

BRUNA CRISTINA DOS SANTOS CRUZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO
NA CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA POR
1,2-DIMETILHIDRAZINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Cruz, Bruna Cristina dos Santos, 1988-
C957a Avaliação dos efeitos do uso de probiótico e simbiótico na
2018 carcinogênese colorretal induzida por 1,2-dimetilhidrazina em
camundongos / Bruna Cristina dos Santos Cruz. – Viçosa, MG,
2018.

xii, 97f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

I. Probióticos. 2. Simbióticos. 3. Cólon (Anatomia) -
Câncer. 4. Reto - Câncer. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação
em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 615.329

BRUNA CRISTINA DOS SANTOS CRUZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO
NA CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA POR
1,2-DIMETILHIDRAZINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2018

Solange Silveira Pereira

Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde, sabedoria e força para seguir em frente!

Aos meus pais, João e Lúcia pelo apoio, orações e ensinamentos.

Aos meus irmãos, Beatriz e Hebert pelo carinho e companheirismo.

Aos meus sobrinhos, Mariana e Lucas por me fazerem sonhar com dias melhores!

Ao Thyago, pelo amor, compreensão, paciência e incentivo.

À minha orientadora Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Ao meu grupo de trabalho, Nando, Letícia, Kelly, Milena, que participaram ativamente da execução deste trabalho... vocês tornaram tudo mais leve!

Aos amigos do LABIN, Toninho, Anderson, Lisiane, Rafa, Mariana e Sandra pela acolhida e convivência diária.

À professora Célia Lucia de Lucas Fortes Ferreira pelas orientações, engajamento, motivação e por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Reggiani e Mariáurea, por abrirem as portas do Laboratório de Patologia Experimental e pelo apoio técnico e científico.

Ao meu coorientador Leo, pelo exemplo como profissional, pelos valiosos conselhos e disponibilidade mesmo de longe.

À minha coorientadora Lisiane, pelo zelo, disponibilidade e leituras cuidadosas.

Aos funcionários, membros e parceiros do Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de Patologia Experimental (DBA), Laboratório de Processamento de Vegetais (DTA), Laboratório de Culturas Láticas (Bioagro).

Aos membros da banca, pela disponibilidade e valiosa contribuição.

À Universidade Federal de Viçosa, por ser minha janela para o mundo!

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigada!

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto... é
realidade”*

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original...”*

Albert Einstein

BIOGRAFIA

Bruna Cristina dos Santos Cruz, filha de João Martins dos Santos Cruz e Maria Lúcia dos Santos Cruz, nasceu em 07 de outubro de 1988, na cidade de Guiricema-Minas Gerais. Em março de 2009, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Nutricionista em 21 de janeiro de 2014. Em março do mesmo ano iniciou o Programa de Residência Multiprofissional em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), com término em fevereiro de 2016. Nesse período concluiu a Pós-Graduação em Fitoterapia e Suplementação Clínica. Em março de 2016 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, na área de *Valor nutricional, funcional e controle de qualidade de alimentos e de dietas*.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	7
2.1 Geral	7
2.2 Específicos	7
3. ARTIGO I	8
4. ARTIGO II	59
5. CONCLUSÕES GERAIS	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO I

Figura 1 – Diagrama de fluxo da Revisão Sistemática dos resultados da pesquisa bibliográfica. Baseado na declaração PRISMA “*Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises*”

Figura 2 – Potenciais mecanismos de ação dos probióticos e simbióticos na redução do risco de desenvolvimento do câncer colorretal.

ARTIGO II

Figura 1 – Desenho Experimental.

Figura 2 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico na (A) ingestão alimentar e (B) peso corporal de camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas. Grupo CON: dieta AIN-93M; grupo PRO: dieta AIN-93M + probiótico VSL#3; grupo SIM: dieta AIN-93M acrescida de PBY + probiótico VSL#3 (n=15/grupo). *ANOVA test.* (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à ingestão alimentar total, por semana, independente do grupo.

Figura 3 – Fotomicrografia do cólon de camundongos C57BL/6 induzidos a lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, corado em azul de metileno 1%. A: criptas colônicas normais. B: foco de cripta aberrante, com duas criptas aberrantes. Objetiva 10X.

Figura 4 – Escore Histopatológico. A: pontuação total do escore histopatológico. B: parâmetros que compõe o escore histopatológico e comparação entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). *ANOVA test.* Fotomicrografias do cólon de camundongos C57BL/6 induzidos a lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, coradas com Hematoxilina & Eosina. C: criptas colônicas preservadas. D: presença de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa. E: área de transição de criptas colônicas preservadas e criptas danificadas. F: área extensa de criptas danificadas. Objetiva 20X.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

ARTIGO I

Tabela 1 – Características dos estudos pré-clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Tabela 2 – Metodologias utilizadas nos estudos pré-clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Tabela 3 – Características dos estudos clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Quadro 1 – Principais resultados dos estudos pré-clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Quadro 2 – Principais resultados dos estudos clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Tabela 4 - Análise dos vieses (ARRIVE) dos estudos experimentais sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Tabela 5 - Análise dos vieses dos estudos clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal, segundo Downs & Black.

ARTIGO II

Tabela 1 – Composição das dietas controle e experimental.

Tabela 2 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico no peso dos órgãos e medida do cólon de camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Tabela 3 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nos testes bioquímicos em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Tabela 4 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico no desenvolvimento dos focos de criptas aberrantes no cólon de camundongos.

Tabela 5 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nos produtos da oxidação e atividade das enzimas antioxidantes em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Tabela 6 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nas concentrações fecais dos ácidos graxos de cadeia curta em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta
Akt - Proteína kinase B
ALT - Alanina aminotransferase
AMPK - *AMP-activated protein kinase*
AOM - Azoximetano
AST - Aspartato aminotransferase
B. - *Bifidobacterium*
BAL - Bactérias do ácido lático
CA - Criptas aberrantes
Camund. - Camundongos
CAT - Catalase
CCR - Câncer colorretal
CEA - Coeficiente de eficácia alimentar
CLA - Ácido linoléico conjugado
CON - Controle
COX-2 - Cicloxigenase 2
DII - Doenças inflamatórias intestinais
DMH - 1,2-dimetilhidrazina
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSS - Dextran sulfato de sódio
EGFR - *Epidermal growth factor receptor*
F - Fêmea
FA - Fosfatase alcalina
FCA - Focos de criptas aberrantes
FOS - Frutooligossacarídeos
GGT - Gama glutamiltransferase
GPx - Glutaciona peroxidase
GSH - Glutaciona reduzida
GST - Glutaciona-S-Transferase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
IFN- γ - Interferon γ

IgA - Imunoglobulina A secretória
iHDAC - Inibidor das histonas desacetilases
IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
L. - *Lactobacillus*
M - Macho
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos
MDA - Malondialdeído
MIP-1 β - *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*
NF-kB - *Factor nuclear kappa B*
NK - *Natural Killer*
NLM - Nódulos linfáticos mesentéricos
PBY - Produto a base de yacon
PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*
PRO - Probiótico
Sem. - Semanas
SIM - Simbiótico
SOD - Superóxido dismutase
STAT3 - *Signal transducers and activators of transcription*
TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*
TNF- α - *Tumor Necrosis Factor-alpha*
UFC - Unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

↓ - Redução

↑ - Aumento

* - Análise de Variância ANOVA

- Teste de Kruskal-Wallis

§ - Teste t pareado

RESUMO

CRUZ, Bruna Cristina dos Santos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Avaliação dos efeitos do uso de probiótico e simbiótico na carcinogênese colorretal induzida por 1,2-dimetilhidrazina em camundongos.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Reggiani Vilela Gonçalves, Leonardo Borges Murad e Lisiane Lopes da Conceição.

O câncer colorretal (CCR) é considerado um problema de saúde pública em todo mundo e estima-se que cerca de 37% dos casos desse tipo de câncer poderiam ser prevenidos por meio de mudanças nos hábitos de vida, como a adoção de uma alimentação saudável, prática regular de atividade física e manutenção da gordura corporal adequada. Atualmente, sabe-se que a microbiota intestinal exerce forte influência sobre a ocorrência e progressão das doenças intestinais, especialmente nas situações em que se observa a perda da eubiose. Por outro lado, a administração de espécies probióticas tem sido associada à redução do risco de desenvolvimento de CCR, possivelmente devido à modificação da composição da microbiota intestinal; alteração da atividade metabólica da microbiota; degradação de compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal; produção de compostos com atividade anti-carcinogênica; imunomodulação; melhora da barreira intestinal; alteração na fisiologia do hospedeiro; e inibição da proliferação celular e indução de apoptose nas células tumorais. Associado aos probióticos, a utilização dos prebióticos (como inulina e frutooligosacarídeos), que são substratos para fermentação dessas espécies bacterianas, também tem mostrado efeitos anti-carcinogênicos. Os focos de criptas aberrantes são lesões precursoras do CCR e, por serem passíveis de reversão, tornam-se alvo potencial para intervenção mediada por fatores dietéticos que sejam capazes de modular o microambiente intestinal, alterando a resposta aos estímulos carcinogênicos. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel quimiopreventivo do probiótico VSL#3[®] isolado ou associado a um concentrado à base de yacon, rico em inulina e frutooligosacarídeos, na carcinogênese colorretal. Como desfecho principal, espera-se que o uso do probiótico e do simbiótico reduza a incidência dos focos de criptas aberrantes no cólon de camundongos induzidos com 1,2-dimetilhidrazina.

ABSTRACT

CRUZ, Bruna Cristina dos Santos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Evaluation of the effects of probiotic and symbiotic use on colorectal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Reggiani Vilela Gonçalves, Leonardo Borges Murad and Lisiane Lopes da Conceição.

Colorectal cancer (CRC) is considered a public health problem worldwide and it is estimated that about 37% of the cases of this type of cancer could be prevented through changes in life habits, such as the adoption of a healthy diet, regular practice of physical activity and maintenance of body fat. Currently, it is known that intestinal microbiota exerts strong influence on the occurrence and progression of intestinal diseases, especially in situations where the loss of eubiose. On the other hand, the administration of probiotic species have been associated with reducing the risk of development of CCR, possibly due to the modification of the composition of the intestinal microbiota; change in the metabolic activity of microbiota; degradation of carcinogenic compounds present in the intestinal lumen; production of compounds with anticarcinogenic activity; immune modulation; improves the intestinal barrier; change the physiology of the host; and inhibition of cell proliferation and inducing apoptosis in tumor cells. Associated with the use of probiotics, prebiotics (such as inulin and fructooligosaccharides), which are substrates for fermentation of these bacterial species, also has shown anticarcinogenic effects. The aberrant crypts foci are precursor lesions of CCR and, because they are prone to reversal, become a potential target for intervention mediated by dietary factors which are able to modulate the intestinal microenvironment, changing your response to carcinogenic stimuli. Thus, the present study aimed to investigate the chemopreventive role of VSL#3[®] probiotic isolated or associated with a yacon-based concentrate rich in inulin and fructooligosaccharides in colorectal carcinogenesis. As a primary outcome, probiotic and symbiotic use is expected to reduce the incidence of aberrant crypt foci in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-induced mice.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer colorretal (CCR) apresenta alta prevalência no mundo e sua incidência tem aumentado nos últimos anos^{1,2}; é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, sendo que 55% dos casos ocorrem em países desenvolvidos. A estimativa de incidência de CCR no Brasil para o ano de 2018 é de 17.380 novos casos para homens e de 18.980 novos casos para mulheres². A etiologia do CCR está associada a fatores genéticos e hábitos alimentares, como a baixa ingestão de fibras, frutas, legumes e elevado consumo de carnes vermelhas, processadas e de gordura³⁻⁵.

