmente la temperatura a la que se somete el producto, así como el tiempo de exposición, la exposición a la oxigenación durante el proceso, y las condiciones de conservación y transporte, también pueden afectar a estos compuestos. Respecto al ahumado al que se someten algunos de estos derivados cárnicos, es la temperatura la que puede propiciar el aumento de nitrosilación. En este sentido, esto sucedería en aquellos derivados cárnicos sometidos a un ahumado tradicional. Para aquellos derivados cárnicos sometidos a ahumados líquidos aromatizados (más comúnmente utilizados en la actualidad), este aumento de nitrosilación no sucedería debido a que no alcanzan temperaturas elevadas y, por ende, no favorecen este proceso. Sin embargo, este estudio no dispone de un porcentaje exacto de productos analizados sometidos a ahumado tradicional frente al ahumado líquido, lo que representa una limitación.

Es importante destacar que el nitrosilhemo puede encontrarse en cantidades considerables en diversos derivados cárnicos, incluso sin la adición de nitrito como aditivo, lo que resalta aún más la influencia de las condiciones de producción en la formación de este compuesto. Además, considerando que los análisis se llevaron a cabo específicamente en derivados cárnicos de origen español, sería apropiado replicar estas evaluaciones en muestras de carnes procesadas típicas/tradicionales de diversas procedencias geográficas para corroborar y enriquecer los resultados.

Por otro lado, debido a que el estudio EPIC es de naturaleza observacional, no se puede descartar la posibilidad de que haya factores adicionales que influyan en los resultados y que no hayan sido considerados. Asimismo, el estudio EPIC se basó en un muestreo no representativo de la población general europea. Por lo tanto, estos resultados no se pueden extrapolar a grupos de personas de diferentes orígenes étnicos o geográficos.

Además, las variables de dieta y de estilo de vida se midieron sólo al inicio; por lo que no se pudieron evaluar los cambios durante el seguimiento de más de 15 años. Preferiblemente, se deberían haber tomado varias mediciones a intervalos regulares hasta el desarrollo del cáncer, ya que pueden verse alteradas según las condiciones individuales específicas. Sin embargo, al evaluar la dieta antes del período entre el inicio del cáncer y su diagnóstico, es más probable que la información dietética refleje la ventana de tiempo etiológica que presumimos precede al inicio de la enfermedad. En este sentido, se realizaron análisis de sensibilidad excluyendo los primeros tres y cinco años de seguimiento, pero los resultados se mantuvieron sin cambio.

Otra limitación importante radica en la extrapolación del nitrosilhemo de carnes procesadas españolas a europeas. Aunque se procuró establecer la mayor correspondencia posible entre los ítems de cada país, las diferencias en los procesos de producción, los ingredientes utilizados y las preferencias culinarias en diversos países europeos constituyen una limitación significativa. Estos factores resaltan nuevamente la variabilidad de estos compuestos y subrayan la importancia de replicar estos análisis en carnes procesadas típicas/tradicionales de otros países europeos para obtener resultados más representativos y generalizables.

5.6 Aportaciones, aplicabilidad y líneas de investigación futura

Esta tesis doctoral proporciona datos fiables sobre el contenido de nitrosilhemo y hierro hemo en una gran cantidad y variedad de carnes procesadas. Además, aporta evidencia relevante y novedosa a nivel epidemiológico en relación entre su ingesta y el riesgo de cáncer colorrectal.

Hasta el momento, en la mayoría de los estudios epidemiológicos, la ingesta de carnes procesadas se clasificaba según el tratamiento recibido (productos crudos-curados y productos tratados por el calor). Sin embargo, los mismos no solían considerar los ingredientes o aditivos utilizados, ni algunos tratamientos que podrían generar productos potencialmente cancerígenos, como el ahumado o la fritura. Mediante la medición del contenido de nitrosilhemo y hierro hemo en carnes procesadas, esta tesis aporta nueva evidencia sobre los niveles de estos compuestos en los diferentes

derivados cárnicos. Estas determinaciones facilitarán la realización de estudios más específicos, los cuales podrán ayudar a comprender mejor los mecanismos implicados detrás de la posible asociación entre los diferentes tipos de cáncer asociados al consumo de carnes procesadas, como el cáncer colorrectal (257), el cáncer gástrico (258) y el cáncer de páncreas (259), entre otras patologías. Además, permitirán establecer una definición más precisa de las carnes procesadas para futuros estudios y servir como base para futuras investigaciones.

A partir de los resultados expuestos en esta tesis, identificamos varios puntos importantes en los que sería relevante profundizar para investigaciones futuras:

- El metabolismo y la regulación del hierro es un mecanismo complejo en el que intervienen diversos factores, por lo que nuevos estudios que incluyan información relevante y complementaria sobre la interacción entre el nitrosilhemo y el hierro hemo con otros compuestos y alimentos, así como aspectos vinculados al horario y ocasión de ingesta, permitirían profundizar estos hallazgos.
- La variabilidad observada en el nitrosilhemo y el hierro hemo en las carnes procesadas, incluso entre productos similares, subraya la importancia de llevar a cabo más determinaciones sobre los niveles de estos compuestos en los derivados cárnicos. Además, es importante realizar estas determinaciones en productos cárnicos tradicionales de diversas regiones geográficas con la finalidad de obtener datos más representativos. Asimismo, sería de especial interés utilizar el método *HPLC*, el cual ha demostrado proporcionar evaluaciones más precisas.
- Gracias a la colaboración con la Universidad de Plymouth, Inglaterra, adquirí conocimientos y colaboré en estudios centrados en la determinación de nitratos y nitritos en alimentos mediante la técnica de *HPLC*. Teniendo en cuenta la evidencia sobre el papel de los nitratos/nitritos en los tumores gastrointestinales, así como en otras patologías, profundizar en este aspecto podría abrir una futura línea de investigación sobre la exposición de estos

compuestos en la población, contribuyendo a mejorar la precisión de los datos recopilados y, a seguir estudiando su impacto en la salud para establecer recomendaciones dietéticas.

- Para lograr una generalización de los hallazgos a la población en su conjunto, es determinante realizar estudios prospectivos amplios y heterogéneos, abriendo la posibilidad de explorar nuevos métodos para la evaluación de la ingesta dietética de estos compuestos, incluyendo el uso de biomarcadores. Estos estudios deberán incluir participantes de distintas regiones geográficas y patrones alimentarios, ya que las investigaciones previas se han centrado principalmente en individuos de ascendencia europea blanca con dietas y hábitos de estilo de vida relativamente similares.
- Considerando las nuevas tendencias alimentarias, surge la necesidad de explorar su asociación de los *PBMAs* y otros productos ultraprocesados de origen vegetal con el riesgo del cáncer colorrectal. Esto podría abrir una nueva línea de investigación entre nuevos factores de riesgo y este tipo de cáncer. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios que se desarrollarán en un futuro próximo ya que son necesarios periodos de seguimiento más largos y donde los métodos de recogida de dieta sean actualizados e incluyan preguntas sobre el consumo de estos nuevos alimentos.

Dado que las carnes procesadas abarcan un grupo amplio y heterogéneo, que a menudo no se registra adecuadamente en los cuestionarios alimentarios, es evidente la necesidad de profundizar en este campo de investigación. Esto es importante no solo desde el punto de vista etiológico, sino también para que la evidencia se traduzca en recomendaciones dietéticas de prevención del cáncer específicas y claras para la población.

