

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALANA ALMEIDA FELIX

EFEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E DO ÁCIDO DESOXCÓLICO
SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, FÍGADO E COLO
UTERINO HUMANAS

BRASÍLIA

2018

ALANA ALMEIDA FELIX

EFEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E DO ÁCIDO DESOXCÓLICO
SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, FÍGADO E COLO
UTERINO HUMANAS

Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato.

Coorientadora: Ma. Carolina Martins Ribeiro.

BRASÍLIA

2018

Alana Almeida Felix

EFEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E DO ÁCIDO DESOXCÍLICO
SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, FÍGADO E COLO
UTERINO HUMANAS

Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Aprovado em ____ de _____ de 2018.

Banca de avaliação

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Ma. Carolina Martins Ribeiro – Universidade de Brasília

Ma. Nadyellem Graciano da Silva – Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para finalizar mais essa etapa da minha vida. Sem Ele, nada disso seria possível. Em ti repousa o meu pensamento e minha alma, em profundo reconhecimento, pois a ti devo a própria existência e os meios de torná-la vitoriosa, e, por me fazeres acreditar que o pranto pode durar uma noite, mas o riso vem pela manhã (SI: 30:5).

A minha família, pelo apoio, incentivo e cumplicidade durante toda a trajetória da faculdade. A minha mãe, Mariluce, que é minha maior fonte de inspiração e força, permanecendo sempre ao meu lado, principalmente nos momentos de angústia. Ao meu pai, Evaldo, que nunca mediu esforços em investir no meu futuro, sempre valorizando a importância dos estudos na vida dos seus filhos.

Ao meu namorado e companheiro, Isaac, que mesmo distante, sempre me amparou e compreendeu minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos.

A minha querida e amável orientadora, Profa. Dra. Angélica Amorim Amato, pela orientação, paciência, dedicação e estímulo, meu muitíssimo obrigada por esses 4 anos de ensinamentos.

A minha companheira de experimentos, durante toda a realização deste estudo, Bruna Teles, obrigada por todo apoio, paciência e companheirismo nesses anos de muito trabalho.

A minha coorientadora e conselheira, Carol Martins, muito obrigada pelas dicas e sugestões durante toda a elaboração deste trabalho. Seu auxílio foi imprescindível para a conclusão deste projeto e de todos os outros que trabalhamos juntas.

A Nady, não apenas por fazer parte da banca examinadora, mas também por todos os momentos descontraídos e por sempre estar à disposição para me ajudar com os projetos de iniciação científica. Você foi essencial na minha graduação!

Aos amigos que fiz no decorrer do curso, Jaya e Lucas. Sem vocês esta etapa teria sido muito mais difícil.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As neoplasias malignas representam causa importante de morbimortalidade, no Brasil e em diversos outros países. Modificações da composição da microbiota intestinal, denominadas também disbiose, vêm sendo associadas a risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como é o caso de tumores do trato digestivo, de fígado e de mama. O reconhecimento desta associação é bastante recente e não está, ainda, bem definido se a relação entre estas duas condições é de causalidade, ou mesmo os mecanismos envolvidos na associação. Entretanto, há diversas hipóteses para explicá-la, que se baseiam em consequências estabelecidas da disbiose com potencial de influenciar a oncogênese. Entre as diversas funções metabólicas da microbiota intestinal, destaca-se a fermentação, que acontece no colón. Dentre os produtos da fermentação, estão os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) acetato, butirato e propionato, que exercem uma variedade de efeitos biológicos sistêmicos no hospedeiro. Entretanto, seus efeitos sobre a proliferação celular ainda não foram explorados. Desta forma, este projeto buscou identificar o papel de produtos da microbiota intestinal, os ácidos graxos de cadeia curta e o ácido biliar secundário, ácido desoxicólico (DCA), sobre a viabilidade de células neoplásicas de mama (MCF7), de fígado (HepG2) e de colo uterino (HeLa), a fim de explorar a relação entre a microbiota intestinal e a oncogênese. Os resultados mostram que as células HeLa tratadas com propionato e butirato na concentração de 10^{-2} M apresentaram redução significativa da viabilidade celular. As células MCF7 tratadas com acetato na concentração de 10^{-7} M, butirato na concentração 10^{-2} M, propionato nas concentrações 10^{-9} M, 10^{-6} M e 10^{-3} M e DCA na concentração 10^{-3} M, também apresentaram redução significativa. Os resultados indicaram que o tratamento com os SCFA e com o DCA reduzem significativamente a viabilidade de células HeLa e MCF7.

Palavras-chave: Câncer. Microbiota intestinal. Disbiose. Acetato. Propionato. Butirato. Ácido desoxicólico.

ABSTRACT

Cancer is an important cause of morbidity and mortality in Brazil and in several other countries. Changes in the composition of the gut microbiota, also called dysbiosis, have been associated with the risk of developing some types of cancer, such as digestive tract, liver and breast tumors. The recognition of this association is quite recent and is not well defined if the connection between these two conditions is causality, or even the mechanisms involved in this association. However, there are several hypotheses to explain it, which are based on established consequences of dysbiosis with the potential to influence oncogenesis. Among the various metabolic functions of the gut microbiota, the fermentation stands out, which takes place in the colon. Among the fermentation products are short-chain fatty acids (SCFA) acetate, butyrate and propionate, which exert a variety of systemic biological effects on the host. However, their effects on cell proliferation have not yet been explored. Thus, this project sought to identify the role of gut microbiota products, short-chain fatty acids and the secondary bile acid, deoxycholic acid (DCA), on the viability of neoplastic breast (MCF7), liver (HepG2) and cervical (HeLa) cells, in order to explore the association between the gut microbiota and oncogenesis. The results show that HeLa cells treated with propionate and butyrate at 10^{-2} M concentration showed a significant reduction in cell viability. MCF7 cells treated with acetate at 10^{-7} M, butyrate at 10^{-2} M, propionate at 10^{-9} M, 10^{-6} M e 10^{-3} M and DCA 10^{-3} M concentration, also showed a significant reduction. The results indicated that treatment with SCFA and DCA significantly reduced the viability of HeLa and MCF7 cells.

Keywords: Cancer. Gut microbiota. Dysbiosis. Acetate. Propionate. Butyrate. Deoxycholic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS NO TRATO GASTROINTESTINAL.....	17
FIGURA 2 – POSSÍVEIS FATORES E EFEITOS/CONSEQUÊNCIAS DA DISBIOSE NO HOSPEDEIRO.	20
FIGURA 3 – FERMENTAÇÃO BACTERIANA NO INTESTINO - PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA	25
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DE MTT.....	29
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PLACAS DE 96 POÇOS NO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	31
FIGURA 6 – EFEITO DOS SCFA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa.....	32
FIGURA 7 – EFEITO DOS SCFA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	33
FIGURA 8 – EFEITO DOS SCFA E DCA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS MCF7.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina 3', 5'- monofostato cíclico
DCA	Ácido desoxicólico
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
EPM	Erro padrão da média
FFA2/GPR43	Receptor de ácidos graxos livres 2
FFA3/GPR41	Receptor de ácidos graxos livres 3
FXR	Receptor farnesóide X
HDAC	Histonas desacetilases
HeLa	Células de câncer de colo uterino humano
HepG2	Células de câncer de fígado humano
HPV	Papilomavírus humano
MCF7	Células de câncer de mama humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta

SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
UFC	Unidades formadoras de colônias
WHO	<i>World Health Organisation</i>

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
U/mL	Unidades por mililitro
μ g/mL	Microgramas por mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
μ L	Microlitro
mg/mL	Miligramas por mililitro
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.1	DOENÇA CRÔNICA NÃO TRANSMISSÍVEL: NEOPLASIAS	12
1.2	MICROBIOTA E DISBIOSE	15
1.3	DISBIOSE E NEOPLASIAS	21
1.4	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA: ACETATO, PROPIONATO E BUTIRATO	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1	CULTURA DE CÉLULAS	28
2.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	28
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3	RESULTADOS.....	32
3.1	EFEITO DOS SCFA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE COLO UTERINO - HELA.....	32
3.2	EFEITO DOS SCFA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE FÍGADO - HEPG2	33
3.3	EFEITO DOS SCFA E DCA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA - MCF7	34
4	DISCUSSÃO	35
5	CONCLUSÃO	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença crônica não transmissível: neoplasias

Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) são caracterizadas por uma etiologia incerta, de origem multifatorial e não infecciosa, de curso prolongado e com forte influência de fatores de risco comportamentais, modificáveis ou não (GOULART, 2011; MALTA, MERHY, 2010). Estas doenças instalam-se sem que o indivíduo perceba e podem demorar anos para se manifestar. As lesões causadas levam a complicações que são responsáveis pelo adoecimento e óbito da população. Dentre as principais DCNT estão os diversos tipos de neoplasias, que constituem um problema de saúde de grande magnitude e impacto na sociedade (BRASIL, 2013; STEWART, WILD 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - OMS*), os termos neoplasias, câncer e tumores malignos são comumente utilizados para definir um mesmo grupo de doenças que têm como característica o crescimento desordenado de células com a capacidade de disseminar entre os tecidos e órgãos adjacentes. Estas células se dividem rapidamente, podendo ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores capazes de se propagar para outras regiões do corpo (INCA, 2018; WHO, 2018). As neoplasias são doenças genéticas cujo processo fisiopatológico tem início com um dano a um gene ou a um grupo de genes de uma célula e progride quando todos os mecanismos do complexo sistema imunológico de reparação ou destruição celular falham (BRASIL, 2008), o que requer um manejo estratégico no tratamento da doença.

Dessa forma, as neoplasias estão entre as doenças que mais desafiam os sistemas de saúde no Brasil e em diversos outros países, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundialmente conhecida, com cerca de 14 milhões de novos casos

diagnosticados em 2012 (FERLAY et al., 2013; INCA, 2017) e responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo (BRASIL, 2006; WHO, 2002). Os tipos de câncer mais incidentes são os de próstata (152 mil) em homens e mama (152 mil) em mulheres. Entretanto, o câncer do colo do útero ainda contribui de forma importante para a carga da doença em mulheres, figurando como o segundo mais incidente e como a segunda causa de morte por câncer em mulheres (FERLAY, 2015). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer em 2015, a maioria em países de baixa e média renda (WHO, 2018). Trata-se de um aumento frente à média anual registrada em 2012, quando a estimativa mundial mostrou que ocorreram 8,2 milhões de óbitos (FERLAY et al., 2013; INCA, 2017).