A carcinogênese colorretal envolve alterações bioquímicas, morfológicas, genéticas e epigenéticas na mucosa do tecido⁶. Dentre as alterações patológicas, estão desde discretas lesões microscópicas, como os focos de criptas aberrantes (FCA) até adenomas e adenocarcinomas⁷. As alterações moleculares, os achados morfológicos e o padrão de crescimento têm contemplado a hipótese de que os FCA são lesões precursoras do CCR e é sugerido que a tradicional seqüência adenoma-carcinoma na progressão tumoral seja estendida para FCA-adenoma-carcinoma⁷.

Evidências científicas permitem sugerir a participação da microbiota intestinal no desenvolvimento e progressão do CCR⁸⁻¹⁰. A perda da eubiose, falhas nos mecanismos de barreira e do sistema imune intestinal estão associados ao direcionamento da carcinogênese por microrganismos¹¹. Por outro lado, estudos com gêneros bacterianos probióticos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* demonstraram efeitos benéficos na prevenção do câncer de cólon *in vivo* e *in vitro*¹²⁻¹⁴.

As espécies probióticas apresentam baixa atividade das enzimas β -glucuronidase, azoredutase e nitroredutase, envolvidas na formação de agentes genotóxicos. Assim, essas bactérias quando colonizam o cólon atuam diminuindo os agentes nocivos e aumentam a excreção de xenobióticos¹⁵. Ainda podem atuar como imunomoduladoras, estimulando a resposta imune contra células cancerosas, reduzindo a proliferação celular e induzindo à apoptose¹⁶.

O probiótico VSL#3[®] é uma mistura de oito estirpes de bactérias produtoras de ácido lático (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium*

breve). Estudos têm reportado os benefícios desse probiótico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DIIs) e em modelos experimentais de colite¹⁷⁻²¹. Tais efeitos são atribuídos à manutenção da barreira intestinal, alteração na composição da microbiota intestinal, redução do estresse oxidativo, supressão da atividade do NF-kB, bem como dos níveis de citocinas pró-inflamatórias^{20,21}. No entanto, apenas um número limitado de pesquisas tem tratado o efeito da VSL#3[®] em modelos experimentais de câncer de cólon e os resultados são contraditórios^{13,22}.

Os simbióticos também são apontados como moduladores da microbiota intestinal e, dessa forma, poderiam estar envolvidos na redução do risco de desenvolvimento do CCR^{23,24}. Os prebióticos alteram a composição e atividade metabólica da microbiota, estimulando o crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em detrimento de espécies patogênicas. Podem ainda contribuir para aumentar a atividade de enzimas de detoxificação de carcinógenos, como o citocromo P450 e os níveis de glutathione-S-transferase, envolvidas no metabolismo de compostos eletrofílicos e associados ao estresse oxidativo¹².

Os prebióticos quando fermentados pela microbiota produzem os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o ácido acético, propiônico e butírico^{12,25-27}. Sugere-se que esses componentes atuam na prevenção do câncer de cólon por serem capazes de ativar genes que codificam proteínas responsáveis por controlar a proliferação celular e/ou apoptose^{28,29}. O ácido butírico, especificamente, estaria relacionado à redução da incidência de FCAs e no aumento do número de células caliciformes nas criptas que protegem a mucosa^{30,31}.

A yacon é uma raiz originária da região dos Andes e é considerada um prebiótico por ser rica em inulina e FOS. Estes não são hidrolisados pelas enzimas digestivas, chegam ao cólon intactos e são fermentados pela bactérias probióticas³². A yacon promove modulação da resposta inflamatória, induzindo o aumento da produção de imunoglobulina A secretória (IgA) e de interleucina-10 e 4 em animais e humanos. Dentre os benefícios à mucosa do cólon estão o aumento do número, profundidade e bifurcações das criptas intestinais, o aumento da produção de AGCC e a redução do pH intestinal³³.

Considerando que os probióticos e simbióticos são capazes de modular a microbiota intestinal e alterar as respostas do organismo aos estímulos carcinogênicos, hipotetizou-se que o uso do probiótico VSL#3[®] isolado ou associado

a um produto concentrado a base de yacon, seja capaz de reduzir a incidência de lesões pré-neoplásicas induzidas quimicamente no cólon de camundongos.

Referências

- 1.Chen J, Chen Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. **Med Oncol.** 2014; 31(8):82.
- 2.Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2018. 130p.
- 3.Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. **Cancer Prev Res.** 2011; 4(2):177-84.
- 4.Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. **Dig Dis.** 2011, 29(2):222-8.
- 5.International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. Oct. 2015.
- 6.Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci.** 2004; 95(6):475-80.
- 7.Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. **J Carcinog.** 2009; 8:5.
- 8.Worthley DL, Leu RKL, Whitehall VL, Conlon M, Christophersen C, Belobrajdic D, et al. A human, doubleblind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. **Am J Clin Nutr** 2009; 90:578–86.
- 9.Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoui-Jamali MA, Prakash S. Design and validation of an orally administrated active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer *ApcMin/+* mouse model. **Appl Microbiol Biotechnol** (2017) 101:1999-2019.
- 10.Chung EJ, Do E, Kim SY, Cho EA, Kim DE, Pak S, Hwang SW, et. al. Combination of metformin and VSL#3 additively suppresses western-style diet induced colon cancer in mice. **European Journal of Pharmacology.** 2017; 794:1–7.
- 11.Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Semin Immunol.** 2007; 19(2):70-83.
- 12.Gupta AK, SCHOEN R. E. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of coloncarcinogenesis in humans? **Curr Opin Gastroenterol.** 2009; 25(1):59-65.

13. Appleyard, CB et al. Pretreatment with the probiotic VSL#3 delays transition from inflammation to dysplasia in a rat model of colitis-associated cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2011;301:G1004–G1013.
14. Bassaganya-Riera, J et al. Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria. **Plos One**. 2012; 7:4.
15. Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. 1997; 18(3):517-21.
16. Zhang M, Fan X, Fang B, Zhu C, Zhu J, Ren F. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **J Microbiol** 2015;53:398–405.
17. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2009;296:G1140–G1149.
18. Uronis JM, Arthur JC, Keku T, et al. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**. 2011;17:289–297.
19. Mencarelli A, Distrutti E, Renga B, et al. Probiotics modulate intestinal expression of nuclear receptor and provide counter-regulatory signals to inflammation-driven adipose tissue activation. **PLoS One**. 2011;6:e22978.
20. Dai C, Zheng CQ, Meng FJ, et al. VSL#3 probiotics exerts the antiinflammatory activity via PI3k/Akt and NF-kappaB pathway in rat model of DSS-induced colitis. **Mol Cell Biochem**. 2013; 374:1-11.
21. Shen J, Zuo ZX, Mao AP. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. **Inflamm Bowel Dis**. 2014; 20:21-35.
22. Arthur, JC et al. VSL#3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer. **Scientific Reports**, 2013;3:2868. DOI: 10.1038.
23. Leu RKL, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**. 2010;31:246-51.
24. Hakansson A, Branning A, Molin G, Adawi D, Hagslatt ML. Blueberry Husks and Probiotics Attenuate Colorectal Inflammation and Oncogenesis, and Liver Injuries in Rats Exposed to Cycling DSS-Treatment. **Plos One**. 2012 (7).

25. Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, 2003; 133:2485-93.
26. Manning, TS.; Gibson, GR. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, 2004; 18(2):287-98.
27. Rose, DJ.; Demeo, MT.; Keshavarzian, A.; Hamaker, BR. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. **Nutrition Reviews**, 2007; 65(2):51-62.
28. Hughes, R.; Rowland, IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans the rat colon. **Carcinogenesis**, 2001; 22:43-47.
29. Munjal, U.; Gleib, M.; Pool-Zobel, B. L.; Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. **British Journal of Nutrition**, 2009; 1-9.
30. Pool-zobel BL. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Br J Nutr**. 2005; 93 Suppl 1:S73-90.
31. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **Br J Nutr**. 2003; 89(5):597-606.
32. Vilhena, SMC.; Camara, FLA., Kakihara ST. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, 2000;18(1),5-8.
33. Aybar, MJ.; Sanchez Riera, AN.; Grau, A.; Sanchez, SS. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sanchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2001; 74, 125-132.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos do uso do probiótico VSL#3[®] isolado ou combinado a um produto concentrado à base de yacon na carcinogênese colorretal induzida por 1,2-dimetilhidrazina em camundongos.

2.2 Específicos

- Revisar e discutir os principais mecanismos responsáveis pela atividade anti-carcinogênica dos probióticos e simbióticos;
- Avaliar os efeitos do uso do probiótico e simbiótico na concentração das enzimas hepáticas e produtos do metabolismo renal no soro;
- Avaliar os efeitos do uso do probiótico e simbiótico na incidência das lesões pré-neoplásicas;
- Determinar a capacidade antioxidante do probiótico VSL#3[®] e do produto à base de yacon e as concentrações dos fenólicos totais no produto à base de yacon;
- Avaliar os efeitos do uso do probiótico e simbiótico na atividade das enzimas antioxidantes e nas concentrações dos produtos da oxidação, no fígado e ceco;
- Determinar a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta presentes nas fezes;
- Avaliar a permeabilidade intestinal;
- Realizar a análise morfométrica do cólon e determinar o escore histopatológico.

3. ARTIGO I

3.1 ARTIGO DE REVISÃO

Título: Relevância pré-clínica e clínica dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal: Uma revisão sistemática.

Relevância pré-clínica e clínica dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal: Uma revisão sistemática

Resumo

Objetivo: O objetivo desta revisão sistemática foi identificar e sintetizar as evidências científicas encontradas em estudos clínicos e experimentais sobre o uso de probiótico e/ou simbiótico na redução do risco do câncer colorretal, além de esclarecer os potenciais mecanismos envolvidos. **Métodos:** Os estudos foram selecionados nas bases de dados *Pubmed*, *Science Direct* e *Lilacs*, sendo obtido 33 estudos com modelos animais e três estudos com humanos. A qualidade dos estudos foi avaliada de acordo com as Diretrizes *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE), para os estudos com animais e segundo os critérios propostos por Downs & Black (1998), para os estudos com humanos. **Resultados:** A maioria dos estudos demonstrou efeito benéfico dos probióticos/simbióticos na carcinogênese colorretal e os mecanismos subjacentes identificados foram: alteração da composição e da atividade metabólica da microbiota intestinal; redução da inflamação; indução de apoptose e/ou inibição da proliferação de células tumorais; modulação da resposta imune; melhora da função da barreira intestinal; produção de compostos com atividade anticarcinogênica e modulação do estresse oxidativo. Quanto à avaliação dos vieses de publicação dos estudos experimentais, apenas doze critérios foram plenamente atendidos pelos autores e nove deles não foram identificados em nenhum estudo. Os três estudos com humanos foram classificados como de boa qualidade; as informações indisponíveis referiram-se exclusivamente às análises estatísticas. **Conclusão:** Estudos adicionais que esclareçam outros mecanismos de ação devem ser delineados e executados, especialmente ensaios clínicos controlados.