6. CONCLUSIONS



6. CONCLUSIONS

The main conclusions are:

Conclusion I:

The *HPLC* method provides more accurate measurements of nitrosyl-heme and heme iron than the Hornsey method, which may lead to an overestimation of heme compounds due to the potential interference of substances such as Zn-protoporphyrin or paprika.

Conclusion II:

The observed variability in nitrosyl-heme and heme iron in processed meats, even among similar products, supports the idea that formulation, processing, and storage conditions can be determining factors.

Conclusion III:

Intakes of nitrosyl-heme and heme iron vary according to different sociodemographic and lifestyle variables, such as sex, study centre, energy intake, and educational level.

Conclusion IV:

Our results did not show evidence supporting a relationship between the intake of nitrosyl-heme and heme iron from processed meats and the risk of colorectal cancer in EPIC study subjects.

No significant associations were observed when analysing tumour subtypes, and there was no effect modification by other variables relevant to colorectal cancer such as dietary fibre, calcium, alcohol and energy intake, physical activity levels, sex, BMI, or smoking status. However, although statistical significance was not achieved, some trends were observed in relation to sex and tumour location that may warrant further investigation.

Given the limited current evidence on this topic and the plausibility of the biological mechanism between nitrosyl-heme and colorectal cancer, more extensive research is needed. Such research should include direct measurements of nitrosyl-heme levels in typical/traditional processed meats for each country, as well as repeated measurements and information on the timing of intake, in order to obtain more comprehensive and representative results. In addition, it would be valuable to identify biomarkers of their consumption. These combined strategies will contribute to providing stronger evidence on the role of nitrosyl-heme in colorectal carcinogenesis.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones son:

Conclusión I:

El método *HPLC* ofrece mediciones de nitrosilhemo y hierro hemo más precisas que el método de *Hornsey*, el cual puede conducir a una sobreestimación de los compuestos de hemo por la posible interferencia de compuestos como Cinc-protoporfirinas o pimentón/paprika.

Conclusión II:

La variabilidad observada en el nitrosilhemo y el hierro hemo en las carnes procesadas, incluso entre productos similares, refuerza la idea de que la formulación, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento pueden ser factores determinantes.

Conclusión III:

Las ingestas de nitrosilhemo y hierro hemo varían según diferentes variables sociodemográficas y de estilo de vida, tales como el sexo, centro, energía y el nivel educativo.

Conclusión IV:

Los resultados de nuestro estudio no mostraron evidencia que respalde una relación entre la ingesta de nitrosilhemo y hierro hemo de las carnes procesadas con el riesgo de cáncer colorrectal en sujetos del estudio EPIC.

Tampoco se observaron asociaciones significativas cuando se analizaron los subtipos tumorales, ni la modificación del efecto de otras variables relevantes para el cáncer colorrectal, como el consumo de fibra, calcio, alcohol, ingesta energética, niveles de actividad física, sexo, IMC o hábito de fumar. A pesar de ello, y aunque no obtuvieron significación estadística, en algunos casos se observaron algunas tendencias con respecto al sexo y localización tumoral, que podrían requerir mayor investigación.

Dado que la evidencia actual sobre este tema es limitada y la plausibilidad del mecanismo biológico entre el nitrosilhemio y el cáncer colorrectal, se requieren investigaciones más exhaustivas. Estas investigaciones deberían incluir mediciones directas de los niveles de nitrosilhemio en las carnes procesadas típicas/tradicionales de cada país, así como mediciones repetidas e información sobre el horario de ingesta, con el fin de obtener resultados más completos y representativos. Además, sería interesante contar con la identificación de biomarcadores del consumo de las mismas. Estas estrategias combinadas contribuirán a aportar una evidencia más sólida sobre el rol del nitrosilhemio en la carcinogénesis colorrectal.

7. BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Centelles JJ. General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol.* 2012;2012:139268.
2. SEER Training. Types of Colorectal Cancer [Internet]. [cited 2024 Aug 5]. Available from: <https://training.seer.cancer.gov/colorectal/intro/types.html>
3. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract.* 2011 May;61(586):e231-243.
4. Bland KI, Sarr MG, Büchler MW, Csendes A, Garden OJ, Wong J. General Surgery: Principles and International Practice [Internet]. 2nd ed. London: Springer Science & Business Media; 2008 [cited 2009 Aug 5]. 2068 p. Available from: <https://cirugiabarrosluco.wordpress.com/wp-content/uploads/2013/03/general-surgery-2nd-ed.pdf>
5. Wu X, Wang J, Ye Z, Wang J, Liao X, Liv M, et al. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Irritable Bowel Syndrome: A Meta-Analysis of Population-Based Observational Studies. *Front Med.* 2022 Mar 2;9:819122.
6. Cancer Today [Internet]. [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today/>
7. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 19;18(1):197.
8. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2044–58.
9. Colorectal Cancer Risk Factors | Hereditary Colorectal Risk Factors | American Cancer Society [Internet]. [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
10. World Cancer Research Fund AI for CR. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. Continuous Update Project Expert Report 2018 [Internet]. [cited 2023 Aug 21]. Available from: dietandcancerreport.org
11. Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA, Scrol A, Piper M, Williams MS, et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2015 Sep;17(9):702–12.
12. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5783–8.
13. Sinicrope FA. Lynch Syndrome—Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Aug 23;379(8):764–73.
14. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015 | Nature Reviews Cancer [Internet]. [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3878>

15. Kalady MF, McGannon E, Vogel JD, Manilich E, Fazio VW, Church JM. Risk of Colorectal Adenoma and Carcinoma After Colectomy for Colorectal Cancer in Patients Meeting Amsterdam Criteria. *Ann Surg.* 2010 Sep;252(3):507.
16. He DG, Chen XJ, Huang JN, Chen JG, Lv MY, Huang TZ, et al. Increased risk of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease patients with post-inflammatory polyps: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastrointest Oncol.* 2022 Jan 15;14(1):348–61.
17. Lauricella S, Fabris S, Sylla P. Colorectal cancer risk of flat low-grade dysplasia in inflammatory bowel disease: a systematic review and proportion meta-analysis. *Surg Endosc.* 2023 Jan;37(1):48–61.
18. Botteri E, Borroni E, Sloan EK, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, et al. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol.* 2020 Dec;115(12):1940–9.
19. Korsgaard M, Pedersen L, Sørensen HT, Laurberg S. Reported symptoms, diagnostic delay and stage of colorectal cancer: a population-based study in Denmark. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* 2006 Oct;8(8):688–95.
20. John SKP, George S, Primrose JN, Fozard JBJ. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* 2011 Jan;13(1):17–25.
21. Crosland A, Jones R. Rectal bleeding: prevalence and consultation behaviour. *BMJ.* 1995 Aug 19;311(7003):486–8.
22. Silman AJ, Mitchell P, Nicholls RJ, Macrae FA, Leicester RJ, Bartram CI, et al. Self-reported dark red bleeding as a marker comparable with occult blood testing in screening for large bowel neoplasms. *Br J Surg.* 1983 Dec;70(12):721–4.
23. Summerton N, Mann S, Sutton J, Rigby A, Theakston A, Clark J, et al. Developing clinically relevant and reproducible symptom-defined populations for cancer diagnostic research in general practice using a community survey. *Fam Pract.* 2003 Jun;20(3):340–6.
24. Selvachandran SN, Hodder RJ, Ballal MS, Jones P, Cade D. Prediction of colorectal cancer by a patient consultation questionnaire and scoring system: a prospective study. *Lancet Lond Engl.* 2002 Jul 27;360(9329):278–83.
25. Chaplin A, Curless R, Thomson R, Barton R. Prevalence of lower gastrointestinal symptoms and associated consultation behaviour in a British elderly population determined by face-to-face interview. *Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract.* 2000 Oct;50(459):798–802.
26. Logan E, Yates J, Stewart R, Fielding K, Kendrick D. Investigation and management of iron deficiency anaemia in general practice: a cluster randomised controlled trial of a simple management prompt. *Postgrad Med J.* 2002 Sep;78(923):533–7.
27. Yates JM, Logan ECM, Stewart RM. Iron deficiency anaemia in general practice: clinical outcomes over three years and factors influencing diagnostic investigations. *Postgrad Med J.* 2004 Jul;80(945):405–10.

28. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*. 2021 Feb 16;325(7):669–85.
29. Buccafusca G, Proserpio I, Tralongo AC, Rametta Giuliano S, Tralongo P. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Apr 1;136:20–30.
30. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. [Internet]. 2017 [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer-facts-and-statistics>
31. Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, et al. Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EURO CARE study. *Int J Cancer*. 2012;131(7):1649–58.
32. Araghi M, Arnold M, Rutherford MJ, Guren MG, Cabasag CJ, Bardot A, et al. Colon and rectal cancer survival in seven high-income countries 2010–2014: variation by age and stage at diagnosis (the ICBP SURVMARK-2 project). *Gut*. 2021 Jan 1;70(1):114–26.
33. SEER. Cancer of the colon and rectum— Cancer Stat Facts [Internet]. [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
34. Global, regional, and national lifetime risks of developing and dying from gastrointestinal cancers in 185 countries: a population-based systematic analysis of GLOBOCAN - PubMed [Internet]. [cited 2024 Feb 8]. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00366-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00366-7)
35. Observatorio Del Cáncer de La Asociación Española Contra El Cáncer (AECC) [Internet]. [cited 2023 Jun 28]. Available from: <https://observatorio.contraelcancer.es/>
36. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002 Dec;31(4):925–43.
37. Roncucci L, Mariani F. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *Eur J Intern Med*. 2015 Dec 1;26(10):752–6.
38. Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JY, Young GP, et al. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*. 2015 Oct;64(10):1637–49.
39. Lauby-Secretan B, Vilahur N, Bianchini F, Guha N, Straif K. The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2018 May 3;378(18):1734–40.
40. Coin CG, Wollett FC, Coin JT, Rowland M, DeRamos RK, Dandrea R. Computerized radiology of the colon: a potential screening technique. *Comput Radiol Off J Comput Tomogr Soc*. 1983;7(4):215–21.
41. Murphy CC, Zaki TA. Changing epidemiology of colorectal cancer — birth cohort effects and emerging risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024 Jan;21(1):25–34.
42. Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de colon: Epidemiología [Internet]. [cited 2024 Aug 6]. Available from: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/epidemiologia-cancer-colon>

43. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
44. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017 Apr;66(4):683–91.
45. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterol.* 2019;14(2):89–103.
46. Jiang Y, Yuan H, Li Z, Ji X, Shen Q, Tuo J, et al. Global pattern and trends of colorectal cancer survival: a systematic review of population-based registration data. *Cancer Biol Med.* 2022 Feb 15;19(2):175–86.
47. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol.* 2021 Oct 1;14(10):101174.
48. OECD/European Union (2018). OECD Publishing. [cited 2023 Aug 17]. Health at a Glance: Europe 2018: State of Health in the EU Cycle. Available from: https://read.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-europe-2018_health_glance_eur-2018-en
49. Asociación Española Contra el Cáncer. Pronóstico del cáncer de colon [Internet]. [cited 2024 Aug 6]. Available from: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/evolucion-cancer-colon>
50. Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de recto: Pronóstico [Internet]. [cited 2024 Aug 6]. Available from: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-recto/pronostico>
51. El cáncer en cifras | SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica [Internet]. [cited 2023 Aug 17]. Available from: <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
52. World Health Organization (WHO). Cáncer colorrectal [Internet]. [cited 2024 Aug 6]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
53. International Agency for Research on Cancer. (IARC Working Group). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat [Internet]. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum; 2015 [cited 2022 Aug 22]. Report No.: Volume 114. Available from: www.thelancet.com/oncology
54. Meat, fish, dairy and cancer risk [Internet]. WCRF International. [cited 2023 Aug 17]. Available from: <https://www.wcrf.org/risk-factors/meat-fish-dairy-and-cancer-risk/>
55. Abid Z, Cross AJ, Sinha R. Meat, dairy, and cancer. *Am J Clin Nutr.* 2014 Jul;100 Suppl 1(1):386S–93S.
56. Seyyedsalehi MS, Mohebbi E, Tourang F, Sasanfar B, Boffetta P, Zendehdel K. Association of Dietary Nitrate, Nitrite, and N-Nitroso Compounds Intake and Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Toxics.* 2023 Feb;11(2):190.

57. Physical activity and cancer risk [Internet]. WCRF International. [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/risk-factors/physical-activity-and-cancer-risk/>
58. Markozannes G, Becerra-Tomás N, Cariolou M, Balducci K, Vieira R, Kiss S, et al. Post-diagnosis physical activity and sedentary behaviour and colorectal cancer prognosis: A Global Cancer Update Programme (CUP Global) systematic literature review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2024 Aug 1;155(3):426–44.
59. Regmi S, Fu A, Luo KQ. High Shear Stresses under Exercise Condition Destroy Circulating Tumor Cells in a Microfluidic System. *Sci Rep*. 2017 Jan 5;7:39975.
60. Bendinelli B, Palli D, Assedi M, Facchini L, Grioni S, Agnoli C, et al. Alcohol, smoking and rectal cancer risk in a Mediterranean cohort of adults: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Italy cohort. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Apr;32(4):475–83.
61. Murphy N, Ward HA, Jenab M, Rothwell JA, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F, et al. Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2019 Jun;17(7):1323-1331.e6.
62. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med*. 2014 Oct 10;12:168.
63. Eussen SJPM, Vollset SE, Igland J, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, et al. Plasma folate, related genetic variants, and colorectal cancer risk in EPIC. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2010 May;19(5):1328–40.
64. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007 Nov 1;121(9):2065–72.
65. Park JY, Mitrou PN, Dahm CC, Luben RN, Wareham NJ, Khaw KT, et al. Baseline alcohol consumption, type of alcoholic beverage and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Norfolk study. *Cancer Epidemiol*. 2009 Nov;33(5):347–54.
66. Breau G, Ellis U. Risk Factors Associated With Young-Onset Colorectal Adenomas and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Research. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent*. 2020;27(1):1073274820976670.
67. Puzzono M, Mannucci A, Grannò S, Zuppardo RA, Galli A, Danese S, et al. The Role of Diet and Lifestyle in Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cancers*. 2021 Nov 25;13(23):5933.
68. O’Sullivan DE, Sutherland RL, Town S, Chow K, Fan J, Forbes N, et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2022 Jun;20(6):1229-1240.e5.