As neoplasias vêm aumentando e hoje ocupam a segunda causa de morte mundial (WHO, 2018). No Brasil, foram registrados 189.454 óbitos por câncer em 2013 (INCA, 2018). A estimativa para o ano de 2014, que foi validada também para o ano de 2015, apontou para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (BRASIL, 2014). Para o biênio 2016-2017, estimou-se a ocorrência de mais de 596 mil casos da doença no país (INCA, 2015). E para 2018-2019, a ocorrência é de mais 600 mil casos, para cada ano. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui o câncer de mama feminino entre os mais incidentes e ainda apresenta altas taxas de câncer do colo do útero (INCA, 2017).

Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer (BRASIL, 2014). A explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. A redefinição dos padrões de vida, a partir da uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo desencadeados pelo processo global de industrialização, têm reflexos importantes no perfil epidemiológico das

populações. As alterações demográficas, com redução das taxas de mortalidade e natalidade, indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e neoplásicas (BRASIL, 2006). Dessa forma, o câncer é considerado um problema de saúde pública, enfrentado pelo sistema de saúde no Brasil e no mundo, em vista de sua amplitude epidemiológica, social e econômica (INCA, 2012).

Os fatores primários que são responsáveis por desencadear o câncer ainda não estão bem elucidados, mas as neoplasias surgem devido às mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos como metais, radiações, radicais livres de oxigênio, inflamações crônicas e xenobióticos (tabaco, álcool, pesticidas, etc.), que promovem desordem no ciclo celular, levando ao excesso da taxa de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular. Este processo culmina com a formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, isto é, tumores malignos (FERRARI, TORRES, 2002). Estes tumores têm a capacidade de invasão e disseminação, o que resulta na produção das metástases, principal característica do câncer. A metástase constitui o crescimento neoplásico secundário, a distância, sem continuidade com o foco primitivo e com ampla autonomia para crescimento e propagação. Uma compreensão mais abrangente sobre a patogênese da disseminação do câncer provavelmente resultará em mudanças significativas no tratamento, visto que estes tumores podem ser resistentes a terapia inicial e causar a morte do hospedeiro (BRASIL, 2008; INCA, 2012).

Recentemente, modificações da composição da microbiota intestinal, denominada disbiose, vêm sendo associadas ao risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, tanto do trato digestivo (ARTHUR et al., 2012; SCHWABE, JOBIN, 2013; WANG et al., 2014; ZHAN et al., 2013) quanto de tumores extra-intestinais, como é o caso de tumores de fígado (DAPITO et al., 2012; YOSHIMOTO et al., 2013) e de mama (VELICER et al., 2004;

XUAN et al., 2014). O reconhecimento desta associação é bastante recente e não está, ainda, bem definido se a relação entre estas duas condições (disbiose e risco de câncer) é de causalidade, ou mesmo os mecanismos envolvidos na associação. Entretanto, há diversas hipóteses para explicá-la, que se baseiam em consequências estabelecidas da disbiose com potencial de influenciar a oncogênese.

1.2 Microbiota e disbiose

Os microrganismos são integrantes essenciais na construção da Terra e têm sido fundamentais na evolução da vida muito antes do surgimento dos eucariotos. Estes microrganismos vivem em todas as partes da biosfera e são bastante organizados. A associação entre a comunidade microbiana e seu hospedeiro tem demonstrado uma forte interação que vai além de uma simples relação física, de forma que permite uma variedade de benefícios fisiológicos. Os mamíferos e microrganismos vêm coexistindo e evoluindo há milhares de anos vivendo em relação de simbiose. O corpo humano é colonizado por uma comunidade altamente diversificada, incluindo bactérias, fungos e vírus, em regiões como a pele, vagina, cavidade nasal, pulmão, mas a maioria vive no trato gastrointestinal (AVILÉS-JIMÉNE et al., 2017; BIK, 2009).

A nomenclatura “microbiota intestinal” refere-se aos microrganismos que residem no intestino, sendo composta por espécies nativas que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal e por número variável de microrganismos que o habitam temporariamente. A microbiota intestinal humana compreende 10 a 100 trilhões de microrganismos, pertencentes principalmente aos gêneros bacterianos *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* e cocos gram positivos (QIN et al., 2010). Existem sítios específicos para adesão das bactérias à mucosa do intestino e esta adesão é determinante para sua colonização (BRANDT, SAMPAIO, MIUKI, 2006). Essas

espécies podem ser de dois tipos: as benéficas, como os lactobacilos e as bifidobactérias; e as prejudiciais, como as do gênero *Enterobacteriaceae* e *Clostridium ssp* (VARAVALLO, THOMÉ, TESHIMA, 2008).

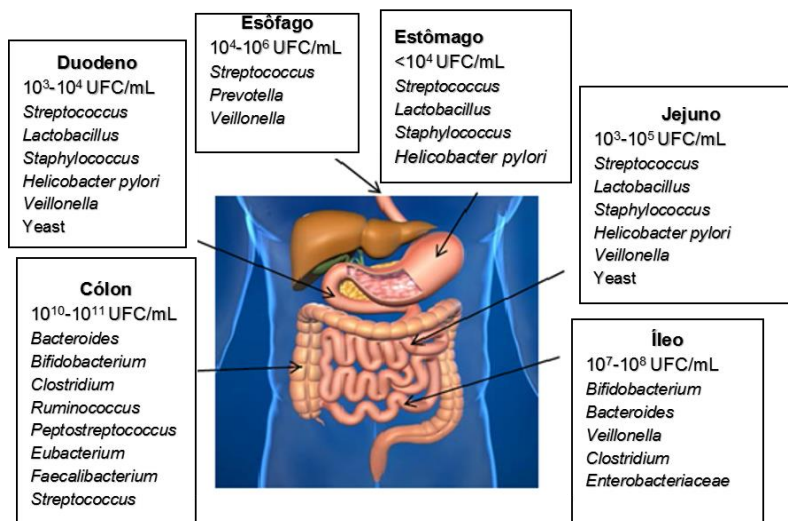
Além disso, a microbiota compreende 3 a 4 milhões de genes, o que corresponde a mais de 150 vezes o número de genes do genoma humano (DAVE et al., 2012; LYNCH, PEDERSEN, 2016; QIN et al., 2010). O genoma microbiano permite que a microbiota realize várias atividades metabólicas que não são codificadas pelo genoma humano e que, portanto, podem ser benéficas para o hospedeiro (PASSOS, MORAES-FILHO, 2017).

A composição da microbiota intestinal varia dependendo da localização no trato gastrointestinal (Figura 1), do microambiente específico e também entre indivíduos (COSTELLO et al., 2009). Dentre os filos que dominam a microbiota intestinal em um humano adulto, destacam-se os Gram-negativos Bacteroidetes e os Gram-positivos Firmicutes, ambos compreendem cerca de 90% de todas as espécies de bactérias no intestino e são importantes na homeostase energética do organismo, além de afetarem o sistema imune e a resposta inflamatória (QIN et al., 2012). Os filos presentes em menor porcentagem são Proteobacteria e Actinobacteria, seguidos de Fusobacteria e Verrucomicrobia (DUCA, LAM, 2014; MADIGAN et al., 2006). Embora estes organismos estejam presentes na maioria dos indivíduos, há sempre variações nas proporções existentes e nas espécies presentes (MADIGAN et al., 2006).

Nas regiões proximais do intestino delgado (10^3 bactérias/g) até o cólon a concentração de bactérias é aumentada cerca de oito vezes. A composição da microbiota do intestino delgado, particularmente do duodeno, é semelhante à do estômago. Esta semelhança deve-se ao fato do duodeno ser a porção inicial do intestino onde chega o quimo, proveniente do estômago, e que tem características ácidas. Neste local também existem secreções biliares e pancreáticas que favorecem a acidez. Contudo, observa-se uma

diminuição gradual da acidez do duodeno até ao íleo em função da diluição do ácido, o que facilita a colonização bacteriana, atingindo 10^{11} UFC (unidades formadoras de colônias) /mL no cólon (DUEÑAS et al., 2015).

Figura 1 – Distribuição e composição das espécies de bactérias no trato gastrointestinal.



UFC: unidade formadora de colônia.

Fonte: Adaptada de DUEÑAS, et al. (2015).

A microbiota intestinal tem muitas funções fisiológicas importantes no intestino humano, tais como metabolismo de nutrientes (fermentação dos carboidratos, supressão da inibição da lipoproteína lipase em adipócitos, metabolismo de proteínas, síntese de vitamina K e de componentes das vitaminas do complexo B e degradação dos polifenóis), metabolismo de xenobióticos e drogas, proteção antimicrobiana, imunomodulação, bem como manutenção da estrutura e função do trato gastrointestinal (JANDHYALA et al., 2015).

Quando saudável, a microbiota atua como uma barreira contra os microrganismos invasores, potencializando os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os agentes patogênicos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais. Além disso, ela também compete por combustíveis intraluminais

(nutrientes e locais de ligação), prevenindo o estabelecimento de patógenos (ALMEIDA et al., 2009; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017).

Ao mesmo tempo, a microbiota benéfica contribui diretamente na digestão de nutrientes e captação de energia a partir dos alimentos, em especial pelo processo de fermentação (DAVE et al., 2012; BLASER, 2014; ROBLES-ALONSO, GUARNER, 2013; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017). Os carboidratos são importante fonte de energia para as células humanas e microbianas; e enzimas humanas não degradam carboidratos não digeríveis, como celulose, xilanas, amido resistente e inulina. Esta energia é adquirida especialmente através da fermentação destes carboidratos não absorvíveis, que estimula a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), principalmente acetato, propionato e butirato (MIN, RHEE, 2015; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017; SURANA, KASPER, 2012). Os tipos e quantidades de SCFA produzidos são determinados pela quantidade de carboidrato que é consumido e pela composição da microbiota intestinal (TREMAROLI, BACKHED, 2012).

A microbiota intestinal apresenta ainda, participação direta no metabolismo dos ácidos biliares do colesterol dietético. No intestino, os ácidos biliares primários promovem a absorção de vitaminas solúveis e lipossolúveis e se ligam a receptores celulares, que, quando ativados, desencadeiam vários efeitos metabólicos protetores, como a resistência ao ganho de peso e ao desenvolvimento de esteatose hepática (GHAZALPOUR et al., 2016).