Palavras-chave: Câncer colorretal; probióticos; simbióticos; prebióticos; microbiota intestinal; prevenção do câncer.

Preclinical and clinical relevance of probiotics and symbiotics in colorectal carcinogenesis: A systematic review

Abstract

Objective: The objective of this systematic review was identified and synthesized as scientific evidences found in clinical and experimental studies on the use of probiotic and / or symbiotic in the reduction of colorectal cancer risk, as well as clarification of the potential mechanisms involved. **Methods:** The studies were selected in the databases *Pubmed*, *Science Direct* and *Lilacs*, being retrieved from 33 studies with animal models and three studies with humans. The quality of the studies was assessed according to the guidelines ARRIVE for animal studies and according to the criteria proposed by Downs & Black, for studies with humans. **Results:** Most studies showed a beneficial effect of the probiotics/symbiotic in colorectal carcinogenesis and the underlying mechanisms were identified: changing composition and metabolic activity of intestinal microbiota; reducing inflammation; induction of apoptosis and/or inhibition of the proliferation of tumor cells; modulation of the immune response; improvement of intestinal barrier function; production of compounds with anticarcinogenic activity and modulation of oxidative stress. **Conclusion:** Additional studies to clarify other mechanisms of action should be performed, especially well-controlled clinical trials.

Key-words: Colorrectal cancer; probiotics; symbiotics; prebiotics; intestinal microbiota; cancer prevention.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) apresenta alta prevalência no mundo, sendo a terceira causa de morte por câncer¹. Segundo a Organização Mundial da Saúde², até 2030 ocorrerão cerca de 17 milhões de mortes, 27 milhões de novos casos e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença. A etiologia do CCR é multifatorial e envolve fatores relacionados à genética e ao estilo de vida, que propiciam alterações no microambiente intestinal e favorecem o desenvolvimento da doença, destacando o processo inflamatório crônico, aumento de mutações em células expostas à carcinógenos e lesões displásicas proliferativas³.

Nos últimos anos intensificaram-se as discussões sobre o papel dos microrganismos que colonizam o intestino no processo carcinogênico. A disbiose tem sido apontada como um fator de risco para o CCR⁴, uma vez que foram observadas diferenças na composição da microbiota intestinal entre indivíduos saudáveis e doentes^{3,5}. A microbiota humana é composta por trilhões de microrganismos que habitam o organismo e que se distribuem em locais específicos formando comunidades complexas, sendo o maior grupo encontrado no cólon (aproximadamente 10^{11} microrganismos g^{-1} conteúdo intestinal)⁶. Estes cooperam para manutenção da saúde do hospedeiro ao atuarem de forma local e sistêmica, regulando a homeostase e a atividade neuromuscular do intestino^{7,8}.

A microbiota intestinal pode interferir no processo carcinogênico por ser capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro; alterar o metabolismo das células tumorais, regular as taxas de proliferação e apoptose celulares⁹, além de atuarem na desconjugação e absorção de ácidos biliares, conhecidos por aumentarem o estresse oxidativo, dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e instabilidade na membrana mitocondrial¹⁰.

A administração de probióticos é a abordagem mais utilizada para modular a microbiota intestinal. Segundo a definição da FAO/WHO (2002)¹¹, os probióticos são “*microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.*” Geralmente referem-se às bactérias do ácido lático (BAL), como os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterias* (amplamente utilizados e reconhecidamente seguros); entretanto, existem outros gêneros como *Streptococcus*, *Pedicoccus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e a levedura *Saccharomyces boulardii* que também são usados como probióticos¹². Sugere-se que a ingestão de

probióticos na concentração de 10^6 a 10^{11} UFC/dia seria capaz de reduzir a incidência do CCR, bem como a gravidade de outras doenças intestinais¹³.

Os prebióticos, que são ingredientes alimentares não-digeríveis, também podem exercer efeitos protetores contra o câncer, por serem capazes de estimular seletivamente o crescimento de bactérias benéficas e a atividade microbiana no cólon¹⁴. Ao serem fermentados, promovem o aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), podendo alterar respostas relacionadas ao desenvolvimento do câncer, como a inibição da proliferação ou estímulo a apoptose celular¹⁵.

Sugere-se que a combinação de probiótico e prebiótico, denominada simbiótico, pode ser mais eficaz na prevenção do CCR quando comparado ao uso isolado dos mesmos. Um estudo recente demonstrou que a combinação do prebiótico amido resistente e do probiótico *Bifidobacterium lactis* foi capaz de estimular significativamente a apoptose em células do cólon de ratos após exposição a um agente carcinogênico¹⁶.

Embora estudos *in vitro* e *in vivo* tenham proposto mecanismos pelos quais os probióticos e/ou simbióticos possam proteger o organismo do desenvolvimento do CCR, há ainda, pouca evidência para esclarecer os efeitos específicos às respostas biológicas relacionadas à carcinogênese colorretal, especialmente no que concerne à composição da microbiota intestinal e as alterações decorrentes da instalação da doença. Somam-se a isto as grandes variações metodológicas envolvendo os mecanismos de ação e os marcadores carcinogênicos. Portanto, é crítico compilar dados de vários estudos, a fim de esclarecer as discrepâncias acima mencionadas.

Neste contexto, a revisão sistemática representa uma poderosa ferramenta que incorpora a variabilidade entre os estudos e permite a obtenção de uma estimativa global da utilização de probióticos e simbióticos no CCR. Baseado nisto, esta revisão sistemática foi desenvolvida para determinar se há uma base racional na utilização de probióticos/simbióticos no Câncer colorrectal e quais os principais mecanismos envolvidos neste processo. Além disto, realizamos neste trabalho uma análise crítica dos estudos pré-clínicos e clínicos, com o objetivo de melhorar a qualidade dos relatos e assim impedir a reprodução de falhas metodológicas que poderiam comprometer o desenvolvimento de novos estudos.

Métodos

Busca dos Artigos

Os estudos foram selecionados após pesquisa nos bancos de dados eletrônicos *U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health* (PubMed), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e *Scencedirect*. Aqueles considerados elegíveis foram identificados no período de 20 a 23 de maio de 2017, por meio de consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e *Medical Subject Headings* (MeSH). Foram utilizados os termos de busca em inglês e seus correspondentes em português: *neoplasms, probiotic, symbiotic, colorectal neoplasms, prevention, Lactobacillus, Bifidobacterium e aberrant crypt foci*. Os operadores lógicos “AND” ou “OR” foram utilizados para combinar os descritores. Dois pesquisadores realizaram a busca de forma independente nos bancos de dados citados, considerando apenas trabalhos originais (clínicos ou pré-clínicos), que tinham como objetivo pesquisar o efeito protetor dos probióticos e/ou simbióticos na carcinogênese colorretal. Foram aplicadas restrições linguísticas para seleção de artigos em inglês e português e realizado busca de artigos relevantes na lista de referências dos artigos previamente selecionados. A busca dos estudos foi realizada de acordo com o diagrama de fluxo dos itens do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA)¹⁷.

Estratégia de Seleção dos Artigos

A seleção inicial foi baseada na leitura de títulos e resumos. Após triagem, foram excluídos os estudos em duplicatas e aqueles que não apresentavam desenho experimental com caráter preventivo. Foram selecionados também estudos cujo objetivo foi avaliar os efeitos dos probióticos/simbióticos na evolução do câncer associado às doenças inflamatórias intestinais (DII). Foram excluídos estudos *in vitro*, revisões, consensos, carta ao editor, teses e dissertações. Os estudos selecionados nesta primeira triagem foram lidos na íntegra e avaliados quanto ao preenchimento dos critérios de elegibilidade estabelecidos. Aqueles indisponíveis na

internet foram solicitados aos seus respectivos autores. A seleção foi restrita a trabalhos originais, desenvolvidos com modelos murinos ou humanos, publicados nos últimos 10 anos, na língua inglesa ou portuguesa.

Extração de Dados

Os dados extraídos dos estudos foram compilados em formulário próprio desenvolvido pelos autores. Para os estudos experimentais, foram considerados variáveis de interesse: título da publicação, autores, ano, país; características do modelo experimental (linhagem, número de animais, sexo, idade, peso corporal); métodos da pesquisa (tipo de alojamento, número de grupos experimentais, número de animais por grupo, presença de grupo controle e intervenção no grupo controle); protocolo de indução do câncer colorretal/lesões pré-neoplásicas; probiótico/simbiótico utilizado, dose e tempo de administração, resultados principais. Para os estudos clínicos, foram investigados: título da publicação, autores, ano, país; objetivo do estudo; características da população de estudo (sexo, idade, número de participantes); desenho do estudo (randomizado, controlado com placebo, duplo-cego); intervenção adotada (tipo de probiótico/simbiótico, dose, tempo de administração) e principais resultados.

Avaliação da Qualidade dos Artigos

Os estudos experimentais incluídos foram avaliados quanto ao risco de viés de acordo com os critérios descritos na Diretriz *Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments* (ARRIVE)¹⁸. Esses critérios são baseados em descrições curtas de características essenciais de estudos que utilizam modelo animal, como: base teórica e metodológica, objetivo de pesquisa, refinamento dos métodos analíticos, desenho estatístico, cálculo amostral e medidas de resultado¹⁸. Para os estudos clínicos, foram adotados os critérios de qualidade proposto por Downs & Black (1998)¹⁹, por meio de um *checklist*. O *escore* de qualidade de cada artigo foi baseado em 13 domínios e correspondeu ao somatório do total de itens avaliados, atribuindo-se a pontuação

“um” para o critério satisfeito e “zero” para o critério não satisfeito (Tabela 2). A qualidade dos estudos foi classificada como pobre ($\leq 4/13$), intermediária (5-8/13) e boa ($\geq 9/13$), de acordo com a pontuação obtida²⁰.

Resultados

Estudos Selecionados

O diagrama de fluxo com o número de artigos selecionados ou excluídos em cada etapa foi construído de acordo com as diretrizes PRISMA (Figura 1). Duzentos e quarenta e sete artigos foram identificados nas bases de dados *PubMed* (n=191), *ScienceDirect* (n=55) e *Lilacs* (n=1). Destes, duzentos e dezesseis foram excluídos: duplicatas (n=119), títulos e resumos que não se adequaram ao tema (n=44), revisões (n=30), estudos *in vitro* (n=19), estudos relatando efeito curativo dos probióticos/simbióticos (n=3) e indisponíveis para acesso (n=1). Trinta e um estudos foram inicialmente selecionados para compor essa revisão sistemática e, após busca na lista de referências dos mesmos, cinco outros estudos relevantes foram incluídos, totalizando trinta e seis. Os estudos selecionados foram em sua maioria (91,7%; n=33), estudos pré-clínicos (experimentais conduzidos com modelo animal).