69. Grucza RA, Sher KJ, Kerr WC, Krauss MJ, Lui CK, McDowell YE, et al. Trends in Adult Alcohol Use and Binge Drinking in the Early 21st-Century United States: A Meta-Analysis of 6 National Survey Series. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018 Oct;42(10):1939–50.
70. Bulloch AGM, Williams JVA, Lavorato DH, Patten SB. Trends in binge drinking in Canada from 1996 to 2013: a repeated cross-sectional analysis. *CMAJ Open*. 2016;4(4):E599–604.
71. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Aug;7(8):599–612.
72. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc*. 2006 Aug;65(3):278–90.
73. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol*. 2003;27(4):277–84.
74. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006 Feb;7(2):149–56.
75. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Sep 6;87(17):1297–302.
76. Obesity, weight gain and cancer risk [Internet]. WCRF International. [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/risk-factors/obesity-weight-gain-and-cancer/>
77. Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med*. 2010;61:301–16.
78. Aleksandrova K, Nimptsch K, Pischon T. Influence of Obesity and Related Metabolic Alterations on Colorectal Cancer Risk. *Curr Nutr Rep*. 2013 Mar 1;2(1):1–9.
79. Height and birthweight and cancer risk [Internet]. WCRF International. [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/risk-factors/height-and-birthweight-and-cancer-risk/>
80. Zhou E, Wang L, Santiago CN, Nanavati J, Rifkin S, Spence E, et al. Adult-Attained Height and Colorectal Cancer Risk: A Cohort Study, Systematic Review, and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2022 Apr 1;31(4):783–92.
81. Wholegrains, vegetables, fruit and cancer risk [Internet]. WCRF International. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.wcrf.org/risk-factors/wholegrains-vegetables-fruit-and-cancer-risk/>
82. Kyrø C, Olsen A, Landberg R, Skeie G, Loft S, Åman P, et al. Plasma Alkylresorcinols, Biomarkers of Whole-Grain Wheat and Rye Intake, and Incidence of Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2013 Dec 7;106(1):djt352.
83. Marventano S, Vetrani C, Vitale M, Godos J, Riccardi G, Grosso G. Whole Grain Intake and Glycaemic Control in Healthy Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2017 Jul 19;9(7):769.

84. Gråsten SM, Juntunen KS, Mykkänen HM, Poutanen KS, Gylling HK, Miettinen TA. Rye Bread Improves Bowel Function and Decreases the Concentrations of Some Compounds That Are Putative Colon Cancer Risk Markers in Middle-Aged Women and Men. *J Nutr*. 2000 Sep 1;130(9):2215–21.
85. Bingham SA. Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proc Nutr Soc*. 1990 Jul;49(2):153–71.
86. Slavin JL. Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J Am Coll Nutr*. 2000 Jun;19(3 Suppl):300S–307S.
87. Pi-Sunyer X. Do glycemic index, glycemic load, and fiber play a role in insulin sensitivity, disposition index, and type 2 diabetes? *Diabetes Care*. 2005 Dec;28(12):2978–9.
88. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jul 7;96(13):1015–22.
89. Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Jan;57(1):1–17.
90. Guéguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr*. 2000 Apr;19(2 Suppl):119S–136S.
91. Buzinaro EF, Almeida RNA de, Mazeto GMFS. [Bioavailability of dietary calcium]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Oct;50(5):852–61.
92. Agudo A. Consumo de carne y riesgo de cáncer [Internet]. *Mejor Sin Cáncer*. 2015 [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://mejorsincancer.org/2015/11/05/consumo-de-carne-y-riesgo-de-cancer/>
93. Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res*. 2003 May 15;63(10):2358–60.
94. Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2004;44(1):44–55.
95. Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G, Ng SW, Popkin B. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2013 Nov;14 Suppl 2:21–8.
96. Srour B, Fezeu LK, Kesse-Guyot E, Allès B, Debras C, Druesne-Pecollo N, et al. Ultraprocessed Food Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Among Participants of the NutriNet-Santé Prospective Cohort. *JAMA Intern Med*. 2020 Feb 1;180(2):283–91.
97. Laake I, Thune I, Selmer R, Tretli S, Slattery ML, Veierød MB. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of cancer in the proximal and distal colon. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2010 Jun;19(6):1511–22.

98. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaïss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014 Oct;514(7521):181–6.
99. Viennois E, Merlin D, Gewirtz AT, Chassaing B. Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017 Jan 1;77(1):27–40.
100. WHO/IARC. List of Classifications. 1994 [cited 2024 Aug 6]. List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Available from: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
101. Authority (EFSA) EFS, Benford D, Bignami M, Chipman JK, Ramos Bordajandi L. Assessment of the genotoxicity of acrylamide. *EFSA J*. 2022;20(5):e07293.
102. Meine GC, Picon RV, Espírito Santo PA, Sander GB. Ultra-Processed Food Consumption and Gastrointestinal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*. 2024 Jun 1;119(6):1056–65.
103. Shu L, Huang Y, Si C, Zhu Q, Zheng P, Zhang X. Association between ultra-processed food intake and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Nutr*. 2023;10:1170992.
104. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Hoffmann G, Knüppel S, Laure Preterre A, Iqbal K, et al. Food groups and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2018 May 1;142(9):1748–58.
105. Mansfield R. Could you eat 30 plant-based foods a week? [Internet]. World Cancer Research Fund. 2021 [cited 2024 Aug 5]. Available from: <https://www.wcrf-uk.org/our-blog/could-you-eat-30-plant-based-foods-each-week/>
106. Chen Z, Wang PP, Woodrow J, Zhu Y, Roebbothan B, McLaughlin JR, et al. Dietary patterns and colorectal cancer: results from a Canadian population-based study. *Nutr J*. 2015 Jan 15;14:8.
107. Bernstein AM, Song M, Zhang X, Pan A, Wang M, Fuchs CS, et al. Processed and Unprocessed Red Meat and Risk of Colorectal Cancer: Analysis by Tumor Location and Modification by Time. *PloS One*. 2015;10(8):e0135959.
108. Gaesser GA. Whole Grains, Refined Grains, and Cancer Risk: A Systematic Review of Meta-Analyses of Observational Studies. *Nutrients*. 2020 Dec 7;12(12):3756.
109. Tabung FK, Brown LS, Fung TT. Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Review of 17 Years of Evidence (2000-2016). *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2017 Dec;13(6):440–54.
110. Hopwood CJ, Bleidorn W, Schwaba T, Chen S. Health, environmental, and animal rights motives for vegetarian eating. *PloS One*. 2020;15(4):e0230609.
111. De Backer CJS, Hudders L. From meatless Mondays to meatless Sundays: motivations for meat reduction among vegetarians and semi-vegetarians who mildly or significantly reduce their meat intake. *Ecol Food Nutr*. 2014;53(6):639–57.
112. Treich N. Cultured Meat: Promises and Challenges. *Environ Resour Econ*. 2021;79(1):33–61.