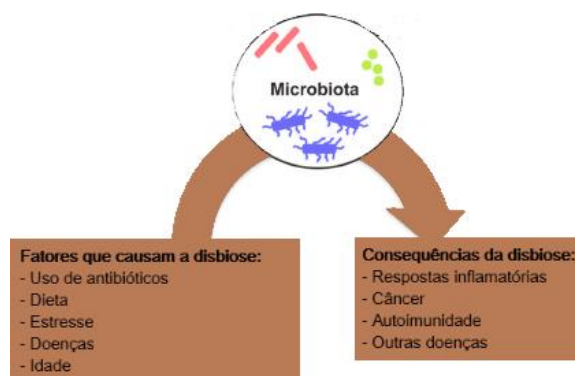
Cada indivíduo tem seu próprio padrão individual de distribuição e composição da microbiota intestinal, sendo em parte determinado pelo genótipo do hospedeiro e também pela colonização inicial que ocorre imediatamente após o nascimento (SOMMER, BACKHED, 2013). Diferentes fatores podem modificar e também causar mudanças definitivas no padrão da microbiota (Figura 2), dentre eles estão o tipo de parto e amamentação. Bokulich e colaboradores relacionam as cesarianas e fórmulas alimentares

com os distúrbios metabólicos e imunológicos ao longo da vida, que, possivelmente, são consequências do desenvolvimento desordenado da microbiota (BOKULICH et al., 2016).

Além disso, modificações da dieta, doenças, estresse, envelhecimento, uso de medicamentos como os antibióticos, estado imunológico do hospedeiro e fatores ambientais também podem modificar a microbiota intestinal. Estudos evidenciaram que os fatores ambientais se mostraram significativo no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Uma vez que a microbiota regula as respostas inflamatórias, a alteração dela influenciaria na susceptibilidade a doenças. (AKIN, TÖZÜN, 2014; ALMEIDA et al., 2009; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017; ZITVOGEL et al., 2015).

Além disso, esses fatores também podem promover alterações na fisiologia intestinal e conseqüentemente causar o desequilíbrio da microbiota, caracterizado pelo aumento de bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas, configurando uma situação de risco (ALMEIDA et al., 2009). Sendo elas, o aparecimento de doenças, como diarreia associada a antibióticos, sepse por translocação bacteriana, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, doenças autoimunes, diabetes, obesidade, neoplasias intestinais e, recentemente, neoplasias extra-intestinais (HAWRELAK, MYERS, 2004; LYNCH, PEDERSEN, 2016; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017; ROBLES-ALONSO, GUARNER, 2013). Este processo de modificação da composição ou função da microbiota intestinal é denominado disbiose e pode alterar a sensibilidade visceral, a motilidade e a permeabilidade intestinal, bem como alterar a resposta imune, promovendo assim um estado pró-inflamatório (PASSOS, MORAES-FILHO, 2017; ROBLES-ALONSO, GUARNER, 2013).

Figura 2 – Possíveis fatores e efeitos/consequências da disbiose no hospedeiro.



Fonte: Adaptado de KRANICH, MASLOWSKI, MACKAY. (2011)

A associação entre disbiose e o desenvolvimento de certas doenças está apenas começando a ser explorada. Em um estudo desenvolvido pelo “*US Environmental Protection Agency*” avaliou-se o papel destas bactérias no desenvolvimento de neoplasias, pesquisadores observaram que os agentes potencialmente carcinogênicos (corantes de alimentos, aflatoxinas, pesticidas, nitritos) presentes em alimentos e em substâncias presentes no tabaco e drogas prescritas, eram bioativados por sistemas de enzimas das bactérias intestinais. Estas bioativações, capazes de desenvolver neoplasias, são promovidas em uma velocidade maior nos sistemas gastrointestinais com populações microbianas desequilibradas (HAWRELAK, MYERS, 2004; STEFE, ALVES, RIBEIRO, 2008). Dessa forma, é possível observar que a disbiose pode impactar na saúde do ser humano tornando-se fator de risco para doenças graves como as neoplasias.

As hipóteses para explicar a associação entre disbiose e o risco de câncer são baseadas nas consequências geradas pela disbiose com potencial de influenciar a oncogênese. Neste contexto, destacam-se as doenças infecciosas, disfunção imunológica, alterações metabólicas, disfunção hematopoiética e inflamação crônica relacionadas à disbiose (revisado em ZITVOGEL et al., 2015).

1.3 Disbiose e neoplasias

Existe uma multiplicidade de fatores que influenciam o início da neoplasia e seu curso subsequente. Fatores que não são considerados estritamente carcinogênicos podem, no entanto, afetar o resultado final das neoplasias. Como tal, vários microrganismos participam direta ou indiretamente no desenvolvimento de muitos tumores malignos. De acordo com as estimativas, pelo menos 15% de todos os casos de câncer são atribuíveis a agentes infecciosos (BIEDERMANN, ROGLER, 2015; LYNCH, PEDERSEN, 2016; ROBLES-ALONSO, GUARNER, 2013). Pouco se sabe sobre a contribuição da microbiota intestinal para o desenvolvimento de neoplasias. Os microrganismos entéricos podem promover a oncogênese por meio de diferentes mecanismos: 1) indução da inflamação; 2) Aumento da proliferação celular; 3) Produção de substâncias capazes de afetar a integridade do DNA e a regulação imune (ABREU, PEEK, 2014; LYNCH, PEDERSEN, 2016; ZITVOGEL et al., 2015; PASSOS, MORAES-FILHO, 2017).

Alterações experimentais da microbiota intestinal influenciam a incidência e a progressão de neoplasias extra-intestinais, incluindo carcinoma mamário e hepatocelular, provavelmente por meio de circuitos inflamatórios e metabólicos (DAPITO et al., 2012; YOSHIMOTO et al., 2013). Esses resultados são compatíveis com os estudos epidemiológicos que revelam associação entre a disbiose, suas consequências ou determinantes (em especial o uso excessivo de antibióticos) e uma maior incidência de neoplasias extra-intestinais, incluindo carcinoma de mama (VELICER et al., 2004; XUAN et al., 2014). Essas descobertas podem refletir a distribuição sistêmica de bactérias e seus subprodutos no decurso de respostas inflamatórias que comprometem a integridade da barreira intestinal (ZITVOGEL et al., 2015).

Além disso, há indícios do papel da microbiota intestinal no metabolismo do estrógeno dietético. A associação entre o estrogênio e o desenvolvimento de câncer de mama

já foi mostrada (WOOLCOTT et al., 2010). Em pacientes tratados com ampicilina, a excreção fecal de metabólitos de estrogênio aumenta, indicando que a reabsorção na corrente sanguínea é reduzida com a microbiota intestinal desequilibrada. Além disso, os microrganismos fecais realizam reações de oxidação e redução com o estrogênio e podem mudar as concentrações intestinais de estrona e estradiol, mostrando o envolvimento da microbiota intestinal no metabolismo do estrogênio (SHEFLIN, WHITNEY, WEIR, 2014).

Em modelo animal, o estrogênio implantado leva à formação de cistos no tecido mamário. Além disso, a presença de anticorpos antiestrogênico (redução das concentrações de estrogênio) indica o início e crescimento de tumores mamários em ratos e camundongos. Especificamente, a hidroxilação 16 α do estrogênio, uma reação mostrada ser realizada pela microbiota intestinal está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama (SHEFLIN, WHITNEY, WEIR, 2014). Considerando esses resultados, Hill e colaboradores hipotetizaram uma ligação entre o desenvolvimento do câncer de mama e o metabolismo do estrogênio pela microbiota intestinal (HILL, GODDARD, WILLIAMS, 1971).

Os vírus também fazem parte da composição da microbiota intestinal e podem influenciar o risco de câncer. Por exemplo, o DNA do Papilomavírus Humano (HPV) é detectado em quase todos os cânceres cervicais. Estudos indicam que os antígenos virais E6 e E7 contribuem para a malignidade do câncer cervical induzido por HPV. No entanto, o estrogênio é necessário para o desenvolvimento de câncer cervical por infecção por HPV. Em camundongos e ratos, 83% dos animais infectados com HPV desenvolvem câncer cervical após o tratamento com estrogênio. Este tratamento leva ao aumento da transcrição de antígenos virais E6 e E7, contribuindo para a carcinogênese cervical. À medida que a microbiota intestinal afeta os níveis circulantes de estrogênio, esses microrganismos podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer cervical por infecção por HPV. Alterações

no metabolismo bacteriano podem modular o risco de câncer e, muitas vezes, acompanhar a disbiose da microbiota intestinal (SHEFLIN, WHITNEY, WEIR, 2014). Pensando nisso, tem-se estudado formas de utilizar a microbiota na prevenção da oncogênese, assim, pesquisadores têm investigado o papel dos SCFA na proteção contra as neoplasias.

1.4 Ácidos graxos de cadeia curta: acetato, propionato e butirato

O organismo humano não possui as enzimas necessárias para degradar a maior parte das fibras dietéticas, presentes em frutas, vegetais, legumes e cereais. Portanto, esses carboidratos não digeríveis passam no trato gastrointestinal superior sem sofrer modificações e são fermentados no intestino grosso pela microbiota anaeróbica. A fermentação resulta em diversos grupos metabólitos dos quais os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) são o grupo principal (NICHOLSON et al., 2012).