Dados Qualitativos

Os estudos obtidos foram realizados em 14 países diferentes, sendo a maioria na Índia e Coreia (33,3%, n=12), seguido da China e Estados Unidos (22,2%, n=8) (Tabelas 1 e 3). Para os estudos experimentais, os modelos utilizados foram ratos (51,5%; n=17) e camundongos (48,5%; n=16), a maioria machos (63,3%; n=21). Em apenas um estudo foi utilizado animais machos e fêmeas (3,0%). Curiosamente, cinco estudos (15,2%) não relataram o sexo dos animais e quatro estudos (12,1%) não explicitaram o número total de animais utilizados no experimento. A idade dos animais no início do experimento variou de 3 a 12 semanas; quatro dos estudos (12,1%) não disponibilizaram essa informação. O peso corporal inicial dos animais não foi relatado na maioria dos estudos (60,6%).

Quanto à forma de indução das lesões pré-neoplásicas/tumores, 48,5% (n=16) dos estudos utilizaram a droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH); dois estudos (6,0%) realizaram a inoculação de células tumorais CT-26 e outros dois (6,0%) foram conduzidos com animais modificados geneticamente, que desenvolvem a doença espontaneamente (Tabela 2). Em relação ao tratamento aplicado nos grupos controle, foi observado que a dieta padrão para roedores foi a mais utilizada (33,3%) dos estudos, especialmente quando o probiótico/simbiótico foi adicionado à dieta na forma liofilizada; já para os grupos controle dos experimentos em que os animais receberam o probiótico/simbiótico via gavagem, foi utilizada com maior frequência, solução salina (24,2%) (Tabela 2).

Nos estudos experimentais, os probióticos utilizados contemplaram 22 diferentes espécies de microrganismos (sendo oito espécies de *Lactobacillus*, seis *Bifidobacterium*, dois *Streptococcus*, dois *Bacillus*, um *Clostridium*, um *Lactococcus*, um *Enterococcus* e um gênero do reino Fungi: *Saccharomyces*), de diversas subespécies. Destes, dois estudos (6,0%) usaram a levedura *Saccharomyces boulardii* e 18,2% (n=6), o probiótico VSL#3[®], um mix concentrado composto por oito cepas bacterianas. De modo geral, os probióticos mais utilizados foram *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*. Os probióticos foram administrados isolados ou combinados com outros probióticos (n=28; 84,9%), prebióticos (n=2; 6,0%) ou ainda, associados a drogas (n=3; 9,1%). Em relação à via de administração, 42,4% (n=14) dos estudos relataram ter sido via oral, porém não especificaram a forma (se por gavagem, adicionado na água ou na dieta); 30,3% (n=10) informaram ter realizado gavagem. A dose de administração variou amplamente, com contagens entre 10⁶ a 10¹¹ UFC/dia, assim como a duração da intervenção, de cinco dias a 42 semanas (Tabela 2).

Quanto aos estudos com humanos, apenas três foram incluídos (Tabela 3). Estes contemplaram um total de 45.296 indivíduos, sendo que 45.241 indivíduos participaram do estudo prospectivo⁵⁴, 17 participaram do estudo de intervenção com probiótico e simbiótico⁵⁵ e 38 participaram do estudo de intervenção com diferentes probióticos⁵⁶. Foram incluídos homens e mulheres, com idade variando de 21 a 86 anos. Dois dos estudos foram do tipo *crossover*, controlado, randomizado, duplo cego e um estudo prospectivo, com 12 anos de acompanhamento. Um dos estudos de intervenção foi composto por três grupos: probiótico (*Bifidobacterium lactis*), prebiótico (amido de milho rico em amilose) e simbiótico (ambos); o segundo, pela

combinação dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LC705 e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. Nos dois casos, os probióticos foram disponibilizados aos participantes na forma de cápsulas ou saches (10^9 a 10^{10} UFC/dia). Cada intervenção teve duração de 4 semanas. O estudo prospectivo avaliou a ingestão de iogurte e o risco de desenvolvimento do CCR, sendo os resultados estratificados por tercís de ingestão. Foi observada variação na ingestão de 0 g a 98 g ao dia.

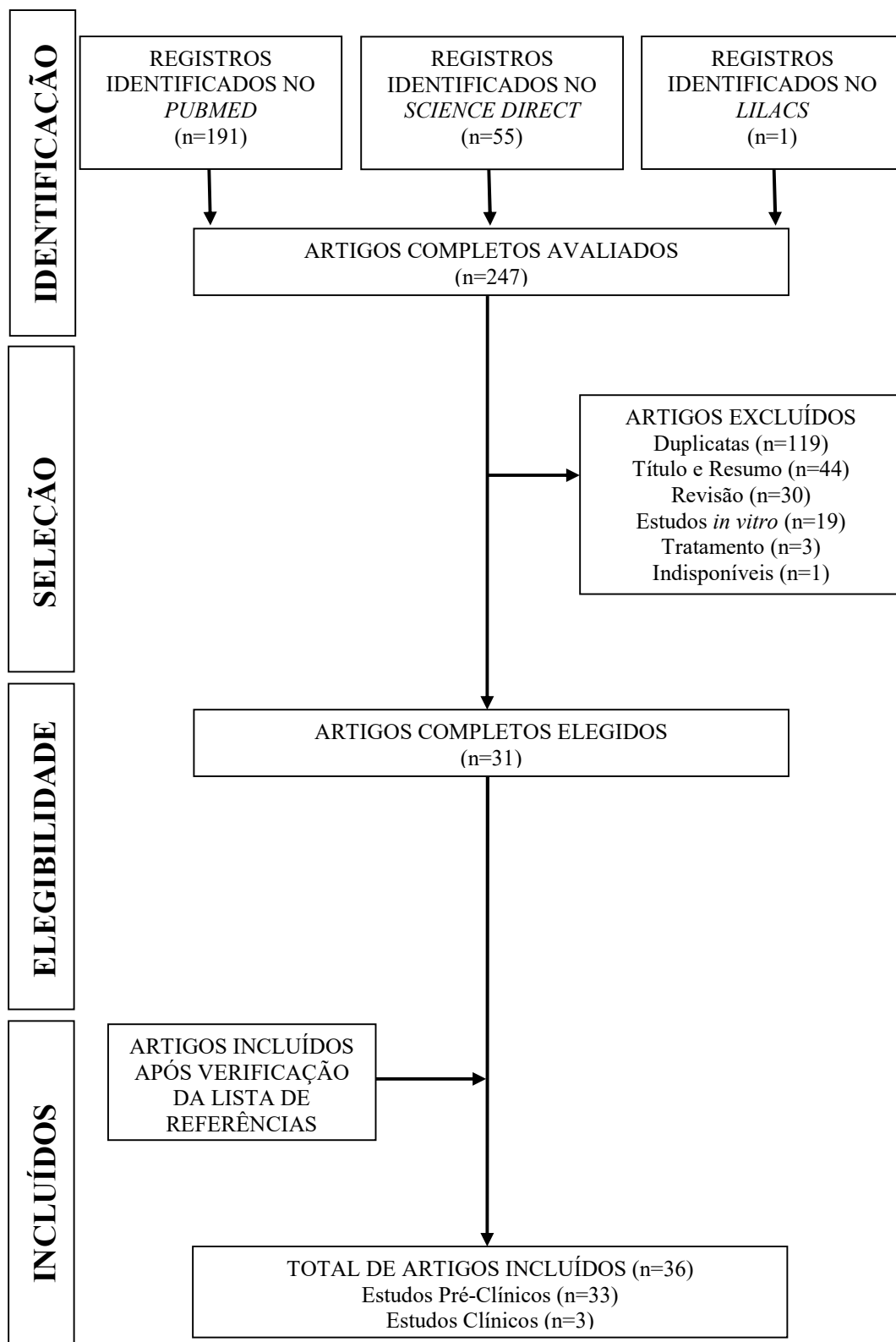


Figura 1 – Diagrama de fluxo dos resultados da pesquisa.

Tabela 1 – Características dos estudos pré-clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Referência	País	Modelo Animal	Nº de Animais	Sexo/Idade (semanas)	Peso Inicial	N de grupos	N/ grupo
Jingtao Hu, et. al., 2015 [21]	China	Camund. BALB/c	30	F/6-8	> 20g	3	10
Kahouli, et. al., 2017 [22]	Canadá	Camund. C57BL/6J–Apc ^{Min} /J	10	M/4	?	2	5
Chen, et. al., 2015 [23]	China	Camund. C57BL/6	72	M/6-8	21.9-23.0g	6	12
Kumar, et. al., 2012 [24]	Índia	Ratos Wistar	36	M/?	?	6	6
Urbanska, et al., 2009 [25]	Canadá	Camund. C57BL/6 J-Apc ^{Min/+}	?	M/7-8	20-25g	3	?
Mohania, et. al, 2014 [26]	India	Ratos Wistar	120	M/3	?	5	24
Arthur, et. al., 2013 [27]	EUA	Camund. IL-10 ^{-/-} 129/SvEv	?	M/7-12.	?	2	?
Park, et. al., 2007 [28]	Coreia	Ratos F344	30	M/5	185±10g	3	10
Lee, et. al., 2007 [29]	Coreia	Ratos F344	18	M/5	185 ± 10 g	2	9
Mohania, et. al., 2013 [30]	India	Ratos Wistar	120	M/3	22.2-23.2g	5	24
Zhang, et. al., 2015 [31]	China	Ratos F344	24	M/5	?	3	8
Walia, et. al., 2015 [32]	India	Ratos Sprague-Dawley	36	F/?	125–175g	6	6
Zhu, et. al., 2014 [33]	China	Ratos F344	50	F/5	?	5	10
Verma, et. al., 2013 [34]	India	Ratos Sprague-Dawley	72	?/ ?	100-150g	12	6
Liboredo, et. al., 2013 [35]	Brasil	Camundongo Swiss	50	M/8	?	5	10
Chang, et. al., 2012 [36]	Canadá	Ratos F344	45	M/5	130g	3	15

Tabela 1 – Continuação.