113. Gerhardt, C., F. ZiemBen, M. Warschun et al. How Will Cultivated Meat and Meat Alternatives Disrupt the Agricultural and Food Industry? In Kearney, Chicago. [Internet]. EN, Chicago; 2019 [cited 2024 Aug 6]. Available from: [kearney.com](https://www. Kearney.com)
114. Guan X, Lei Q, Yan Q, Li X, Zhou J, Du G, et al. Trends and ideas in technology, regulation and public acceptance of cultured meat. *Future Foods*. 2021 Mar 1;3:100032.
115. Martínez-González MA, Sánchez-Tainta A, Corella D, Salas-Salvadó J, Ros E, Arós F, et al. A provegetarian food pattern and reduction in total mortality in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *Am J Clin Nutr*. 2014 Jul;100 Suppl 1:320S-8S.
116. Llaha F, Gil-Lespinard M, Unal P, de Villasante I, Castañeda J, Zamora-Ros R. Consumption of Sweet Beverages and Cancer Risk. A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2021 Feb 4;13(2):516.
117. Joh HK, Lee DH, Hur J, Nimptsch K, Chang Y, Joung H, et al. Simple Sugar and Sugar-Sweetened Beverage Intake During Adolescence and Risk of Colorectal Cancer Precursors. *Gastroenterology*. 2021 Jul;161(1):128-142.e20.
118. Hur J, Otegbeye E, Joh HK, Nimptsch K, Ng K, Ogino S, et al. Sugar-sweetened beverage intake in adulthood and adolescence and risk of early-onset colorectal cancer among women. *Gut*. 2021 Dec;70(12):2330–6.
119. Satija A, Bhupathiraju SN, Rimm EB, Spiegelman D, Chiuve SE, Borgi L, et al. Plant-Based Dietary Patterns and Incidence of Type 2 Diabetes in US Men and Women: Results from Three Prospective Cohort Studies. *PLoS Med*. 2016 Jun;13(6):e1002039.
120. Wang DD, Li Y, Nguyen XMT, Song RJ, Ho YL, Hu FB, et al. Degree of Adherence to Based Diet and Total and Cause-Specific Mortality: Prospective Cohort Study in the Million Veteran Program. *Public Health Nutr*. 2022 Mar 21;1–38.
121. Liu F, Lv Y, Peng Y, Qiao Y, Wang P, Si C, et al. Plant-based dietary patterns, genetic predisposition and risk of colorectal cancer: a prospective study from the UK Biobank. *J Transl Med*. 2023 Sep 27;21(1):669.
122. Wu B, Zhou RL, Ou QJ, Chen YM, Fang YJ, Zhang CX. Association of plant-based dietary patterns with the risk of colorectal cancer: a large-scale case-control study. *Food Funct*. 2022 Oct 17;13(20):10790–801.
123. Rizzolo-Brime L, Orta-Ramirez A, Puyol Martin Y, Jakszyn P. Nutritional Assessment of Plant-Based Meat Alternatives: A Comparison of Nutritional Information of Plant-Based Meat Alternatives in Spanish Supermarkets. *Nutrients*. 2023 Mar 8;15(6):1325.
124. Romão B, Botelho RBA, Nakano EY, Raposo A, Han H, Vega-Muñoz A, et al. Are Vegan Alternatives to Meat Products Healthy? A Study on Nutrients and Main Ingredients of Products Commercialized in Brazil. *Front Public Health*. 2022 May 27;10:900598.
125. Curtain F, Grafenauer S. Plant-Based Meat Substitutes in the Flexitarian Age: An Audit of Products on Supermarket Shelves. *Nutrients* [Internet]. 2019 Oct 30 [cited 2021 Apr 6];11(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893642/>

126. European Commission. Colorectal cancer | Knowledge for policy [Internet]. [cited 2023 Aug 21]. Available from: https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/colorectal-cancer_en
127. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Med Kaunas Lith*. 2023 Sep 12;59(9):1646.
128. World Health Organization (WHO). Colorectal cancer, risk factors [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
129. Glover M, Mansoor E, Panhwar M, Parasa S, Cooper GS. Epidemiology of Colorectal Cancer in Average Risk Adults 20-39 Years of Age: A Population Based National Study. *Dig Dis Sci*. 2019 Dec;64(12):3602–9.
130. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28:iv22–40.
131. Tom CM, Mankarious MM, Jeganathan NA, Deutsch M, Koltun WA, Berg AS, et al. Characteristics and Outcomes of Right- Versus Left-Sided Early-Onset Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2023 Apr 1;66(4):498–510.
132. Gunter MJ, Alhomoud S, Arnold M, Brenner H, Burn J, Casey G, et al. Meeting report from the joint IARC-NCI international cancer seminar series: a focus on colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Apr 1;30(4):510–9.
133. Colorectal Cancer Rates Higher in African Americans, Rising in Younger People | American Cancer Society [Internet]. [cited 2023 Aug 21]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/latest-news/colorectal-cancer-rates-higher-in-african-americans-rising-in-younger-people.html>
134. Carethers JM. Racial and ethnic disparities in colorectal cancer incidence and mortality. *Adv Cancer Res*. 2021;151:197–229.
135. Petrick JL, Barber LE, Warren Andersen S, Florio AA, Palmer JR, Rosenberg L. Racial Disparities and Sex Differences in Early- and Late-Onset Colorectal Cancer Incidence, 2001–2018. *Front Oncol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 21];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.734998>
136. Xiao Z, Xiao P, Wang Y, Fang C, Li Y. Risk of cancer in acromegaly patients: An updated meta-analysis and systematic review. *PloS One*. 2023;18(11):e0285335.
137. Gini A, Zauber AG, Cenin DR, Omidvari AH, Hempstead SE, Fink AK, et al. Cost Effectiveness of Screening Individuals With Cystic Fibrosis for Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2018 Feb;154(3):556–567.e18.
138. Chen Z, Yu C, Li Z. The effect of cholecystectomy on the risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Laparosc Endosc Robot Surg*. 2023 Dec 1;6(4):134–41.

139. Wong CS, Harwood AR, Cummings BJ, Keane TJ, Thomas GM, Rider WD. Total abdominal irradiation for cancer of the colon. *Radiother Oncol*. 1984 Oct 1;2(3):209–14.
140. Sninsky JA, Shore BM, Lupu GV, Crockett SD. Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2022 Apr;32(2):195–213.
141. Goto A, Yamaji T, Sawada N, Momozawa Y, Kamatani Y, Kubo M, et al. Diabetes and cancer risk: A Mendelian randomization study. *Int J Cancer*. 2020 Feb 1;146(3):712–9.
142. Murphy N, Song M, Papadimitriou N, Carreras-Torres R, Langenberg C, Martin RM, et al. Associations Between Glycemic Traits and Colorectal Cancer: A Mendelian Randomization Analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2022 May 9;114(5):740–52.
143. Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Nov;16(11):690–704.
144. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:615056.
145. Wirbel J, Pyl PT, Kartal E, Zych K, Kashani A, Milanese A, et al. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat Med*. 2019 Apr;25(4):679–89.
146. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2021 Dec 11;21(1):1325.
147. Xu HM, Zhao HL, Guo GJ, Xu J, Zhou YL, Huang HL, et al. Characterization of short-chain fatty acids in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2022 Mar 10;22(1):117.
148. Chen HM, Yu YN, Wang JL, Lin YW, Kong X, Yang CQ, et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am J Clin Nutr*. 2013 May;97(5):1044–52.
149. Ocvirk S, Wilson AS, Posma JM, Li JV, Koller KR, Day GM, et al. A prospective cohort analysis of gut microbial co-metabolism in Alaska Native and rural African people at high and low risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*. 2020 Feb 1;111(2):406–19.
150. Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, DeLany JP, Wang M, Newton K, et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jul;98(1):111–20.
151. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review [Internet]. [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311843.2017.1339841>
152. Charles William Jameson. Part 1. Concordance between cancer in humans and in experimental animals. Chapter 7. Polycyclic aromatic hydrocarbons and associated occupational exposures. In: Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis. IARC Scientific Publications. Review from International Agency for Research on Cancer, Lyon (FR); 2021.