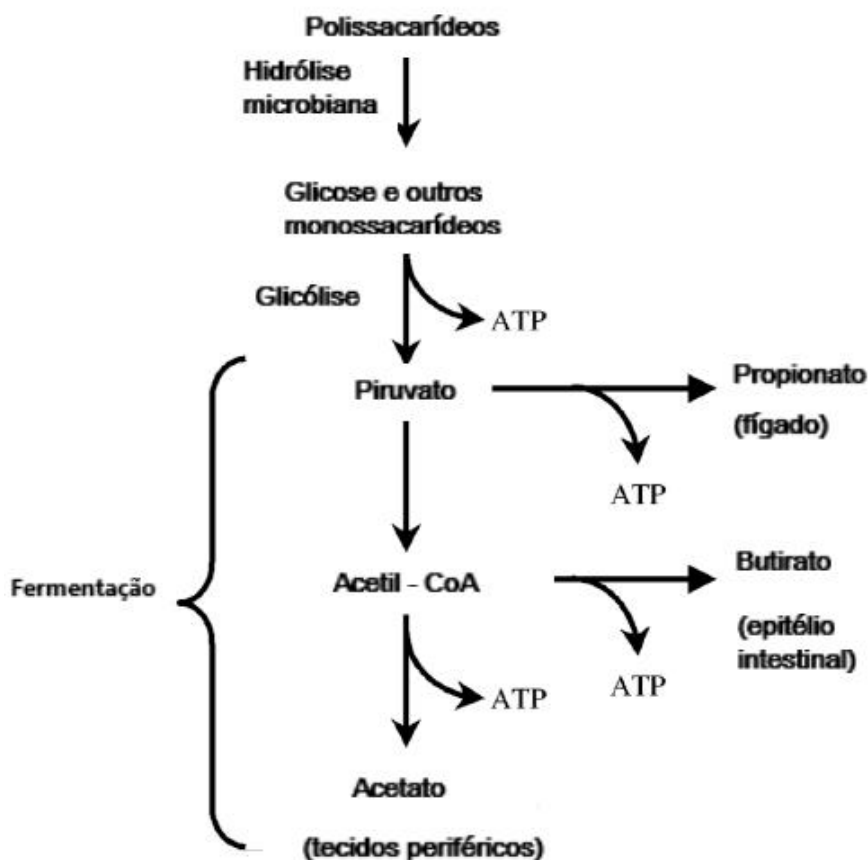
Os três filos Bacteroidetes (gram-negativos), Firmicutes (gram-positivos) e Actinobacteria (gram-positivos) são os mais abundantes no intestino. O filo Bacteroidetes produz principalmente acetato e propionato, enquanto o filo Firmicutes apresenta o butirato como seu principal produto metabólico (MACFARLANE, MACFARLANE, 2003). A maioria das atividades bacterianas ocorrem no cólon proximal, onde a disponibilidade de substrato é mais alta. Para o cólon distal, a disponibilidade de substratos diminui e a extração de água livre reduz a difusão de substratos e produtos microbianos. Isso faz com que a parte proximal do cólon seja o principal local de fermentação. Particularmente, os carboidratos não digeríveis são fermentados no cólon proximal. Esta fermentação resulta em SCFA juntamente com os gases CO₂ e H₂ (TOPPING, CLIFTON, 2001).

Os SCFA são ácidos orgânicos alifáticos saturados que consistem em um a seis carbonos, dos quais o acetato (C2), o propionato (C3) e o butirato (C4) são os mais abundantes (95%) (COOK, SELLIN, 1998). As concentrações de SCFA no cólon variam em

concentrações de milimolar (mM) entre 20 mM até 150 mM, são liberados no cólon proximal em concentrações muito altas (70-140 mM), enquanto suas concentrações são menores no cólon distal (20-70 mM) e no íleo distal (20-40 mM) (TOPPING, CLIFTON, 2001; WONG et al., 2006), no sangue essas concentrações alcançam cerca de 50 micromolar (μM) (COOK, SELLIN, 1998).

Os destinos metabólicos dos SCFA são variáveis (Figura 3). No entanto, grande parte da absorção é feita através da membrana celular dos colonócitos por difusão passiva. O butirato é metabolizado principalmente pelo epitélio do cólon e regula várias funções dos colonócitos. O propionato é metabolizado pelo fígado e é um possível precursor de glicogênio podendo suprimir a síntese de colesterol. Já o acetato, é metabolizado em vários órgãos como fígado, músculo, rim, coração, no cérebro e também no cólon. Assim, apenas o acetato pode ser detectável no sangue periférico. (CUMMINGS, MACFARLANE, 1991; TAN et al., 2014; TREMAROLI, BACKHED, 2012).

Figura 3 – Fermentação bacteriana no intestino - produção de ácidos graxos de cadeia curta.



Fonte: Adaptado de HOOPER, et al. (2002).

A produção de SCFA pela microbiota intestinal tem vários efeitos já conhecidos: diminuição do pH do cólon protegendo este contra carcinogênese por meio da redução de aminas tóxicas, aumento da absorção de cálcio e magnésio, aumento da absorção de íons pela estimulação do transporte de eletrólitos no cólon prevenindo a diarreia, e aumento do fluxo sanguíneo venoso porta-hepático e do cólon, além da redução do crescimento de bactérias patogênicas (COOK, SELLIN, 1998; TAZOE et al., 2008).

Os papéis fisiológicos dos SCFA são amplos, pois além de possuir efeitos nos enterócitos e na função digestiva; eles desempenham funções importantes no sistema imunológico sistêmico e intestinal local. São conhecidos também, por suas funções anti-inflamatórias, modulando a quimiotaxia celular imune, a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a liberação de citocinas (TAN et al., 2014).

Os SCFA, em particular o butirato, são promotores da saúde e da integridade do cólon. Ele é o principal substrato metabólico dos colonócitos, fornecendo pelo menos 60-70% da energia necessária para que essas células promovam a proliferação, diferenciação e função, como por exemplo, a redução de danos oxidativos no DNA (ROSIGNOLI et al., 2001; SUZUKI, YOSHIDA, HARA, 2008; VECCHIA et al., 1997). Os efeitos do butirato estão aparentemente associados com a proteção no desenvolvimento do câncer do cólon (AUGENLICHT et al., 2002; VECCHIA et al., 1997; YU et al., 2011). Além disso, ele é conhecido pelos seus efeitos antitumorígenicos e antiproliferativos devido à sua regulação de genes que inibem a proliferação celular e induzem apoptose via inibição das histonas desacetilases (HDAC) (CHANG et al., 2014; NAKAMURA et al., 2001; SEKHAVAT, SUN, DAVIE, 2007; WAKABAYASHI et al., 2005).

Os ácidos biliares são moléculas anfifílicas sintetizadas no fígado a partir do colesterol. Eles desempenham um papel importante na solubilidade do colesterol na bile e no processo digestivo no intestino delgado através da formação de micelas (NAGENGAST, GRUBBEN, VAN MUNSTER, 1995). Os ácidos biliares secundários, como o ácido desoxicólico (DCA), são produzidos como produtos do metabolismo microbiano dos ácidos biliares primários gerados pelo hospedeiro. O DCA atua ligando ao receptor FXR (receptor presente no fígado e intestino) (WANG et al., 1999), sendo capaz de reduzir o crescimento e a metástase do tumor hepático e intestinal (DEUSCHLE et al., 2012; SHEFLIN, WHITNEY, WEIR, 2014).

Tanto o acetato quanto o propionato, apesar de serem produzidos em maior quantidade que o butirato, têm suas funções menos documentadas e menos compreendidas. O acetato é o SCFA mais abundante, sendo pouco metabolizado no cólon por ser rapidamente absorvido e transportado para o fígado (COOK, SELLIN, 1998). Após sua absorção, cerca de 75% do acetato é captado e metabolizado no fígado, onde pode ser

utilizado por diversas vias: síntese de ácidos graxos de cadeia longa, cetogênese, produção de colesterol, glutamina e glutamato. O restante do acetato, que alcança a circulação, é captado e oxidado por diversos tecidos como músculo e glândula mamária (AKANJI, HOCKADAY, 1990).

Por fim, apenas 10% do propionato absorvido permanece na corrente sanguínea após a passagem pelo fígado. Neste órgão, esse SCFA é metabolizado, inibe a síntese de colesterol e pode ser utilizado como substrato da gliconeogênese (WOLEVER, 1991). O propionato pode ser formado no catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e metionina, sendo que sua concentração plasmática pode estar aumentada em condições nas quais há aumento da taxa de oxidação de aminoácidos (CUMMINGS, SAKATA, 1995).

Em resumo, além de constituírem fonte energética importante para diferentes células, os SCFA também modulam a expressão de genes (OGAWA et al., 2003; RANGANNA, et al., 2003; WEBER, KERR, 2006) relacionados à resposta inflamatória e diferenciação celular (BOHMIG et al., 1999; MILLARD et al., 2002). Ao mesmo tempo, esses compostos modulam diferentes aspectos da fisiologia gastrointestinal como a liberação de hormônios (SAMUEL et al., 2008) e absorção de eletrólitos e água (BINDER, MEHTA, 1989). Eles modulam, também, processos sistêmicos, como adipogênese/lipólise (GE et al., 2008) e a resposta imune/inflamatória. Entretanto, seus efeitos sobre a proliferação celular ainda não foram muito bem explorados. É possível, assim, que os SCFA, absorvidos para a circulação sistêmica, possam influenciar o ciclo celular, representando mecanismo adicional para explicar a associação entre a microbiota intestinal e a oncogênese. Desta forma, este estudo buscou identificar o papel de produtos da microbiota intestinal, os SCFA e o ácido biliar secundário, DCA, sobre a viabilidade de linhagens celulares tumorais de câncer de mama, de colo uterino e fígado, a fim de explorar a relação entre a microbiota intestinal e a oncogênese.

2 MATERIAL E MÉTODOS

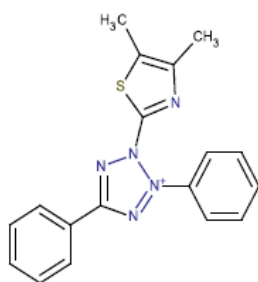
2.1 Cultura de células

Células imortalizadas de câncer de colo uterino humano (HeLa) e células imortalizadas de câncer de fígado humano (HepG2) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*); e células imortalizadas de câncer de mama humano (linhagem MCF7) foram cultivadas em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), ambos meios contendo 100 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas para cultura células de 150 mm, e mantidas a 37°C e com 5% de CO₂.

2.2 Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios colorimétricos são muito utilizados para triagens iniciais de moléculas bioativas, pois permitem quantificação fácil e rápida da resposta celular. Nestes ensaios se utilizam compostos que têm sua cor modificada ao serem metabolizados na célula, ou tendem a se acumular nas células vivas. Em 1983, Mosmann desenvolveu um método colorimétrico para determinar a proliferação celular e citotoxicidade em células (MOSMANN, 1983) que, na atualidade, é umas das ferramentas mais utilizadas para a determinação da viabilidade celular e crescimento celular (SCUDIERO et al., 1988). A detecção da viabilidade celular é usualmente empregada para identificar a citotoxicidade de uma molécula, sendo muito utilizado métodos colorimétricos como o sal de tetrazólio, por exemplo o método do 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio, MTT (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura química de MTT.



O MTT em solução aquosa apresenta coloração amarelada e, quando metabolizado por ação de desidrogenases mitocondriais e por agentes redutores produzidos, leva à formação de cristais de formazan de coloração azul-violeta, que são insolúveis em meio aquoso. A grande maioria de aplicações celulares com sais de tetrazólio envolve ensaios em placas de noventa e seis (96) poços que, para determinação da viabilidade celular, fundamenta-se no fato da quantidade de formazan formada ser diretamente proporcional à viabilidade celular (MARSHALL, GOODWIN, HOLT, 1995; STOCKERT et al., 2012).