Referência	País	Modelo Animal	Nº de Animais	Sexo/Idade (semanas)	Peso Inicial	N de grupos	N/ grupo
Leu, et. al., 2010 [37]	Austrália	Ratos Spargue Dawley	180	M/5	?	6	30
Kumar, et. al., 2010 [38]	Índia	Ratos ?	100	?/10	?	4	25
Purohit, et. al., 2009 [39]	EUA	Ratos Fisher	140	M/6	?	7	20
Chen, et. al., 2009 [40]	EUA	Camund. C57BL/6J Min/+ (Apc ^{Min})	14	?/7	?	2	6 ou 8
Sivieri, et. al., 2008 [41]	Brasil	Ratos Wistar	30	M/4	90g	3	10
Narushima, et. al., 2010 [42]	Japão	Ratos F344 e camund. Ras H2	29/?	M/F/4-8	?	3 ou 4	?
Dominici, et. al., 2014 [43]	Itália	Camund. CD-1	20	M/4-6	25-30g	4	5
Villarini, et. al., 2008 [44]	Itália	Ratos Sprague-Dawley	20	M/4-8	140-180g	4	5
Chen, et. al., 2012 [45]	Taiwan	Camund. BALB/cByJ	?	F/4-6	20g	4	?
Hakansson, et. al., 2012 [46]	Suécia	Ratos Sprague-Dawley	48	F/?	?	6	8
Chung, et. al., 2017 [47]	Coreia	Camund. BALB/c	50	M/4	?	5	10
Bassaganya et. al., 2012 [48]	EUA	Camund. C57BL/6, IL-10 ^{-/-} , 129/SvEv	120	?	?	3	30 ou 60
Appleyard, et. al., 2011 [49]	Porto Rico	Ratos Sprague-Dawley	45	M/6	?	2	22 ou 23
Eun-ju Do, et. al., 2016 [50]	Coreia	Camund. C57BL/6	?	M/4	?	4	?
Talero, et. al., 2015 [51]	Espanha	Camund. C57BL/6	240	F/6	?	5	10 ou 20
Lee, et. al., 2015 [52]	Coreia	Camund. BALB/c	60	?/6	?	6	10
Kim, et. al., 2010 [53]	Coreia	Camund. C57BL/6	15	M/6	?	3	5

F: feminino; M: masculino; ?: não especificado.

Tabela 2 – Metodologias utilizadas nos estudos pré-clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Ref.	Indução do CCR	Controle	Probiótico/Simbiótico	Via de Administração	Dose	Duração Intervenção (sem.)
[21]	Células CT-26	Salina	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Oral/gavagem	1.0x10 ⁸ UFC 1.0x10 ⁹ UFC	14 dias; 1x/sem., por 3 sem.
[22]	Animais transgênicos	Salina	<i>Lactobacillus fermentum</i> NCIMB 5221 <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	Oral/gavagem	1.0x10 ¹⁰ UFC (0,5x10 ¹⁰ cada)	12
[23]	DMH (20mg/kg), 1x/sem, por 28 sem.	Salina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Oral/?	2.5x10 ⁸ UFC cada	28
[24]	DMH (20mg/kg), 1x/sem, por 6 sem.	Dieta para roedores	<i>Lactobacillus plantarum</i> AS1	Oral/?	10 ⁹ UFC/ml	26
[25]	Animais transgênicos	Salina	<i>Lactobacillus acidophilus</i> microencapsulado	Oral/gavagem	Iogurte (2%) ou salina (0.85%)	10
[26]	DMH (40mg/kg), 2x/sem, por 2 sem.	Leite de búfala,	Probiótico Dahi	Oral/?	2x10 ⁹ UFC/g cada	8, 16 ou 32
[27]	AOM (10mg/kg), por 6 sem.	?	Probiótico VSL#3	Oral/?	10 ⁹ UFC/animal	17
[28]	DMH (30mg/kg), 1x/sem, por 6 sem.	Dieta rica em gordura, pobre em fibras	<i>Bacillus polyfermenticus</i>	Oral/dieta	3x10 ⁸ UFC/1.3 g	10
[29]	DMH (30mg/kg), 1x/sem, por 6 sem.	Dieta para roedores	<i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD	Oral/ dieta	3x10 ⁶ UFC/dia	10
[30]	DMH (40mg/kg), 2x/sem, por 2 sem.	Leite de búfala	Probiótico Dahi	Oral/?	2x10 ⁹ UFC/g cada	32

Tabela 2 – Continuação.

Ref.	Indução do CCR	Controle	Probiótico/Simbiótico	Via de Administração	Dose	Duração Intervenção (sem.)
[31]	DMH (30mg/kg), por 10 sem.	Salina	<i>Lactobacillus salivarius</i> Ren	Oral/gavagem	5x10 ¹⁰ UFC/kg	32
[32]	DMH (30mg/kg), 2x/sem. ou 1x/sem.	Dieta para roedores e veículo da DMH	<i>Lactobacillus plantarum</i> AdF10 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Oral/gavagem	10 ¹⁰ UFC/dia	16
[33]	DMH (30mg/kg), 1x/sem., por 10 sem.	Salina	<i>Lactobacillus salivarius</i> Ren	Oral/?	1x10 ¹⁰ UFC/kg ou 5x10 ⁸ UFC/kg	15
[34]	DMH (20mg/kg), dose única	Dieta para Roedores	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG MTCC 1408 <i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423 <i>Lactobacillus plantarum</i> MTCC 1407 <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDC 15 <i>Bifidobacterium bifidum</i> NCDC 234	Oral/?	1x10 ⁹ lactobacilos/0.1 mL	7
[35]	DMH (25mg/kg), 1x/sem., por 6 sem.	Água	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Saccharomyces boulardii</i>	Oral/água	3x10 ⁸ UFC/ml (exceto no grupo Lac/Bif que recebeu 6x10 ⁸ UFC/mL)	14
[36]	DMH (20mg/kg), 1x/sem., por 10 sem.	Dieta rica em gordura	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI342	Oral/dieta	2x10 ⁹ UFC/ml	10

Tabela 2 – Continuação.

[37]	AOM (15mg/kg), 1x/sem., por 2 sem.	Dieta para roedores	Simbiótico: <i>Bifidobacterium lactis</i> + amido de milho com alto teor de amilose	Oral/dieta	1×10^{11} UFC/g de dieta	26
[38]	DMH (20mg/kg), 1x/sem., por 15 sem.	Dieta para roedores	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> Cultura curd	Oral/?	30% do total da dieta	40
[39]	AOM (15mg/kg), 1x/sem., por 2 sem.	Leite acidificado com glucono- δ lactona	<i>Streptococcus thermophilus</i> 5581 <i>Streptococcus thermophilus</i> 5842 <i>Streptococcus thermophilus</i> 4239 <i>Streptococcus thermophilus</i> PH <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> 3984 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> JFR1	Oral/?	Dieta com 30% do leite fermentado com probiótico	30
[40]	Sem indução	?	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Oral/?	3×10^8 UFC/ml (água) e 6×10^8 UFC 3x/sem (gavagem)	9
[41]	DMH (20mg/kg), 1x/sem, por 15 sem	Dieta para roedores	<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183	Oral/gavagem	10^8 UFC/mL, 3 mL/kg	42
[42]	PhIP (75mg/kg), 2 sem.; DMH (20mg/kg) por 20 sem.	Leite Fermentado	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> 2038 <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> 1131	Oral/?	10% (v/v) do iogurte	4
[43]	PhIP (100 mg/kg)	Salina	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IMC501	Oral/gavagem	10^9 UFC/ml, 10ml/kg	10 dias
[44]	DMH (15 mg/kg), dose única	Salina	<i>Lactobacillus casei</i>	Oral/gavagem	10^9 bacteria/ml, 10 ml/kg	5 dias

Tabela 2 – Continuação.

[45]	Células CT-26	Dieta para roedores	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Oral/?	1x10 ⁸ UFC/animal	2
[46]	DSS 4% por 7 dias (11 ciclos)	Dieta para roedores	<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> 16737 <i>Lactobacillus plantarum</i> 15313 Cascas de mirtilo	Oral/?	B. infants 2x10 ⁹ UFC L. grasseri 1x10 ⁹ UFC L.plantarum 2x10 ⁹ UFC Mirtilo (61 ou 122g)	24
[47]	AOM (10 mg/kg) e DSS 2% por 7 dias	Dieta AIN 76-A e Ocidental	Probiótico VSL#3	Oral/?		8
[48]	AOM (10mg/kg) na 6 ^a sem. e DSS 2% por 7 dias	Água	Probiótico VSL#3	Oral/gavagem	1,2x10 ⁹ UFC/animal	16
[49]	TNBS (5mg/kg), 2x/sem, por 10 sem	Água	Probiótico VSL#3	Oral/água	5 bilhões de UFC/100 g de peso corporal	18
[50]	AOM (10mg/kg) e DSS 2% por 7 dias (2 ciclos)	Dieta para roedores	Probiótico VSL#3	Oral/?	1.3 milhões de bactérias/dia	6
[51]	DSS 0,7% por 7 dias	Água	Probiótico VSL#3	Oral/água	5 bilhões de UFC/100 g de peso corporal	Variável: 85 dias (5 ciclos), 170 dias (10 ciclos) e 255 dias (15 ciclos)
[52]	AOM (10mg/kg) e DSS 2% por 7 dias	Salina	<i>Lactobacillus plantarum</i> (células viáveis) <i>Lactobacillus plantarum</i> (células não viáveis)	Oral/?	Baixa dose 4x10 ⁹ UFC/kg/dia; alta dose 4x10 ¹¹ UFC/kg/dia	8
[53]	AOM (10mg/kg) e DSS 2% por 5 dias (3 ciclos)	Água	<i>Bifidobacterium lactis</i> KCTC 5727	Oral/gavagem	Alta dose 2x10 ¹⁰ UFC/dia; Baixa dose 2 x10 ⁹ UFC/dia	9

UFC: unidade formadora de colônia; DMH: 1,2-dimetilhidrazina; AOM: azoximetano; NA: não se aplica; HAMS: *high-amylas*

Tabela 3 – Características dos estudos clínicos sobre o uso de probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Referência	Objetivo do Estudo	Características da População (sexo e idade)	Nº Participantes	Tipo de Estudo	Nº de participantes/grupo	Probiótico/Simbiótico	Dose	Duração do Tratamento
Pala, et. al., 2011 [54]	Investigar a associação entre ingestão de iogurte e o CCR em uma coorte multicêntrica - EPIC-Itália	14.178 homens e 31.063 mulheres, com idade entre 30 e 86 anos	45.241 indivíduos completaram o estudo	Estudo prospectivo, com 12 anos de acompanhamento	NA	Ingestão de iogurte	A ingestão de iogurte variou de 0 g/dia no tercil inferior, e 85 g/dia (homens) e 98 g/dia (mulheres) no tercil superior	Acompanhamento por 12 anos (média 9 anos)
Worthley, et. al., 2009 [55]	Estabelecer as consequências luminais, epiteliais e epigenéticas relativas à suplementação dietética com prebiótico, probiótico e simbiótico	Homens e mulheres, entre 21 e 75 anos	20 (inicial), 17 indivíduos completaram o estudo	Estudo crossover, duplo cego, randomizado e controlado com placebo	<i>Bifidobacterium lactis</i> (n=19) HAMS (n=18) Simbiótico (n=18)	<i>Bifidobacterium lactis</i> HAMS Simbiótico	<i>Bifidobacterium lactis</i> (10 ⁹ UFC/g; 5g) HAMS (25 g) Simbiótico (mesmas quantidades)	Cada intervenção teve duração de 4 semanas, sem período de <i>washout</i>
Hatakka, et. al., 2008 [56]	Avaliar a atividade das enzimas β-glucosidase, β-glucuronidase e urease	Homens com idade entre 24 e 55 anos	38	Estudo crossover, randomizado, duplo cego, controlado com placebo	37 ou 38	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> com <i>Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS</i>	2x10 ¹⁰ UFC de cada bactéria	4 semanas por intervenção

NA: não se aplica; HAMS: *high-amylose maize starch*; UFC: unidade formadora de colônia.