153. Cascella M, Bimonte S, Barbieri A, Vecchio V, Caliendo D, Schiavone V, et al. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): An overview on the current state of knowledge. *Infect Agent Cancer*. 2018 Jan 15;13.
154. Corpet DE. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci*. 2011 Nov;89(3):310–6.
155. The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review [Internet]. [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10406638.2014.918550>
156. Duedahl-Olesen L, Ionaş AC. Formation and mitigation of PAHs in barbecued meat - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(13):3553–68.
157. Hamidi EN, Hajeb P, Selamat J, Abdull Razis AF. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their Bioaccessibility in Meat: a Tool for Assessing Human Cancer Risk. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17((1)):15–23.
158. Cheng T, Lam AK, Gopalan V. Diet derived polycyclic aromatic hydrocarbons and its pathogenic roles in colorectal carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Dec 1;168:103522.
159. Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*. 1995 Jan;16(1):39–52.
160. Bashir S, Fezeu LK, Leviatan Ben-Arye S, Yehuda S, Reuven EM, Szabo de Edelenyi F, et al. Association between Neu5Gc carbohydrate and serum antibodies against it provides the molecular link to cancer: French NutriNet-Santé study. *BMC Med*. 2020 Sep 23;18(1):262.
161. Takahashi T, Takano M, Kurebayashi Y, Masuda M, Kawagishi S, Takaguchi M, et al. N-glycolylneuraminic acid on human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess N-glycolylneuraminic acid binding ability. *J Virol*. 2014 Aug;88(15):8445–56.
162. Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4228–37.
163. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid | PNAS [Internet]. [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2131556100>
164. Alisson-Silva F, Kawanishi K, Varki A. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Mol Aspects Med*. 2016 Oct;51:16–30.
165. Okerblom J, Varki A. Biochemical, Cellular, Physiological, and Pathological Consequences of Human Loss of N-Glycolylneuraminic Acid. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2017 Jul 4;18(13):1155–71.
166. Dhar C, Sasnal A, Varki A. From ‘Serum Sickness’ to ‘Xenosialitis’: Past, Present, and Future Significance of the Non-human Sialic Acid Neu5Gc. *Front Immunol*. 2019;10:807.

167. Kawanishi K, Dhar C, Do R, Varki N, Gordts PLSM, Varki A. Human species-specific loss of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase enhances atherosclerosis via intrinsic and extrinsic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Aug 6;116(32):16036–45.
168. Samraj AN, Pearce OMT, Läubli H, Crittenden AN, Bergfeld AK, Banda K, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 13;112(2):542–7.
169. Hedlund M, Padler-Karavani V, Varki NM, Varki A. Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 2;105(48):18936–41.
170. Ishikawa S ichi, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Aug;54(8):1182–91.
171. Hallberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr*. 1981;1:123–47.
172. Cross AJ, Freedman ND, Ren J, Ward MH, Hollenbeck AR, Schatzkin A, et al. Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study. *Am J Gastroenterol*. 2011 Mar;106(3):432–42.
173. Nelson RL. Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr Rev*. 2001 May;59(5):140–8.
174. Bastide NM, Pierre FHF, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2011 Feb;4(2):177–84.
175. Pierre F, Freeman A, Taché S, Van der Meer R, Corpet DE. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10):2711–6.
176. William Lijinsky. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds*. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge University Press, Reissue. 2011. 482 p.
177. Lunn JC, Kuhnle G, Mai V, Frankenfeld C, Shuker DEG, Glen RC, et al. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*. 2007 Mar;28(3):685–90.
178. Tappel A. Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases. *Med Hypotheses*. 2007;68(3):562–4.
179. Hemeryck LY, Van Hecke T, Vossen E, De Smet S, Vanhaecke L. DNA adductomics to study the genotoxic effects of red meat consumption with and without added animal fat in rats. *Food Chem*. 2017 Sep 1;230:378–87.
180. Hemeryck LY, Rombouts C, De Paepe E, Vanhaecke L. DNA adduct profiling of in vitro colonic meat digests to map red vs. white meat genotoxicity. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2018 May;115:73–87.

181. Tricker AR. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 1997 Jun;6(3):226–68.
182. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008;60(2):131–44.
183. Steinberg P. Red Meat-Derived Nitroso Compounds, Lipid Peroxidation Products and Colorectal Cancer. *Foods* [Internet]. 2019 Jul 11 [cited 2021 Apr 6];8(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678524/>
184. Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*. 2001 Jan;22(1):199–202.
185. Bingham SA, Hughes R, Cross AJ. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr*. 2002 Nov;132(11 Suppl):3522S-3525S.
186. Haorah J, Zhou L, Wang X, Xu G, Mirvish SS. Determination of total N-nitroso compounds and their precursors in frankfurters, fresh meat, dried salted fish, sauces, tobacco, and tobacco smoke particulates. *J Agric Food Chem*. 2001 Dec;49(12):6068–78.
187. Lijinsky W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 1999 Jul 15;443(1):129–38.
188. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2010;94:v–vii, 1–412.
189. Oostindjer M, Alexander J, Amdam GV, Andersen G, Bryan NS, Chen D, et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Sci*. 2014 Aug;97(4):583–96.
190. Lopez CM, Dallolio G, Bonilauri P, Rebecchi A. Strategies for Nitrite Replacement in Fermented Sausages and Effect of High Pressure Processing against *Salmonella* spp. and *Listeria innocua*. *Foods Basel Switz*. 2021 Oct 28;10(11):2617.
191. Yildiz G, Oztekin N, Orbay A, Senkal F. Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode. *Food Chem*. 2014;152:245–50.
192. Badea M, Amine A, Benzine M, Curulli A, Moscone D, Lupu A, et al. Rapid and Selective Electrochemical Determination of Nitrite in Cured Meat in the Presence of Ascorbic Acid. *Microchim Acta*. 2004 Jun 1;147(1):51–8.
193. Possible Substitutes for Nitrite - Nitrite Curing of Meat - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2023 Aug 24]. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/10.1002/9780470385081.ch9>
194. Follett JR, Follett RF. Chapter 4 - Utilization and Metabolism of Nitrogen by Humans. In: Follett RF, Hatfield JL, editors. *Nitrogen in the Environment: Sources, Problems and*