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se o método do MTT (SIGMA-ALDRICH®), em placas de 96 poços. Com exceção dos poços utilizados para o controle do teste (Branco), todos os outros poços das placas estavam com células (HeLa, 20.000 células por poço; HepG2, 50.000 células por poço; MCF7, 5.000 células por poço). As células foram submetidas a diferentes tratamentos (veículo e concentrações crescentes de acetato, propionato, butirato e DCA, incluindo 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M e 10^{-2} M). Cada poço apresentava o volume final de 100 μ L, sendo 99 μ L de meio de cultura e 1 μ L do tratamento, conforme apresentado na Figura 5. Após 24 horas de exposição aos SCFA e DCA, o meio com os compostos foi aspirado e posteriormente foram adicionados 90 μ L do meio de cultura e 10 μ L (10%) de MTT (Sigma) na concentração de 5 mg/mL (em solução salina tamponada com fosfato - PBS) a todos os poços das placas, e as mesmas foram incubadas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Para a dissolução do sal de formazan, o meio

de cultura foi retirado e 100 μ L de solução reveladora de MTT (Dimetilsulfóxido - DMSO) foram adicionados. As placas foram deixadas sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente, para que ocorresse a homogeneização dos cristais até sua solubilização completa.

A quantidade de formazan formada foi medida por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm, em leitor de microplacas Beckman (espectrofotômetro da marca Shimadzu). Os experimentos foram realizados três vezes e em triplicata e a viabilidade celular foi determinada da seguinte forma:

(i) Do valor das absorbâncias obtidos nas amostras contendo células (não tratadas, tratadas com veículo ou com os compostos), foi subtraído o valor da absorbância obtido no branco (apenas meio de cultura);

(ii) Foi calculado o valor médio da absorbância de cada triplicata;

(iii) O valor médio da absorbância nas triplicatas tratadas com veículo ou compostos foi dividido pelo valor médio da absorbância na triplicata sem tratamento (apenas meio de cultura). O resultado foi expresso em percentual de viabilidade celular em relação ao grupo que não recebeu tratamento, em que se considerou haver viabilidade celular de 100%.

Figura 5 – Representação esquemática das placas de 96 poços no ensaio de viabilidade celular. Em amarelo, as células com o meio de cultura; em cinza, o poço “Branco” com apenas o meio de cultura. Em verde, o tratamento com concentrações crescentes de acetato; em rosa, tratamento com concentrações crescentes de butirato; em azul, tratamento com concentrações crescentes de propionato; e em lilás, o tratamento com concentrações crescentes de DCA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Branco	Branco	Branco	A-9	A-9	A-9	A-8	A-8	A-8	A-7	
B		A-7	A-7	A-6	A-6	A-6	A-5	A-5	A-5	A-4	A-4	
C		A-4	A-3	A-3	A-3	A-2	A-2	A-2	B-9	B-9	B-9	
D		B-8	B-8	B-8	B-7	B-7	B-7	B-6	B-6	B-6	B-5	
E		B-5	B-5	B-4	B-4	B-4	B-3	B-3	B-3	B-2	B-2	
F		B-2	P-9	P-9	P-9	P-8	P-8	P-8	P-7	P-7	P-7	
G		P-6	P-6	P-6	P-5	P-5	P-5	P-4	P-4	P-4	P-3	
H		P-3	P-3	P-2	P-2	P-2	céls.	céls.	céls.			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Branco	Branco	Branco	D-9	D-9	D-9	D-8	D-8	D-8	D-7	
B		D-7	D-7	D-6	D-6	D-6	D-5	D-5	D-5	D-4	D-4	
C		D-4	D-3	D-3	D-3	céls. + etanol	céls. + etanol	céls. + etanol				
D												
E												
F												
G												
H												

A: Acetato, B: Butirato, P: Propionato, Céls: Células, D: Ácido deoxicólico.

2.3 Análise estatística

Os resultados do ensaio de viabilidade celular foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da viabilidade celular das células tratadas com os SCFA e DCA em relação às células tratadas com veículo (em termos percentuais). O teste estatístico empregado foi a análise de variância One-Way ANOVA, seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas por meio da utilização do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito dos SCFA sobre a viabilidade de células de câncer de colo uterino - HeLa

Investigou-se a viabilidade de células HeLa tratadas com concentrações crescentes de acetato, butirato e propionato para definir as concentrações dos compostos que comprometessem a viabilidade celular. Os resultados da viabilidade celular em resposta às diferentes concentrações dos compostos estudados estão apresentados na Figura 6. Após 24 horas de tratamento, nenhuma das concentrações testadas de acetato comprometeu a viabilidade celular. Entretanto, foi observada redução significativa da viabilidade celular em resposta à maior concentração testada de propionato e butirato (10^{-2} M), para cerca de 80% da viabilidade celular das células tratadas com veículo (controle).

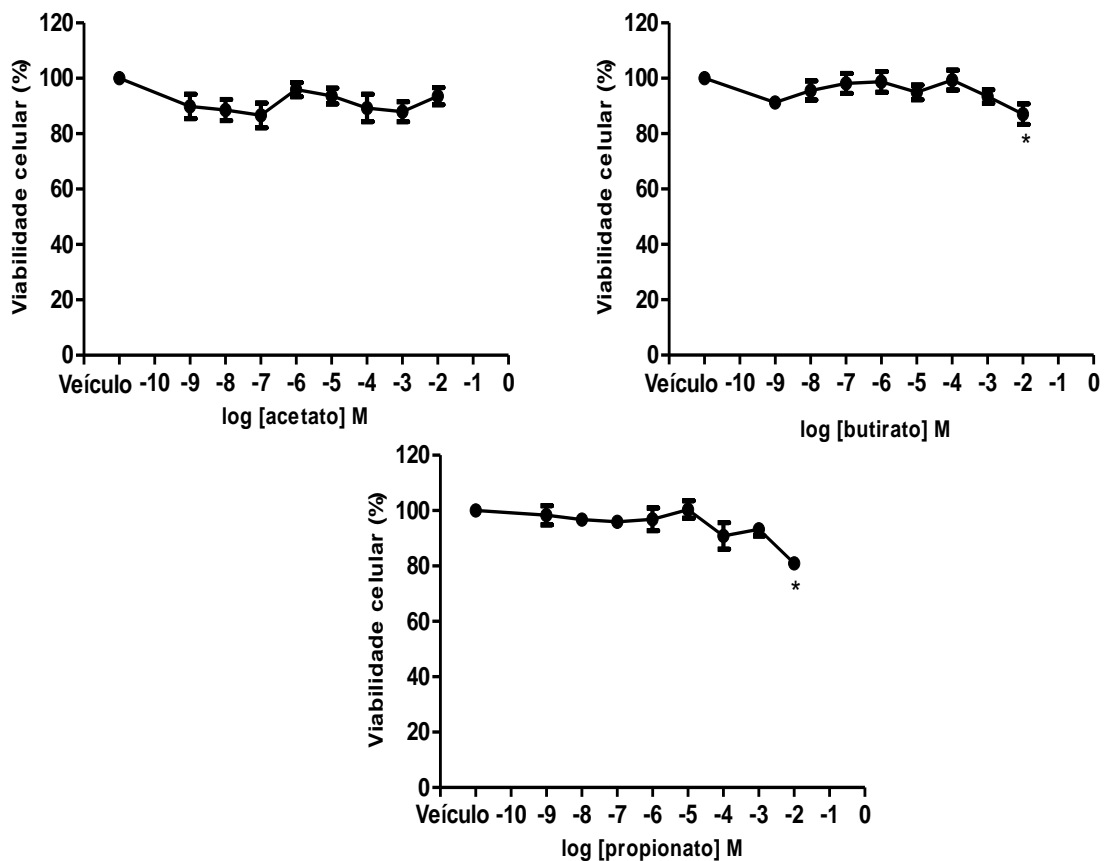


Figura 6 – Efeito dos SCFA sobre a viabilidade de células HeLa. Células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de acetato, butirato e propionato. Viabilidade celular determinada como valor percentual em relação ao grupo que não recebeu tratamento, considerado como viabilidade celular de 100%. Dados apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. *p < 0,05 vs veículo. SCFA: ácidos graxos de cadeia curta.

3.2 Efeito dos SCFA sobre a viabilidade de células de câncer de fígado - HepG2

Avaliou-se também a viabilidade de células HepG2 tratadas com concentrações crescentes de acetato, butirato e propionato para definir as concentrações dos compostos que comprometessem a viabilidade celular. Os resultados da viabilidade celular em resposta às diferentes concentrações dos compostos estudados estão apresentados na Figura 7. Após 24 horas de tratamento, nenhum dos SCFA testados modificou a viabilidade das células HepG2, diferente do que foi observado na linhagem de células de câncer de colo uterino.