Principais achados

Os estudos pré-clínicos demonstraram que o uso de probiótico/simbiótico apresenta efeito protetor na carcinogênese colorretal. Dos 33 estudos incluídos, 57,6% (n=19) apresentaram redução significativa na incidência de tumores; 21,2% (n=7) apresentaram redução na incidência de lesões pré-neoplásicas e dois (6,0%) estudos apresentaram redução em ambos (Quadro 1). Outros desfechos como a diminuição da incidência de pólipos intestinais, úlceras colônicas e lesões com alto grau de displasia foram avaliados em dois estudos^{22,46} e também obtiveram resultados positivos com o uso do probiótico/simbiótico. Dois estudos^{43,44} não apresentaram como desfecho principal a redução da incidência de tumores ou lesões pré-neoplásicas; nos dois casos, o objetivo dos autores foi avaliar o efeito dos probióticos no dano direto ao DNA, na modulação do balanço oxidativo e/ou na alteração da composição e atividade da microbiota intestinal; ambos observaram efeito protetor com o uso do probiótico. Apenas um estudo²⁷ obteve efeito negativo com a utilização do probiótico, sendo observado aumento da penetrância tumoral, multiplicidade, grau de displasia e invasão de adenocarcinomas.

Ressalta-se que em 27,3% (n=9) dos estudos, o objetivo foi avaliar o uso do probiótico/simbiótico na carcinogênese colorretal associado à doença inflamatória do intestino, especialmente a colite^{27,46-53}. Nesses casos, observou-se um componente inflamatório essencial para o desenvolvimento da doença. O protocolo de indução do CCR envolve a exposição ao agente cancerígeno (DMH ou AOM, na maioria das vezes) associado à outra droga que provoca colite (DSS ou TNBS); pode ser utilizado ainda um modelo animal modificado geneticamente, como os camundongos nocaute para interleucina 10 (IL-10^{-/-}) que desenvolvem colite espontaneamente (Tabela 2).

Os estudos com humanos apresentaram maior divergência nos resultados (Quadro 2). Pala et. al. (2011)⁵⁴ demonstraram que o risco de desenvolvimento do CCR reduziu com o consumo de iogurte. Por outro lado, Worthley, et. al. (2009)⁵⁵ não observaram alterações significativas em possíveis marcadores da carcinogênese colorretal (como a proliferação das criptas intestinais, as concentrações de amônia, dos AGCC, da proteína C-

reativa e citocinas) após utilização de probiótico, prébiótico ou simbiótico. Hatakka, et. al., (2008)⁵⁶ observaram aumento da contagem fecal de lactobacilos e propionobactérias, associado à redução da atividade das enzimas β -glucosidase e da urease, sugerindo um efeito protetor dos probióticos.

Quadro 1 – Principais resultados dos estudos pré-clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Referência	Avaliação Histopatológica	Avaliação Imunológica	Marcadores Inflamatórios e Moleculares	Avaliação do balanço Oxidativo	Análise Microbiológica/ Atividade Microbiana
Jingtao Hu, et. al., 2015 [21]	↓ crescimento tumoral no grupo <i>L. plantarum</i> comparado aos grupos que receberam <i>L. rhamnosus</i> e salina em 25 e 30 dias após inoculação das células tumorais.	↑ da contagem de células CD8 ⁺ ; da razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ; das células NK e secreção de IFN- γ . Promoção da diferenciação de células CD4 ⁺ tipo Th1 no grupo <i>L. plantarum</i> .	-	-	-
Kahouli, et. al., 2017 [22]	↓ 40% na formação de pólipos intestinais nos grupos que receberam <i>L. fermentum</i> associado ao <i>L. acidophilus</i> comparado ao grupo controle.	-	↓ β -catenina nuclear e da expressão de Ki-67 no grupo probiótico.	-	-
Chen, et. al., 2015 [23]	↓ incidência e tamanho dos tumores nos grupos <i>Bacillus subtilis</i> ou <i>Clostridium butyricum</i> (40% e 30%, respectivamente) comparado ao grupo controle.	↓ expressão de células Th2 e Th17; ↓ da razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no sangue periférico nos grupos <i>B. subtilis</i> ou <i>C. butyricum</i> .	↓ expressão de Tlr4–Myd88–NF- κ B, IL-22 e survivina; ↑ expressão de p21; ↓ expressão de NF- κ B, p-ERK e β -catenina nos grupos que receberam probiótico.	-	-
Kumar, et. al., 2012 [24]	↓ incidência e tamanho dos tumores nos grupos que receberam <i>L. plantarum ASI</i> comparado ao controle. Efeito observado nos grupos que receberam o probiótico antes ou após a indução do CCR.	-	-	↓ peroxidação lipídica e da atividade das enzimas SOD, CAT e GST no cólon e no plasma dos grupos que receberam o probiótico comparado ao grupo controle.	-
Urbanska, et al., 2009 [25]	↓ incidência de adenomas e neoplasias gastrointestinal intraepitelial com menor grau de displasia no grupo que recebeu <i>L.</i>	-	↓ concentrações de IL-6 no grupo que recebeu probiótico adicionado ao iogurte. ↓ da concentração dos ácidos	-	-

	<i>acidophilus</i> microencapsulado adicionado ao iogurte comparado aos grupos controle.		biliares fecais nos grupos que receberam probiótico no iogurte ou em solução salina.		
Mohania, et. al, 2014 [26]	↓ número total dos FCA, da razão CA/FCA e dos focos de depleção de mucina no grupo que recebeu o probiótico Dahi, associado ou não ao antiinflamatório piroxicam, comparado ao grupo controle (leite de búfala).	-	↓ PCNA no grupo tratado com probiótico Dahi, associado ou não ao piroxicam.	-	-
Arthur, et. al., 2013 [27]	↑ penetrância tumoral, multiplicidade, grau de displasia e da invasão de adenocarcinomas no grupo que recebeu VSL#3.	-	-	-	↓ abundância do taxon bacteriano atribuído ao gênero <i>Clostridium</i> na microbiota.
Park, et. al., 2007 [28]	↓ FCA e da razão CA/FCA no grupo que recebeu <i>Bacillus polyfermenticus</i> comparado ao grupo controle (DMH).	-	-	↑ potencial antioxidante do plasma e ↓ peroxidação lipídica (↓ dos dienos conjugados) no grupo probiótico.	-
Lee, et. al., 2007 [29]	↓ 40% na incidência das lesões pré-neoplásicas no grupo que recebeu <i>Bacillus polyfermenticus</i> comparado ao grupo controle.	-	-	-	-
Mohania, et. al., 2013 [30]	↓ incidência e tamanho dos tumores nos grupos tratados com probiótico Dahi isolado ou combinado com o antiinflamatório piroxicam.	-	-	↓ peroxidação lipídica no fígado e cólon e ↑ da atividade da enzima GST no grupo probiótico Dahi isolado ou combinado com piroxicam.	↓ atividade da β-glucuronidase nas fezes dos grupos probiótico Dahi isolado ou combinado com piroxicam.
Zhang, et. al., 2015 [31]	↓ incidência de tumores no grupo que recebeu o probiótico <i>L. salivarius</i> Ren comparado ao grupo controle.	-	-	-	↓ quantidade de <i>Ruminococcus</i> sp., bactérias <i>Clostridiales</i> e <i>Bacteroides dorei</i> ; e ↑ da quantidade de <i>Prevotella</i> .

Walia, et. al., 2015 [32]	↓ incidência, multiplicidade e tamanho dos tumores nos grupos <i>L. plantarum</i> AdF10 ou <i>L. rhamnosus</i> GG comparados ao controle.	-	↓ expressão de COX 2 e ↓ nas concentrações séricas de ácido siálico total nos grupos que receberam probiótico.	-	-
Zhu, et. al., 2014 [33]	↓ contagem e multiplicidade dos FCA nos grupos que receberam baixa ou alta dose do probiótico <i>Lactobacillus salivarius</i> Ren comparados ao grupo controle (DMH).	-	↓ PCNA nos grupos que receberam baixa ou alta dose do probiótico.	-	↓ <i>Bacillus</i> e <i>Ruminococcaceae</i> ; ↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Clostridium</i> após a administração do probiótico em baixa ou alta dose. ↓ atividade da enzima azorredutase nos grupos que receberam probiótico.
Verma, et. al., 2013 [34]	↓ contagem dos FCA no cólon dos animais que receberam probiótico. O percentual de redução nos grupos <i>L. GG</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> e <i>B.bifidum</i> foi de 98%, 45%, 96%, 89% e 74%, respectivamente, comparados ao grupo controle (DMH).	-	-	-	↓ atividade da nitroredutase nos grupos <i>L.casei</i> e <i>L.plantarum</i> ; ↓ atividade da β-glucuronidase nos grupos <i>L.GG</i> e <i>L.acidophilus</i> ; ↓ atividade da β-glucosidase no grupo <i>B. bifidum</i> comparados ao controle.
Liboredo, et. al., 2013 [35]	↓ contagem dos FCA nos grupos <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (55,7%) e <i>B. animalis</i> var. <i>lactis</i> Bb12 (45,1%), comparados ao controle. Os grupos que receberam <i>L. delbrueckii</i> e <i>B. animalis</i> combinados ou <i>S. boulardii</i> não apresentaram redução.	-	-	-	-
Chang, et. al., 2012 [36]	↓ número dos FCA no grupo que recebeu <i>L. acidophilus</i> KFRI342 e dieta rica em gordura (41,1%) comparado ao grupo controle	-	-	-	↓ contagem de bactérias aeróbicas e de <i>E. coli</i> ; ↓ do pH fecal; ↓ da atividade da enzima β-glucuronidase e da

	(DMH). Essa diferença não foi significativa quando comparada ao grupo que recebeu apenas dieta rica em gordura.				β -glucosidase no grupo que recebeu probiótico e dieta rica em gordura comparado aos controles.
Leu, et. al., 2010 [37]	↓ incidência e multiplicidade dos tumores no cólon dos grupos que receberam o simbiótico (<i>B. lactis</i> e amido resistente) comparado ao grupo controle e aos grupos que receberam <i>B. lactis</i> ou amido resistente isoladamente. ↑ altura das criptas no grupo simbiótico ou amido resistente.	-	↓ número de células marcadas com PCNA, por cripta, nos grupos 'amido resistente' e simbiótico.	-	-
Kumar, et. al., 2010 [38]	↓ incidência, multiplicidade e tamanho dos tumores nos grupos que receberam o probiótico curd (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e cultura curd <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>) ou apenas a cultura curd, comparado ao controle.	-	-	-	-
Purohit, et. al., 2009 [39]	↓ incidência e multiplicidade dos tumores nos grupos <i>S. thermophilus</i> ST5581, <i>S. thermophilus</i> ST 5842, <i>S. thermophilus</i> ST-4239, <i>S. thermophilus</i> ST-PH, <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB 3984 e <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> JFR1 comparados ao grupo controle. ↓ tamanho do tumor nos grupos <i>S. thermophilus</i> ST5581, <i>S. thermophilus</i> ST-4239 e <i>L. delbrueckii</i> .	-	↓ atividade da COX-2 em todos os grupos que receberam probiótico.	-	-
Chen, et. al.,	↓ do número, diâmetro e na área	-	↓ PCNA (66% x 20%), fosfo-	-	-