- Management [Internet]. Amsterdam: Elsevier Science; 2001 [cited 2024 Aug 6]. p. 65–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444504869500066>
195. Turesky RJ. Mechanistic Evidence for Red Meat and Processed Meat Intake and Cancer Risk: A Follow-up on the International Agency for Research on Cancer Evaluation of 2015. *Chimia*. 2018 Oct 31;72(10):718–24.
 196. Kruger C, Zhou Y. Red meat and colon cancer: A review of mechanistic evidence for heme in the context of risk assessment methodology. *Food Chem Toxicol*. 2018 Aug 1;118:131–53.
 197. Kuhnle GGC, Story GW, Reda T, Mani AR, Moore KP, Lunn JC, et al. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic Biol Med*. 2007 Oct 1;43(7):1040–7.
 198. Joosen AMCP, Lecommandeur E, Kuhnle GGC, Aspinall SM, Kap L, Rodwell SA. Effect of dietary meat and fish on endogenous nitrosation, inflammation and genotoxicity of faecal water. *Mutagenesis*. 2010 May;25(3):243–7.
 199. Dicks AP, Williams DL. Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu²⁺ sources. *Chem Biol*. 1996 Aug;3(8):655–9.
 200. Chiodi H, Mohler JG. Effects of exposure of blood hemoglobin to nitric oxide. *Environ Res*. 1985 Aug;37(2):355–63.
 201. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001 Mar;2(3):149–56.
 202. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadgil AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol*. 2013 May 30;11:118.
 203. Liu X, Zhang Y, Wang Y, Yang M, Hong F, Yang S. Protein Phosphorylation in Cancer: Role of Nitric Oxide Signaling Pathway. *Biomolecules*. 2021 Jul 10;11(7):1009.
 204. Cupid BC, Zeng Z, Singh R, Shuker DEG. Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay. *Chem Res Toxicol*. 2004 Mar;17(3):294–300.
 205. Jakszyn P, Lujan-Barroso L, Agudo A, Bueno-de-Mesquita HB, Molina E, Sanchez MJ, et al. Meat and heme iron intake and esophageal adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Int J Cancer*. 2013;133(11):2744–50.
 206. Battaglia Richi E, Baumer B, Conrad B, Darioli R, Schmid A, Keller U. Health Risks Associated with Meat Consumption: A Review of Epidemiological Studies. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr*. 2015;85(1–2):70–8.
 207. Ma J, Li Q, Fang X, Chen L, Qiang Y, Wang J, et al. Increased total iron and zinc intake and lower heme iron intake reduce the risk of esophageal cancer: A dose-response meta-analysis. *Nutr Res N Y N*. 2018 Nov;59:16–28.

208. Cao H, Wang C, Chai R, Dong Q, Tu S. Iron intake, serum iron indices and risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Sep;26(5).
209. Pierre FHF, Santarelli RL, Allam O, Tache S, Naud N, Gueraud F, et al. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer*. 2010;62(5):567–73.
210. Santarelli RL, Vendeuvre JL, Naud N, Taché S, Guéraud F, Viau M, et al. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2010 Jul;3(7):852–64.
211. Wolk, A. Potential health hazards of eating red meat. *J Intern Med*. 2017 Feb;281(2):106–22.
212. Kostka T, Fohrer J, Guigas C, Briviba K, Seiwert N, Fahrer J, et al. Synthesis and in vitro characterization of the genotoxic, mutagenic and cell-transforming potential of nitrosylated heme. *Arch Toxicol*. 2020 Nov 1;94(11):3911–27.
213. Kongkachuichai R., Napatthalung P., Charoensiri R. Heme and Nonheme Iron Content of Animal Products Commonly Consumed in Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002;15(4):389–98.
214. Cross AJ, Harnly JM, Ferrucci LM, Risch A, Mayne ST, Sinha R. Developing a Heme Iron Database for Meats According to Meat Type, Cooking Method and Doneness Level. *Food Nutr Sci*. 2012 Jun 29;3(7):905–13.
215. He J, Fang A, Yu S, Shen X, Li K. Dietary Nonheme, Heme, and Total Iron Intake and the Risk of Diabetes in Adults: Results From the China Health and Nutrition Survey. *Diabetes Care*. 2020 Apr;43(4):776–84.
216. Luan DC, Li H, Li SJ, Zhao Z, Li X, Liu ZM. Body iron stores and dietary iron intake in relation to diabetes in adults in North China. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31(2):285–6.
217. Borrajo P, Karwowska M, Stasiak DM, Lorenzo JM, Żyśko M, Solska E. Comparison of the Effect of Enhancing Dry Fermented Sausages with *Salvia hispanica* and *Nigella sativa* Seed on Selected Physicochemical Properties Related to Food Safety during Processing. *Appl Sci*. 2021 Jan;11(19):9181.
218. Higuero N, Moreno I, Lavado G, Vidal-Aragón MC, Cava R. Reduction of nitrate and nitrite in Iberian dry cured loins and its effects during drying process. *Meat Sci*. 2020 May 1;163:108062.
219. Higuero N, Ramírez MR, Vidal-Aragón M del C, Cava R. Influence of high-pressure processing and varying concentrations of curing salts on the color, heme pigments and oxidation of lipids and proteins of Iberian dry-cured loins during refrigerated storage. *LWT*. 2022 Apr 15;160:113251.
220. Magrinyà N, Bou R, Rius N, Codony R, Guardiola F. Use of tocopherol extract and different nitrite sources and starter cultures in the production of organic botifarra catalana, a cooked cured sausage. *Food Sci Technol Int*. 2016 Apr 1;22(3):221–34.

221. Bastide N, Morois S, Cadeau C, Kangas S, Serafini M, Gusto G, et al. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2016 Apr;25(4):640–7.
222. Bastide N, Morois S, Cadeau C, Kangas S, Serafini M, Gusto G, et al. Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2016 Apr;25(4):640–7.
223. Jakszyn P, Agudo A, Lujan-Barroso L, Bueno-de-Mesquita HB, Jenab M, Navarro C, et al. Dietary intake of heme iron and risk of gastric cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer*. 2012 Jun 1;130(11):2654–63.
224. Zhang X, Giovannucci EL, Smith-Warner SA, Wu K, Fuchs CS, Pollak M, et al. A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes Control CCC*. 2011 Dec;22(12):1627–37.
225. Aglago EK, Cross AJ, Riboli E, Fedirko V, Hughes DJ, Fournier A, et al. Dietary intake of total, heme and non-heme iron and the risk of colorectal cancer in a European prospective cohort study. *Br J Cancer*. 2023 Apr 12;128(8):1529–40.
226. Rizzolo-Brime L, Farran-Codina A, Bou R, Luján-Barroso L, Quirós JR, Amiano P, et al. Nitrosyl-Heme and Heme Iron Intake from Processed Meats in Subjects from the EPIC-Spain Cohort. *Nutrients*. 2024 Mar 18;16(6):878.
227. Balder HF, Vogel J, Jansen MCJF, Weijenberg MP, van den Brandt PA, Westenbrink S, et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2006 Apr;15(4):717–25.
228. Mohammadzadeh M, Bahrami A, Ghafouri-Taleghani F, Khalesi S, Abdi F, Hejazi E. Dietary iron and the risk of lung cancer. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam-Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr*. 2024 Jun;94(3–4):264–74.
229. Wedekind R, Keski-Rahkonen P, Robinot N, Viallon V, Rothwell JA, Boutron-Ruault MC, et al. Pepper Alkaloids and Processed Meat Intake: Results from a Randomized Trial and the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Cohort. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Apr;65(7):e2001141.
230. Wedekind R, Keski-Rahkonen P, Robinot N, Viallon V, Ferrari P, Engel E, et al. Syringol metabolites as new biomarkers for smoked meat intake. *Am J Clin Nutr*. 2019 Dec 1;110(6):1424–33.
231. Lee DH, Anderson KE, Harnack LJ, Folsom AR, Jacobs DR. Heme iron, zinc, alcohol consumption, and colon cancer: Iowa Women's Health Study. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Mar 3;96(5):403–7.
232. Larsson SC, Adami HO, Giovannucci E, Wolk A. Re: Heme iron, zinc, alcohol consumption, and risk of colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Feb 2;97(3):232–3; author reply 233–234.