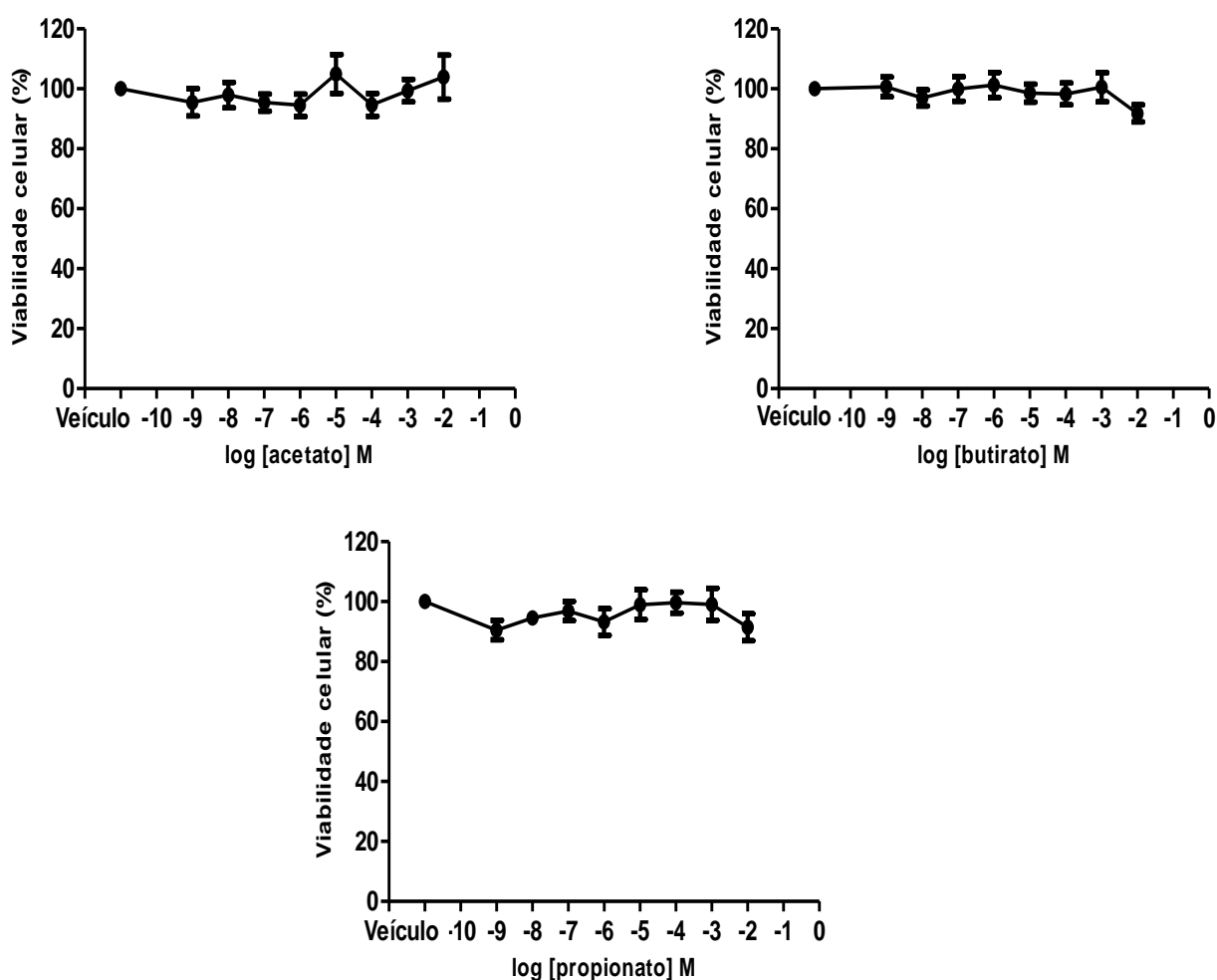


Figura 7 – Efeito dos SCFA sobre a viabilidade de células HepG2. Células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de acetato, butirato e propionato. Viabilidade celular determinada como valor percentual em relação ao grupo que não recebeu tratamento, considerado como viabilidade celular de 100%. Dados apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs veículo. SCFA: ácidos graxos de cadeia curta.

3.3 Efeito dos SCFA e DCA sobre a viabilidade de células de câncer de mama - MCF7

Por fim, a viabilidade de células MCF7 foi investigada por meio do tratamento com concentrações crescentes de acetato, butirato, propionato e DCA para definir as concentrações dos compostos que comprometessem a viabilidade celular. Os resultados da viabilidade celular em resposta às diferentes concentrações dos compostos estudados estão apresentados na Figura 8. Após 24 horas de tratamento, foi observada redução significativa da viabilidade celular em resposta ao tratamento com acetato apenas na concentração de 10^{-7} M, butirato na maior concentração testada (10^{-2} M) e propionato nas concentrações de 10^{-9} M, 10^{-6} M e 10^{-3} M. Neste último caso, a redução foi discreta, inferior a 20%, quando comparada ao controle. Quanto ao DCA, observou-se uma redução acentuada da viabilidade celular em resposta à maior concentração testada (10^{-3} M).

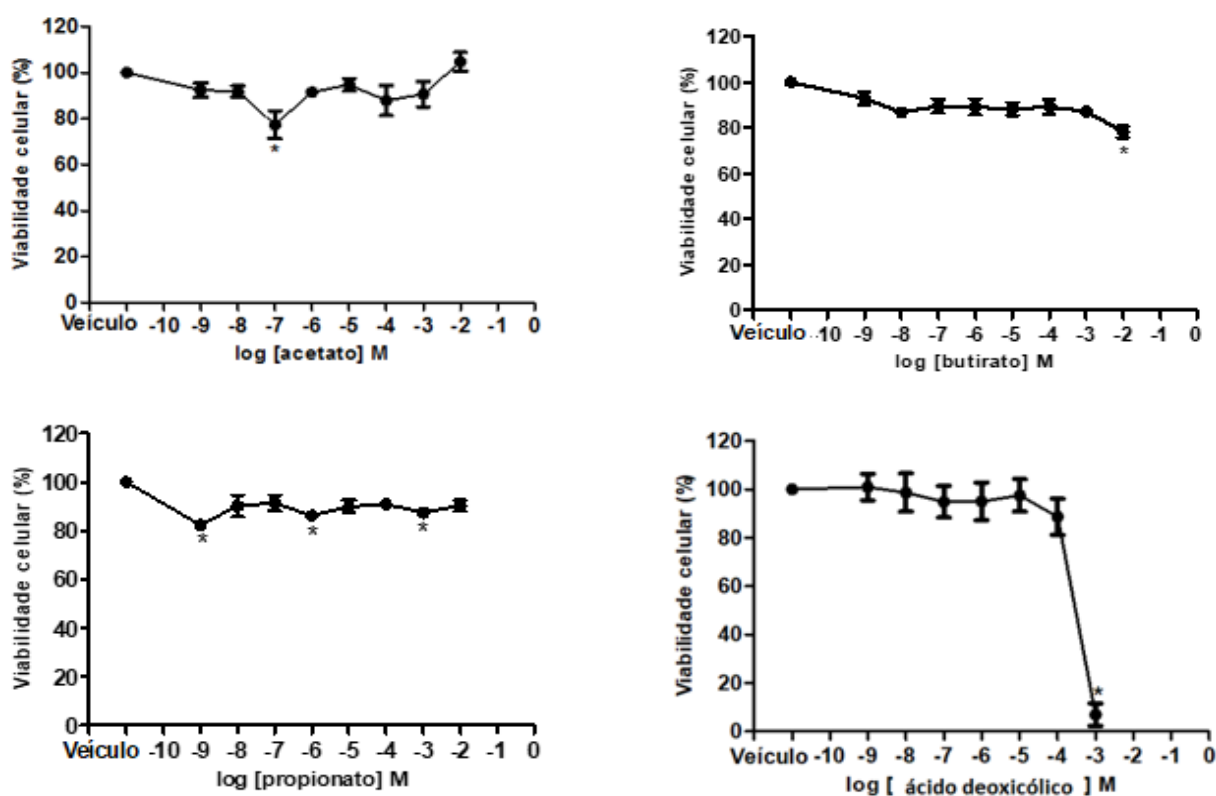


Figura 8 – Efeito dos SCFA e DCA sobre a viabilidade de células MCF7. Células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de acetato, butirato, propionato e DCA. Viabilidade celular determinada como valor percentual em relação ao grupo que não recebeu tratamento, considerado como viabilidade celular de 100%. Dados apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. *p < 0,05 vs veículo. SCFA: ácidos graxos de cadeia curta; DCA: ácido deoxicólico.

4 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal beneficia-se do seu alto potencial metabólico para gerar sua própria energia, principalmente fermentando carboidratos não digeríveis da dieta. Os produtos finais da fermentação de carboidratos são gases e ácidos orgânicos, incluindo lactato e SCFA, como acetato, propionato e butirato.

O butirato, considerado membro mais importante da família dos SCFA, atua como uma fonte favorável de energia para os colonócitos. Ele possui propriedades anti-inflamatórias e antineoplásicas na mucosa intestinal, que ocorre através do metabolismo celular, da homeostase da microbiota, de mecanismos antiproliferativos, e da regulação imunomodulatória e genética/epigenética (YANG e YU, 2018). O propionato é absorvido principalmente pelo fígado, enquanto que o acetato atinge os tecidos periféricos (BINDELS et al., 2012), como a glândula mamária. Esses dois últimos possuem propriedades anti-inflamatórias em monócitos humanos e em modelos *in vivo* de colite (BINDELS et al., 2012; COX et al., 2009; MASLOWSKI et al., 2009).

A microbiota também participa diretamente do metabolismo dos ácidos biliares do colesterol dietético, como o DCA, que é parcialmente absorvido no cólon e ingressa na circulação entero-hepática, sendo assim conjugado no fígado e secretado na bile (NAGENGAST, GRUBBEN, VAN MUNSTER, 1995). Os ácidos biliares são compostos anfifílicos que atuam como metabólitos esteroides no funcionamento do colesterol, fatores tróficos para o epitélio intestinal, bem como detergentes para a absorção de colesterol e vitaminas lipossolúveis (WU et al., 2003).

Dessa forma, nesse estudo procurou-se entender a relação entre a exposição aos produtos da microbiota intestinal e a possibilidade de redução da viabilidade de células

neoplásicas por meio do ensaio com 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio, MTT. Através desse ensaio colorimétrico avaliou-se a sobrevivência dessas células mediante a presença desses compostos. E os resultados refletiram os efeitos finais da viabilidade celular, em que observou a citotoxicidade dos metabólitos da microbiota e do DCA nas três linhagens celulares neoplásicas: do colo uterino (HeLa), fígado (HepG2) e mama (MCF7) (Figuras 6, 7 e 8, respectivamente). Através do ensaio de MTT foi possível observar a diminuição da proliferação celular quando os SCFA e DCA foram usados nas linhagens celulares de estudo (Figuras 6-8).

Assim, nesse presente estudo foi observado que o butirato diminuiu a viabilidade de células HeLa e células MCF7 quando tratadas na maior concentração de 10^{-2} M (Figura 6 e 8, respectivamente). Há estudos, envolvendo o butirato, que associam esse composto à diminuição do desenvolvimento de células neoplásicas, como câncer colorretal, em humanos. Ou et al. (2013) avaliaram as diferenças na composição da microbiota intestinal e seus metabólitos em afro-americanos com alto risco de desenvolver câncer colorretal e em africanos rurais nativos com baixo risco de desenvolver esse tipo de câncer. Eles observaram que a composição da microbiota é amplamente diferente nos africanos nativos, onde encontraram níveis mais altos de SCFA, dentre esses uma quantidade maior de grupos bacterianos produtores de butirato, mostrando-se consistente com o menor risco de desenvolvimento de câncer colorretal (OU et al., 2013). Ainda nesse mesmo estudo, pesquisadores realizaram a troca de dieta entre esses indivíduos durante duas semanas, em que os africanos rurais foram alimentados com uma dieta rica em gordura e pobre em fibras, enquanto os afro-americanos foram alimentados com uma dieta rica em fibras e pobre em gorduras. Nesses últimos, observou-se o aumento da butirogênese e fermentação sacarolítica, supressão da síntese de ácidos biliares secundários e proliferação de colonócitos, enquanto que o aumento da produção de ácido biliar secundário e proliferação

de colonócitos foram observados nos africanos nativos (O'KEEFE et al., 2015). Esses estudos avaliaram o mecanismo do butirato e demonstraram que este metabólito poderia induzir a apoptose dos colonócitos, regular a expressão gênica através do bloqueio das histonas desacetilases (HDAC) (STELIOU et al., 2012) e ativar a gliconeogênese por meio do mecanismo dependente de adenosina 3', 5'-monofostato cíclico (AMPc) (DE VADDER et al., 2014). Essas descobertas verificam ainda o papel protetor desse metabólito no processo de desenvolvimento do câncer colorretal.