2009 [40]	superficial total dos tumores intestinais no grupo que recebeu <i>S. boulardii</i> comparado ao grupo controle, além de menor pontuação para o grau de displasia.		EGFR (17% x 6,5%), p-Akt (70,4% x 49,6%) e ↑ de células apoptóticas (4,5% x 15%) no grupo probiótico comparado ao controle.		
Sivieri, et. al., 2008 [41]	↓ da contagem dos FCA totais, da razão CA/FCA, da incidência de adenocarcinomas (70% x 30%) e do tamanho dos tumores no grupo <i>E. faecium</i> comparado ao controle.	-	↑ concentrações de IL-4, IFN- γ e TNF- α no grupo que recebeu probiótico.	-	-
Narushima, et. al., 2010 [42]	Experimento 1: ↓ número de FCA e no total de CA no grupo que ingeriu iogurte comparado aos grupos que receberam dieta controle ou leite não fermentado. Experimento 2: ↓ número de tumores no grupo iogurte comparado ao grupo controle (diferença significativa apenas para os ratos machos).	-	-	-	-
Dominici, et. al., 2014 [43]	-	-	-	-	↑ contagem de lactobacilos; ↓ da atividade das enzimas β -glucuronidase e N-acetyl- β -glucosaminidase no grupo que recebeu <i>L. rhamnosus</i> IMC501.
Villarini, et. al., 2008 [44]	-	-	-	↓ atividade da SOD no grupo suplementado com <i>L. casei</i> comparado ao grupo controle (DMH). O grupo que recebeu <i>L. casei</i> sem indução, apresentou redução na EROD, GSH, GST e GPx comparado ao controle	↑ contagem de lactobacilos; ↓ da atividade da enzima β -glucuronidase no grupo probiótico.

				negativo (salina).	
Chen, et. al., 2012 [45]	↓ tamanho dos tumores no grupo suplementado com <i>L. acidophilus</i> NCFM comparado ao grupo controle.	↓ expressão de células com resposta MHC classe I no cólon, nos linfonodos mesentéricos e baço dos animais que receberam o probiótico.	↑ apoptose das células tumorais; ↑ da concentração de caspase 3 e 9, ↓ da Bcl-2; ↓ da expressão de CXCR4 no cólon, nos NLM e em tecidos metastáticos extra-intestinais no grupo probiótico.	-	-
Hakansson, et. al., 2012 [46]	↓ número de úlceras colônicas e lesões com baixo grau de displasia no grupo simbiótico (casca de mirtilo associado com <i>B. infantis</i> DSM 15159, <i>L. gasseri</i> DSM 16737 e <i>L. plantarum</i> DSM 15313). Nos grupos que receberam apenas o probiótico foi observado atenuação nas lesões hepáticas, com ↓ da infiltração inflamatória parenquimatosa e incidência de estase e translocação.	-	↓ concentrações sanguíneas de haptoglobina nos grupos que receberam casca de mirtilo (em menor ou maior quantidade) e no grupo simbiótico.	-	↓ contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> e ↑ de lactobacilos no grupo que recebeu probiótico.
Chung, et. al., 2017 [47]	↓ número de tumores no grupo que recebeu VSL#3 associado à droga metformina, comparado ao grupo controle. O tamanho dos tumores reduziu significativamente com o uso de metformina ou da terapia combinada.	-	↓ número de células Ki-67 positivas, ↓ da infiltração de macrófagos na base das criptas e ↑ da reatividade com o anticorpo anti-claudina-1 no grupo que recebeu a terapia combinada. O probiótico VSL#3 promoveu ativação do AMPK e ERK, porém a combinação com a metformina foi mais efetiva na fosforilação do ERK. Observou-se ainda ↓ da expressão de ciclina D1 e Bcl-2, com parada do ciclo celular na fase G2/M com a terapia combinada.	-	-

Bassaganya et. al., 2012 [48]	↓ número de adenomas e adenocarcinomas nos grupos que receberam probiótico VSL#3 ou CLA, comparado ao grupo controle. O uso do CLA, mas não com VSL#3, ↓ infiltração de leucócitos e a espessura da mucosa do cólon.	O grupo de animais saudáveis que recebeu o VSL#3 apresentou ↑ do percentual de CD4 ⁺ nos nódulos linfáticos mesentéricos. Já os que receberam CLA, obtiveram essa resposta no baço, independente de serem saudáveis ou doentes. Observou-se ↑ de CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺ na lâmina própria, no grupo VSL#3 induzido ao CCR.	↑ expressão de CD36 e PPAR- α no cólon dos animais que receberam VSL#3 ou CLA; o uso do CLA ↓ a expressão de COX-2, enquanto o VSL#3 promoveu ↑ da expressão de angiostatina no cólon distal. Ambos ↑ a expressão de TNF- α comparado ao grupo controle.	-	-
Appleyard, et. al., 2011 [49]	↓ score total de danos macro e microscópicos com o uso do VSL#3 comparado ao grupo controle. Nenhum animal que recebeu VSL#3 desenvolveu câncer, sendo observada apenas displasia de alto grau.	-	↑ expressão de angiostatina e do receptor de vitamina D no cólon proximal e distal dos animais que receberam VSL#3, sendo a expressão maior em áreas de tecido normal e menor nas áreas com carcinoma.	-	Os animais que receberam VSL#3 apresentaram uma correlação positiva entre o índice de displasia do cólon e a riqueza ou diversidade microbiana no tecido.
Eun-ju Do, et. al., 2016 [50]	↓ formação de tumores e infiltração de macrófagos no cólon nos grupos que receberam VSL#3 isolado ou associado à droga BSZ.	-	↓ expressão de MIP-1 β , MCP-1, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17, IL-22 e pSTAT3 nos grupos que receberam o VSL#3 isolado ou combinado com a droga. Houve ainda ↓ da expressão de Bcl-2 e ↑ da expressão de Bax, no grupo que recebeu a terapia combinada.	-	-
Talero, et. al., 2015 [51]	↓ incidência de tumores (45% x 20%) e do dano macroscópico no cólon do grupo suplementado com VSL#3, comparado ao controle.	-	↓ PCNA positivas nos grupos que receberam VSL#3 antes ou durante a indução do câncer. Observaram-se ainda ↓ da	-	-

	↓ incidência de displasia de baixo grau nos grupos que receberam o VSL#3 antes e durante a indução do CCR (75% e 65%, respectivamente); para displasia de alto grau a ↓ foi de 10% e 5% (no 10º ciclo de indução) e 45% e 20% (no 15º ciclo).		expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e COX-2.		
Lee, et. al., 2015 [52]	↓ do desenvolvimento de adenocarcinomas, áreas de displasia e disrupções estruturais no grupo tratado com <i>L. plantarum</i> comparado controle.	↑ da concentração de IgA fecal nos grupos que receberam o probiótico.	↓ expressão de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , iNOS, COX-2 e Bcl-2; ↑ da expressão de p21, p53 e Bax nos grupos que receberam o probiótico.	-	-
Kim, et. al., 2010 [53]	↓ da incidência, do tamanho dos tumores e infiltração de células inflamatórias no cólon dos animais suplementados com <i>B. lactis</i> comparado ao controle (DSS).	-	O probiótico inibiu a degradação do I κ B- α , além de suprimir a ativação do NF- κ B. Houve ainda ↓ da expressão da COX-2.	-	-

↓: redução; ↑: aumento; *L.*: *Lactobacillus*; *B.*: *Bifidobacterium*; NK: natural killer; IFN- γ ; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutatona-S-transferase; FCA: foco de cripta aberrante; CA: cripta aberrante; IL: interleucina; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular; DNA: ácido desoxirribonucleico; DMH: 1,2-dimetilhidrazina; COX-2: cicloxigenase 2; AGCC: ácido graxo de cadeia curta; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; EROD: 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase; GSH: glutatona reduzida; GPx: glutatona peroxidase; NLM: linfonodos mesentéricos; CLA: ácido linoleico conjugado; BSZ: balsalazida; CCR: câncer colorretal; DSS: dextran sulfato de sódio.

Quadro 2 – Principais resultados dos estudos clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal.

Referência	Avaliação Histopatológica	Avaliação Imunológica	Marcadores Inflamatórios e Moleculares	Avaliação do Estresse Oxidativo	Análise Microbiológica/ Atividade Microbiana
Pala, et. al., 2011 [54]	-	-	-	-	-
Worthley, et. al., 2009 [55]	A intervenção não alterou a proliferação da cripta e a altura das células.	-	Não foram observadas diferenças significativas na concentração da amônia e dos AGCC fecais, e da proteína C reativa e citocinas no soro.	-	↑ <i>Lachnospiraceae</i> spp. O pH das fezes não diferiu entre os grupos.
Hatakka, et. al., 2008 [56]	-	-	-	-	↑ da contagem fecal de lactobacilos e propionobactérias. ↓ da atividade da β-glucosidase e da uréase.

AGCC: ácido graxo de cadeia curta; CCR: câncer colorretal.

Após a análise dos resultados obtidos e de acordo com as conclusões dos autores, indicamos os possíveis mecanismos de ação pelos quais os probióticos/simbióticos atuam no processo de carcinogênese colorretal (Figura 2). A modulação nas vias de inibição da proliferação celular e/ou da indução de apoptose foi a mais citada (n=13), seguida do controle da inflamação (n=12). A alteração da composição da microbiota intestinal (n=9) e da atividade da microbiota (n=7) também foram mencionadas com frequência. No entanto, em cinco estudos^{29,35,38,42,54} não foi possível identificar o mecanismo subjacente à redução da incidência das lesões pré-neoplásicas/tumores devido à ausência de análises complementares. No estudo em que foi observado aumento na tumorigênese associado ao uso do probiótico VSL#3²⁷, os autores atribuíram estes resultados à redução significativa do gênero *Clostridium* presente na microbiota.