233. Fonseca-Nunes A, Jakszyn P, Agudo A. Iron and cancer risk--a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2014 Jan;23(1):12–31.
234. Rizzolo-Brime L, Lujan-Barroso L, Farran-Codina A, Bou R, Lasheras C, Amiano P, et al. Nitrosyl-heme and Heme Iron Intake from Processed Meats and Risk of Colorectal Cancer in the EPIC-Spain Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2024 Jun 3;33(6):854–6.
235. Parmanand BA, Kellingray L, Le Gall G, Basit AW, Fairweather-Tait S, Narbad A. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; an in vitro colonic fermentation study. *J Nutr Biochem*. 2019 May;67:20–7.
236. Finlayson-Trick EC, Fischer JA, Goldfarb DM, Karakochuk CD. The Effects of Iron Supplementation and Fortification on the Gut Microbiota: A Review. *Gastrointest Disord*. 2020 Dec;2(4):327–40.
237. McClure BN, Sebranek JG, Kim YH, Sullivan GA. The effects of lactate on nitrosylmyoglobin formation from nitrite and metmyoglobin in a cured meat system. *Food Chem*. 2011 Dec 1;129(3):1072–9.
238. Winter J, Nyskohus L, Young GP, Hu Y, Conlon MA, Bird AR, et al. Inhibition by resistant starch of red meat-induced promutagenic adducts in mouse colon. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2011 Nov;4(11):1920–8.
239. Le Leu RK, Winter JM, Christophersen CT, Young GP, Humphreys KJ, Hu Y, et al. Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: a randomised clinical trial. *Br J Nutr*. 2015 Jul;114(2):220–30.
240. Sinha R, Cross A, Curtin J, Zimmerman T, McNutt S, Risch A, et al. Development of a food frequency questionnaire module and databases for compounds in cooked and processed meats. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Jul;49(7):648–55.
241. Kuhnle GGC, Bingham SA. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1355–7.
242. Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, et al. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*. 1996;17(3):515–23.
243. Joosen AMCP, Kuhnle GGC, Aspinall SM, Barrow TM, Lecommandeur E, Azqueta A, et al. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2009 Aug;30(8):1402–7.
244. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun;97(12):906–16.
245. Linseisen J, Rohrmann S, Norat T, Gonzalez CA, Dorronsoro Iraeta M, Morote Gómez P, et al. Dietary intake of different types and characteristics of processed meat which might be associated with cancer risk--results from the 24-hour diet recalls in the European

- Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr.* 2006 Jun;9(4):449–64.
246. J Linseisen. Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: results from 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutr.* 2002 Dec;5(6B):1243-58.
247. Mata J, Kadel P, Frank R, Schüz B. Education- and income-related differences in processed meat consumption across Europe: The role of food-related attitudes. *Appetite.* 2023 Mar 1;182:106417.
248. Zeng L, Ruan M, Liu J, Wilde P, Naumova EN, Mozaffarian D, et al. Trends in Processed Meat, Unprocessed Red Meat, Poultry, and Fish Consumption in the United States, 1999-2016. *J Acad Nutr Diet.* 2019 Jul;119(7):1085-1098.e12.
249. Cocking C, Walton J, Kehoe L, Cashman KD, Flynn A. The role of meat in the European diet: current state of knowledge on dietary recommendations, intakes and contribution to energy and nutrient intakes and status. *Nutr Res Rev.* 2020 Dec;33(2):181–9.
250. Pointke M, Pawelzik E. Plant-Based Alternative Products: Are They Healthy Alternatives? Micro- and Macronutrients and Nutritional Scoring. *Nutrients.* 2022 Jan 29;14(3):601.
251. Bryngelsson S, Moshtaghian H, Bianchi M, Hallström E. Nutritional assessment of plant-based meat analogues on the Swedish market. *Int J Food Sci Nutr.* 2022 Nov;73(7):889–901.
252. Martínez Steele E, Baraldi LG, Louzada ML da C, Moubarac JC, Mozaffarian D, Monteiro CA. Ultra-processed foods and added sugars in the US diet: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open.* 2016 Mar 9;6(3):e009892.
253. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglian V, et al. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* 2006 Apr;7(4):295–6.
254. European Chemical Agency (ECHA). Support document for identification of 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol a) as a substance of very high concern because of its toxic for reproduction (article 57 c) properties [Internet]. 2016 [cited 2024 May 22]. Available from: <https://echa.europa.eu/documents/10162/b10d6a00-8e47-9b14-4f61-c779a8dc8450>
255. Kim J, Boushey CJ, Wilkens LR, Haiman CA, Le Marchand L, Park SY. Plant-based dietary patterns defined by a priori indices and colorectal cancer risk by sex and race/ethnicity: the Multiethnic Cohort Study. *BMC Med.* 2022 Nov 29;20(1):430.
256. Wang F, Ugai T, Haruki K, Wan Y, Akimoto N, Arima K, et al. Healthy and unhealthy plant-based diets in relation to the incidence of colorectal cancer overall and by molecular subtypes. *Clin Transl Med.* 2022 Aug;12(8):e893.
257. Di Y, Ding L, Gao L, Huang H. Association of meat consumption with the risk of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2023 Aug 23;23(1):782.

258. Boldo E, Fernández de Larrea N, Pollán M, Martín V, Obón-Santacana M, Guevara M, et al. Meat Intake, Cooking Methods, Doneness Preferences and Risk of Gastric Adenocarcinoma in the MCC-Spain Study. *Nutrients*. 2022 Nov 16;14(22):4852.
259. Sun Y, He X, Sun Y. Red and processed meat and pancreatic cancer risk: a meta-analysis. *Front Nutr*. 2023;10:1249407.
260. Hornsey HC. The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *J Sci Food Agric*. 1956;7(8):534–40.
261. Varma M, Thulluru A, Kumar S, Kumar G, Pavani K. HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW. *World J Pharm Res*. 2021 Jan 1;10:405–26.
262. Córscico B, Falomir Lockhart LJ, Franchini GR, Scaglia N. Análisis estructural y funcional de macromoléculas [Internet]. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP); 2013 [cited 2024 Aug 7]. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/37269>
263. Riboli E, Kaaks R. The EPIC Project: rationale and study design. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Int J Epidemiol*. 1997;26 Suppl 1:S6-14.
264. EPIC Spain. Antecedentes y composición de la cohorte [Internet]. [cited 2024 Sep 19]. Available from: <http://www.epic-spain.com/acercaspain.html>