Essa atividade dos SCFA tem sido associada à disposição desses compostos de inibir a HDAC, impedindo assim que ocorra a repressão da transcrição. Os inibidores das HDAC provocam o acúmulo de histonas acetiladas, aumentam o grau de diferenciação e, deste modo, diminuem a proliferação celular através do bloqueio do ciclo celular (DOKMANOVIC, CLARKE, MARKS, 2007; GIANNINI, et al., 2012). O butirato é considerado o inibidor mais poderoso, seu potencial citotóxico e dos demais inibidores das HDAC em células tumorais do cólon e em outros tipos de tumor já foi descrito (GIANNINI, et al., 2012; JOSEPH, et al., 2004). O propionato demonstrou um perfil intermediário e o acetato não influenciou na atividade da HDAC (AOYAMA, KOTANI, USAMI, 2010; HINNEBUSCH et al., 2002). Observou-se nesse estudo que o propionato diminuiu a viabilidade de células do câncer do colo uterino tratadas na concentração 10^{-2} M (Figura 6), e também diminuiu a viabilidade de células do câncer de mama em três diferentes concentrações 10^{-9} , 10^{-6} e 10^{-3} M (Figura 8). O acetato, por sua vez, diminuiu significativamente a viabilidade de células provenientes de câncer de mama na concentração de 10^{-7} M (Figura 8).

Existem mecanismos intracelulares envolvidos na proliferação celular e na morte celular, como a ativação das caspases 3 e 7; e diminuição da atividade da histona desacetilase, que já foram extensivamente avaliados por meio de ensaios *in vitro*

(AOYAMA, KOTANI, USAMI, 2010; TANG et al., 2011). Dois receptores acoplados à proteína G, o receptor de ácidos graxos livres 3 (FFA3) e o receptor de ácidos graxos livres 2 (FFA2), também conhecidos como GPR41 e GPR43, respectivamente, foram identificados como receptores para os SCFA. O propionato é considerado o agonista endógeno mais potente para ambos receptores, seguido do acetato. A expressão do receptor FFA2 ocorre principalmente em células imunes, mas também em adipócitos, enterócitos e células endócrinas. O FFA3 exibe um padrão de expressão disseminado, como no baço, linfonodos, medula óssea, tecido adiposo e cólon. Bindels e colaboradores descreveram que a administração de carboidratos não digeríveis fermentáveis, como os frutanos do tipo inulina (ITF), diminuem o tamanho do tumor em modelos animais com câncer de fígado ou mamário. *In vitro*, demonstraram que o efeito antiproliferativo do propionato é parcialmente dependente do nível de AMPc e que a ativação do FFA2 altera a proliferação de células neoplásicas. Estes dados apoiam a ideia do papel da microbiota intestinal no controle do câncer sistêmico (BINDELS et al., 2012).

Também foi avaliado nesse estudo, a viabilidade das células do câncer de mama na presença do DCA, pois foi demonstrado a citotoxicidade dos ácidos biliares em várias células humanas normais e em algumas células malignas. Dessa forma, nesse estudo observou-se que o DCA diminuiu significativamente a viabilidade de células MCF7 tratadas com a concentração de 10^{-3} M, sugerindo que há mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos ácidos biliares nessas células.

Wu e colaboradores afirmam que os ácidos biliares podem estimular o crescimento de células epiteliais do cólon, mas não o de linhagens celulares de câncer de cólon. Os ácidos biliares hidrofóbicos, como o DCA, podem danificar as células lisando as membranas e prejudicando a função mitocondrial, bem como aumentando a geração de radicais reativos de oxigênio, que podem causar a peroxidação lipídica da membrana e atacar os ácidos

nucléicos. Além disso, a citotoxicidade dos ácidos biliares é parcialmente dependente da composição da membrana celular. Em razão da variação dos componentes da membrana celular (glicolipídios, receptores e proteínas de transporte) em diferentes linhagens celulares dependendo da origem e diferenciação celular, as linhagens celulares podem também diferir em relação à sua resposta aos ácidos biliares (WU et al., 2003). Um outro efeito pode estar associado a família de enzimas dentro da membrana celular conhecida como proteínas quinases. A proteína quinase C parece desempenhar um papel crítico na promoção do tumor e na ação dos fatores de crescimento. Nagengast e colaboradores afirmam que a citotoxicidade do DCA pode ser gerada por indução de apoptose via sinalização dependente de proteína quinase C (NAGENGAST, GRUBBEN, VAN MUNSTER, 1995).

Ainda neste presente estudo, foi realizado o ensaio com os SCFA e células neoplásicas de fígado (Figura 7), em que o mesmo foi realizado por Bindels e colaboradores que evidenciaram, por meio do ensaio de MTT, que os SCFA reduzem a viabilidade de células BaF3 no fígado, sendo esse efeito tanto maior quanto maior a concentração do composto e o tempo de exposição ao mesmo (24h-72h) (BINDELS et al., 2012). No entanto, não foi observada essa redução na linhagem de células hepáticas utilizadas neste estudo (HepG2) (Figura 7), sugerindo que a ação dos SCFA possa ser específica para determinada linhagem de células hepáticas e também, que o tempo de exposição aos compostos não tenha sido suficiente para se observar a inibição significativa da proliferação celular. Nesta pesquisa, observou-se que os SCFA e o DCA podem diminuir a viabilidade de linhagens celulares HeLa e MCF7. Isso sugere que os produtos da microbiota intestinal podem ser citotóxicos para o câncer de colo uterino e de mama. No entanto, a investigação desse estudo foi realizada *in vitro*, sendo necessária mais pesquisas.

Nas últimas décadas, tornou-se evidente que os SCFA podem desempenhar um papel fundamental na prevenção e tratamento da síndrome metabólica, distúrbios intestinais e

certos tipos de neoplasias (DEN et al., 2013). De fato, a presença ou deficiência dos SCFA podem afetar a patogênese de uma diversificada de doenças, incluindo alergias, asma, bem como vários tipos de câncer, doenças autoimunes, doenças metabólicas e doenças neurológicas (TAN et al., 2014).

Rothschild e colaboradores investigaram a associação entre a microbiota intestinal, fatores ambientais e características genéticas, e demonstraram que a estrutura da comunidade intestinal da microbiota era predominantemente moldada por fatores ambientais, em vez de ancestralidade genética ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) apresentados pelo indivíduo. Além disso, apenas 1,9% da microbiota intestinal foi estimado como hereditário e mais de 20% da variância na diversidade pode ser inferida a partir de fatores ambientais associados à dieta e estilo de vida (ROTHSCHILD et al., 2018).

Mesmo que os mecanismos por trás do papel benéfico dos SCFA sobre o câncer não sejam totalmente compreendidos, é amplamente aceito que a ingestão de fibras diminui o risco de neoplasias. A análise de 25 estudos demonstrou que a ingestão de cereais e grãos integrais foi associada com risco reduzido de câncer colorretal, apoiando o potencial papel benéfico dos SCFA no câncer (AUNE et al., 2011; TAN et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi observado os efeitos dos SCFA, produzidos como resultado do processo de fermentação bacteriana no cólon a partir de componentes da dieta, e do DCA sobre a viabilidade de linhagens neoplásicas de mama, de fígado e de colo uterino. Com isso, buscou-se sugerir os mecanismos envolvidos na associação entre a composição da microbiota e o risco de desenvolvimento de câncer, na medida em que há diversos estudos que sugerem esta associação, porém poucas investigações que explorem a relação de causalidade ou mecanismos envolvidos. Os resultados assim obtidos ampliaram os conhecimentos a respeito da associação entre a microbiota intestinal e a oncogênese. Nesse sentido, conclui-se que em concentrações específicas dos SCFA e DCA houve redução da viabilidade de células neoplásicas de mama (MCF7) e de colo uterino (HeLa), sugerindo que produtos da microbiota possam estar envolvidos na associação entre a microbiota intestinal e a oncogênese.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.T.; PEEK, R.M. Gastrointestinal Malignancy and the Microbiome. **Gastroenterology**, v.146, p.1534-1546, 2014.
- AKANJI, A. O.; HOCKADAY, T. D. Acetate tolerance and the kinetics of acetate utilization in diabetic and nondiabetic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, n.1, p. 112-118, 1990.
- AKIN, H.; TÖZÜN, N. Diet, microbiota, and colorectal cancer. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 48, Suppl. 1, p. S67-S69, 2014.
- ALMEIDA, L.B. et al. Disbiose intestinal. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.24, n. 1, p. 58-65, 2009.
- AOYAMA, M.; KOTANI, J.; USAMI, M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. **Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 653-661, 2010.
- ARTHUR, J.C. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. **Science**, v.338, p.120-123, 2012.
- AUGENLICHT, L.H. et al. Short chain fatty acids and colon cancer. **J. Nutr.**, v.132, p.3804- 3808, 2002.
- AUNE, D. et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **BMJ**, v.343, p.d6617, 2011.
- AVILÉS-JIMÉNEZ, F. et al. On the Search to Elucidate the Role of the Microbiota in the Genesis of Cancer: The Cases of Gastrointestinal and Cervical Cancer. **Archives of Medical Research**, S0188-4409, n.17, p.30237, 2017.
- BIEDERMANN, L.; ROGLER, G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. **Eur. J. Pediatr.**, v.174, p.151-167, 2015.
- BIK, E.M. Composition and function of the human-associated microbiota. **Nutr. Rev.**, v. 67, n. 2, p.164-171, 2009.
- BINDELS, L.B. et al. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. **Br. J. Cancer.**, v.107, n.8, p. 1337-1344, 2012.
- BINDER, H. J.; MEHTA, P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. **Gastroenterology**, v.96, n.4, p.989-996, 1989.
- BLASER, M.J. The microbiome revolution. **J. Clin. Invest.**, v.124, p.4162-4165, 2014.

BOHMIG, G. A. et al. Stable prodrugs of n-butyric acid: suppression of T cell all responses in vitro and prolongation of heart allograft survival in a fully allogeneic rat strain combination. **Transpl. Immunol.**, v.7, n.4, p.221-227, 1999.

BOKULICH, N.A. et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. **Sci. Transl. Med.**, v.8, n.343, p.343-382, 2016.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MIUKI, C.J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**. v.2, n.28, p.117-127. 2006.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: INCA, 3. ed. rev. atual. ampl. p.159, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **O câncer e seus fatores de risco**. 2ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA; 2013. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Cancerfatoresrisco.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estimativa_2014_incidencia_cancer_brasil.pdf> Acesso em: 21 fev. 2018.

CHANG, P.V. et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, n.6, p.2247-2252, 2014.

COOK, S.I.; SELLIN, J.H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.12, 499-507, 1998.

COSTELLO, E.K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v.326, p.1694-1697, 2009.

COX, M.A. et al. Short-chain fatty acids act as anti-inflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 44, p. 5549–5557, 2009.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **J. Appl. Bacteriol.**, v.70, p.443-459, 1991.

CUMMINGS, J. H. R.; SAKATA, T. Physiology and clinical aspects of short chain fatty acids. **Cambridge University Press**, 1995.

- DAPITO, D.H. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. **Cancer Cell**, v.21, p.504-516, 2012.
- DAVE, M. et al. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Transl. Res.**, v.160, p.246-257, 2012.
- DE VADDER, F. et al. Microbiota generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, n.156, p.84–96, 2014.
- DEN, G.B. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **J. Lipid. Res.**, v.54, n.9, p.2325-2340, 2013.
- DEUSCHLE, U. et al. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. **PLoS one**, v.7, n.10, p. e43044, 2012.
- DOKMANOVIC, M.; CLARKE, C.; MARKS, P.A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. **Molecular Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 981–989, 2007.
- DUCA, F.A.; LAM, T.K.T. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.16, p.68-76, 2014.
- DUEÑAS, M. et al. Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. **Antioxidants**, v.4, p.1-21, 2015.
- FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v 1.0**, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC Cancer Base, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, Genève, v.136, n.5, p.359-386, 2015.
- FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, v.48, n.3, p.375-382, 2002.
- GE, H. et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. **Endocrinology**, v.149, n.9, p. 4519-26, 2008.
- GHAZALPOUR, A. et al. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol**. v.27, p.141-147, 2016.
- GIANNINI, G. et al. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 1439–1460, 2012.
- GOULART, F.A.A. Doenças crônicas não transmissíveis: estratégias de controle e desafios para os sistemas de saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; p.92, 2011.

- HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v.9, n.2, p.180-197, 2004.
- HILL, M.; GODDARD, P.; WILLIAMS, R. Gut bacteria and etiology of cancer of the breast. **The Lancet**, v.298, n.7722, p.472–473, 1971.
- HINNEBUSCH, B.F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **J. Nutr.**, v. 132, n. 5, p. 1012-1017, 2002.
- HOOPER, L.V. et al. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annu. Rev. Nutr.**, v.22, p.283-307, 2002.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 21 fev. 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Números de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dmdc/2016/numeros-cancer-brasil.asp>>. Acesso em: 22 fev.2018.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2^a ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA; 2012.
- JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.29, p.8787-8803, 2015.
- JOSEPH, J. et al. Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. **Oncogene**, v. 23, n. 37, p. 6304–6315, 2004.
- KRANICH, J.; MASLOWSKI, K.M.; MACKAY, C.R. Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. **Semin Immunol** **23**, p.139-145, 2011.
- LYNCH, S.V.; PEDERSEN, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, p. 2369-2379, 2016.

- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc. Nutr. Soc.**, v.62, p.67-72, 2003.
- MADIGAN, T. M. et al. Brock Biology of Microorganisms. In: Madigan, T. M. et al. (Eds.). **Microbial Symbioses**, 13ª Edição. Pearson, p.766-823, 2006.
- MALTA, D.C.; MERHY, E.E. O percurso da linha do cuidado sob a perspectiva das doenças crônicas não transmissíveis. **Interface Comunic. Saúde. Educ.**, v.14, n.34, p.593-605, 2010.
- MARSHALL, N.J.; GOODWIN, C.J.; HOLT, S.J. Critical- Assessment of the Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell-Growth and Function. **Growth Regulation**, v. 5, n. 2, p. 69-84, 1995.
- MASLOWSKI, K.M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v.461, n. 7268, p. 1282–1286, 2009.
- MILLARD, A. L. et al. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v.130, n.2, p.245-55, 2002.
- MIN, Y.W.; RHEE, P.L. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. **Clin. Ther.**, v.37, p.968-975, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival – Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NAGENGAST, F.M.; GRUBBEN, M.J.; VAN MUNSTER, I.P. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. **Eur. J. Cancer.**, v.7-8, p. 1067-1070, 1995.
- NAKAMURA, M. et al. Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor. **Journal of Cellular Physiology**, v.187, p.392, 2001.
- NICHOLSON, J.K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**. v.336, p.1262-1267, 2012.
- OGAWA, H. et al. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.309, n.3, p.512-519, 2003.
- O'KEEFE, S.J. et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. **Nat. Commun.**, n.6, p.6342, 2015.
- OU, J. et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 98, p. 111–120, 2013.
- PASSOS, M.D.C.F.; MORAES-FILHO, J.P. Intestinal microbiota in digestive diseases. **Arq. Gastroenterol.**, v.54, n.3, p.255-262, 2017.
- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65, 2010.

- QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v.49, p.55-60, 2012.
- RANGANNA, K. et al. Gene expression profile of butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. **Mol. Cell. Biochem**, v.254, n. 1-2, p.21-36, 2003.
- ROBLES-ALONSO, V.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **The british journal of nutrition**, v.109, n.1, Suplemento 2, p. s21-s23, 2013.
- ROBLES-ALONSO, V.; GUARNER, F. Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota. **Nutr. Hosp.**, v. 28, p. 553-557, 2013.
- ROSIGNOLI, P. et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. **Carcinogenesis**, v.22, p.1675-1680, 2001.
- ROTHSCHILD, D. et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. **Nature**, v. 555, p. 210–215, 2018.
- SAMUEL, M. S. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.105, n.3, p. 16767-16772, 2008.
- SCHWABE, R.F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature Reviews in Cancer**, v.13, p.800-812, 2013.
- SCUDIERO, D.A. et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium Formazan Assay for Cell-Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor – Cell Lines. **Cancer Research**, v. 48, n. 17, p. 4827-4833, 1988.
- SEKHAVAT, A.; SUN, J.M.; DAVIE, J.R. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 85, p. 751-758, 2007.
- SHEFLIN, A.M.; WHITNEY, A.K.; WEIR, T.L. Cancer-Promoting Effects of Microbial Dysbiosis. **Curr. Oncol. Rep.**, v.16, n.10, p.406, 2014.
- SOMMER, F.; BACKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.11, p.227-238, 2013.
- STEFE, C.A.; ALVES, M.A.R.; RIBEIRO, R.L. Probióticos, prebióticos e simbióticos - Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, 2008.
- STELIOU, K. et al. Butyrate histone deacetylase inhibitors. **Biores. Open Access**, v.1, p. 192–198, 2012.
- STEWART, B.W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.
- STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochem**, v. 114, n. 8, p. 785-96, 2012.

- SUZUKI, T.; YOSHIDA, S.; HARA, H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. **The British Journal of Nutrition**, v.100, p.297, 2008.
- TAN, J. et al. The role of short-chain fatty acids in health and disease. **Adv. Immunol.**, v.121, p.91-119, 2014.
- TANG, Y. et al. Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria mediated apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, v.18, n.4, p. 602–618, 2011.
- TAZOE, H. et al. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.59 (Suppl. 2), p.251, 2008.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and no starch polysaccharides. **Physiol. Rev.**, v.81, p.1031 – 1064, 2001.
- TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, n.7415, p.242-249, 2012.
- SURANA, N.K.; KASPER, D.L. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA. **Immunol. Rev.**, v. 245, p. 13-26, 2012.
- VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 29, n. 1, p. 83-104. 2008.
- VECCHIA, et al. Acetate and propionate potentiate the antiproliferative effect of butyrate on RBL-2H3 growth. **Gen. Pharmacol.**, v.29, p.725-728, 1997.
- VELICER, C.M. et al. Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. **J. Am. Med. Assoc.**, v.291, p.827–835, 2004.
- WAKABAYASHI, K. et al. Gene expression associated with the decrease in malignant phenotype of human liver cancer cells following stimulation with a histone deacetylase inhibitor. **International Journal of Oncology**, v.26, p.233, 2005.
- WANG, J. L. et al. Infection, antibiotic therapy and risk of colorectal cancer: A nationwide nested case-control study in patients with Type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Cancer**, v.135, p.956-967, 2014.
- WANG, H. et al. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. **Molecular cell**, v.3, n.5, p.543–553, 1999.
- WEBER, T. E.; KERR, B. J. Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.113, n.1-2, p.139-47, 2006.
- WOOLCOTT, C.G. et al. Plasma sex hormone concentrations and breast cancer risk in an ethnically diverse population of postmenopausal women: the Multiethnic Cohort Study. **Endocrine-related cancer**, v.17, n.1, p.125–134, 2010.

WOLEVER, T. M. et al. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.3, p.681-7, 1991.

WONG, J. M. et al. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, p.235, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. 2 ed. Geneva: WHO, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva: WHO; p. 176, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 14 fev.2018.

WU, Z. et al. Effects of bile acids on proliferation and ultrastructural alteration of pancreatic cancer cell lines. **World J. Gastroenterol.**, v.9, n.12, p. 2759-2763, 2003.

XUAN, C. et al. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. **Plos One**, v.9, p.E83744, 2014.

YANG, J.; YU, J. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. **Protein Cell**, v.9, n.5, p.474–487, 2018.

YOSHIMOTO, S. et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. **Nature**, v.499, p.97-101, 2013.

YU, D.C. et al. Short-chain fatty acid level and field cancerization show opposing associations with enteroendocrine cell number and neuropilin expression in patients with colorectal adenoma. **Mol. Cancer**, v.10, p.27, 2011.

ZHAN, Y. et al. Gut microbiota protects against gastrointestinal tumorigenesis caused by epithelial injury. **Cancer Research**, v.73, p.7199-7210, 2013.

ZITVOGEL, L. et al. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. **Sci. Transl. Med.**, v.7, p.271, 2015.