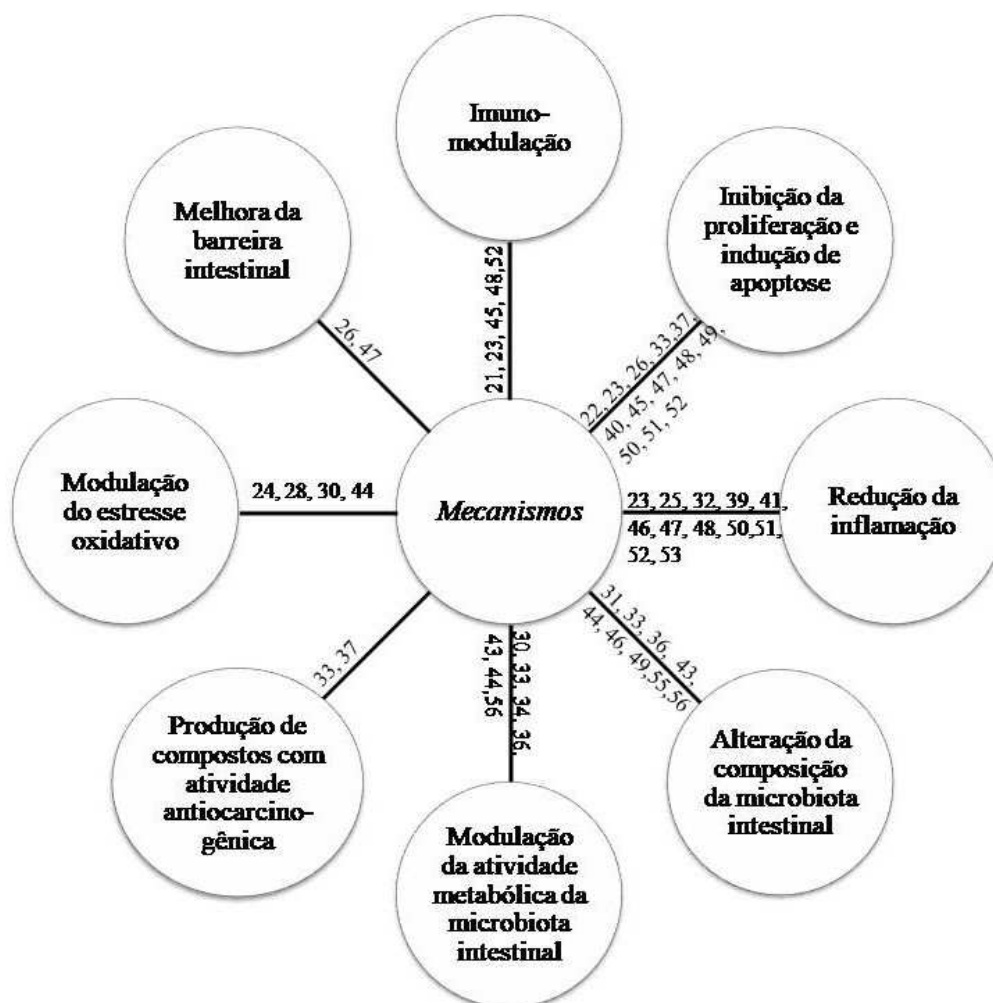


Figura 2 – Potenciais mecanismos de ação dos probióticos e simbióticos na redução do risco de desenvolvimento do câncer colorretal.

Análise dos Viéses dos Estudos

Após avaliação dos estudos selecionados, observou-se que todos apresentaram o título adequado, assim como os resumos e contextualização científica suficiente (Tabela 4). Informações sobre declaração ética não foram apresentadas em três estudos (9,0%)^{31,34,38}. Quanto aos procedimentos experimentais, todos os estudos relataram a dose do probiótico/simbiótico utilizada, a via de administração e a duração da intervenção. Por outro lado, nenhum deles especificou o período do dia em que a administração foi realizada, assim como o local e a justificativa para via de administração escolhida. Quanto à definição da dose, apenas 12,1% (n=4) dos estudos^{22,48,49,51} apresentaram a razão da escolha. Todos os experimentos que incluíram animais geneticamente modificados disponibilizaram essa informação. Procedimentos prévios aplicados aos animais foram relatados por apenas dois estudos (6,0%)^{22,27}.

Em relação ao tamanho da amostra, nenhum estudo detalhou como foi realizado o cálculo. As informações sobre como os animais foram alocados nos grupos experimentais, foi descrita em 66,7% (n=22) dos estudos e os métodos estatísticos utilizados para cada análise foram descritos em 96,9% (n=32) dos estudos.

A descrição do estado de saúde dos animais antes do tratamento foi informada em apenas dois estudos^{32,48}. Informações sobre média e desvio-padrão foram fornecidas em 100% dos estudos. Apenas um estudo²⁷ informou ter alterado o protocolo experimental em função da ocorrência de efeitos adversos, nesse caso a duração do experimento foi reduzida. Dados sobre a taxa de mortalidade foi descrita em três estudos (9,1%)^{27,46,49}. Os comentários sobre as limitações do estudo, como limitação do modelo animal e resultados imprecisos não foram identificados em nenhum estudo. Em relação ao destaque de novas descobertas que provavelmente beneficiarão outras espécies ou sistemas, incluindo a relevância para a biologia humana, foram observados apenas em 12,1% (n=4) dos artigos^{30,31,34,43}.

Segundo a pontuação obtida de acordo com os critérios sugeridos por Downs & Black (1998), os três estudos incluídos nesta revisão foram classificados como de boa qualidade (pontuação ≥ 9 pontos) (Tabela 5). As

informações que não foram relatadas pelos estudos referiram-se à descrição do poder estatístico, à deleção de dados e os valores reais de probabilidade para os principais resultados. Não foi descrito também se o número de participantes incluídos no estudo era representativo da população (apesar de um dos estudos ter acompanhado um número elevado de indivíduos).

Tabela 4 – Continuação.

	Jingtao Hu, et. al., 2015 [21]	Kahouli, et. al., 2017 [22]	Chen, et. al., 2015 [23]	Kumar, et. al., 2012 [24]	Urbanska, et. al., 2009 [25]	Mohania, et. al., 2014 [26]	Arthur, et. al., 2013 [27]	Park, et. al., 2007 [28]	Lee, et. al., 2007 [29]	Mohania, et. al., 2013 [30]	Zhang, et. al., 2015 [31]	Walia, et. al., 2015 [32]	Zhu, et. al., 2014 [33]	Verma, et. al., 2013 [34]	Libredo, et. al., 2013 [35]	Chang, et. al., 2012 [36]	Leu, et. al., 2010 [37]	Kumar, et. al., 2010 [38]	Purohit, et. al., 2009 [39]	Chen, et. al., 2009 [40]	Sivieri, et. al., 2008 [41]	Narushima, et. al., 2010 [42]	Dominici, et. al., 2014 [43]	Villarini, et. al., 2008 [44]	Chen, et. al., 2012 [45]	Hakansson, et. al., 2012 [46]	Chung, et. al., 2017 [47]	Bassaganya et. al., 2012 [48]	Appleyard, et. al., 2011 [49]	Eun-ju Do, et. al., 2016 [50]	Talero, et. al., 2015 [51]	Lee, et. al., 2015 [52]	Kim, et. al., 2010 [53]	Sum	Percentage			
References																																						
Experimental animals																																						
Information regarding on animal species	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32	96.9		
Strain of the animals	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32	96.9	
Sex of the animals	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	28	84.8	
Animals weigth range	✓		✓		✓			✓	✓	✓		✓		✓		✓					✓		✓	✓	✓											13	39.4	
Age of the animals	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	28	84.8	
Description of genetic modification status (Knock-out, transgenic, SPF)	NA	✓	NA	NA	✓	NA	✓	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	✓	NA	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	✓	NA	NA	NA	NA	NA	✓	8	100	
Information related to previous procedures performed on the animals		✓					✓																													2	6.0	
Housing and husbandry																																						
Housing of experimental animals (type of facility, type of cage or housing, material, number of cage companions)				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓		✓	✓	✓	✓		✓			✓	✓		✓	✓	✓	✓	21	63.6	
Husbandry conditions (breeding programme, ligh/dark cycle, temperature, of water)		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	23	69.7	
Welfare-related assessments and interventions that were carried out before, during, or after the experiment		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓						✓	✓								✓						15	45.4
Sample size																																						
Total number of animals used in each experimental and the number of animals in each experimental group	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	29	87.9
Explanation regarding the decision of the number of animals and details of sample size calculation																																					0	0
Allocation of animals into experimental groups																																						
Full details of how animals were allocated to experimental groups (including randomisation or matching)	✓	✓	✓			✓	✓			✓	✓	✓			✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	22	66.7	
Order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed																																					0	0

Tabela 4 – Continuação.

	Jingtao Hu, et. al., 2015 [21]	Kahouli, et. al., 2017 [22]	Chen, et. al., 2015 [23]	Kumar, et. al., 2012 [24]	Urbanska, et al., 2009 [25]	Mohania, et. al., 2014 [26]	Arthur, et. al., 2013 [27]	Park, et. al., 2007 [28]	Lee, et. al., 2007 [29]	Mohania, et. al., 2013 [30]	Zhang, et. al., 2015 [31]	Walia, et. al., 2015 [32]	Zhu, et. al., 2014 [33]	Verma, et. al., 2013 [34]	Libredo, et. al., 2013 [35]	Chang, et. al., 2012 [36]	Leu, et. al., 2010 [37]	Kumar, et. al., 2010 [38]	Purohit, et. al., 2009 [39]	Chen, et. al., 2009 [40]	Sivieri, et. al., 2008 [41]	Narushima, et. al., 2010 [42]	Dominici, et. al., 2014 [43]	Villarini, et. al., 2008 [44]	Chen, et. al., 2012 [45]	Hakanesson, et. al., 2012 [46]	Chung, et. al., 2017 [47]	Bassaganya et. al., 2012 [48]	Appleyard, et. al., 2011 [49]	Eun-ju Do, et. al., 2016 [50]	Talero, et. al., 2015 [51]	Lee, et. al., 2015 [52]	Kim, et. al., 2010 [53]	Sum	Percentage		
References																																					
Experimental outcomes																																					
Clear experimental outcomes assessed	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	33	100	
Statistical methods																																					
Statistical methods used for each analysis		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32	96.9	
Specification of the unit of analysis for each dataset		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	21	63.6		
Methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach																																			0	0	
Results																																					
Baseline data																																					
Description of the animals health status of animals, for each experimental grup, before treatment												✓																							2	6.0	
Number analysed																																					
Number or animals in each group included in each analysis		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓				✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓			✓	21	63.6		
Outcomes and estimation																																					
Information (Mean= Standard Deviation)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	33	100	
Adverse events																																					
Information on mortality of experimental animals (Mean=Standard Deviation)							✓																			✓			✓						3	9.1	
Modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events							✓																													1	3.0
Discussion																																					
Interpretation /scientific implications																																					
Interpretatio of the results, taking into account the study objectives and hypotheses,current theory and relevant studies	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	33	100	
Comments on the study limitations (sources of bias, limitations of the animal model, imprecision associated with the results)																																				0	0

Tabela 4 – Continuação (d).

References	
Generalisability/translation	
Comments on how the findings are likely to translate to other species or systems, including relevance to human biology	
	Jingtao Hu, et. al., 2015 [21]
	Kahouli, et. al., 2017 [22]
	Chen, et. al., 2015 [23]
	Kumar, et. al., 2012 [24]
	Urbanska, et al., 2009 [25]
	Mohania, et. al, 2014 [26]
	Arthur, et. al., 2013 [27]
	Park, et. al., 2007 [28]
	Lee, et. al., 2007 [29]
	Mohania, et. al., 2013 [30]
	Zhang, et. al., 2015 [31]
	Walia, et. al., 2015 [32]
	Zhu, et. al., 2014 [33]
	Verma, et. al., 2013 [34]
	Liboredo, et. al., 2013 [35]
	Chang, et. al., 2012 [36]
	Leu, et. al., 2010 [37]
	Kumar, et. al., 2010 [38]
	Purohit, et. al., 2009 [39]
	Chen, et. al., 2009 [40]
	Sivieri, et. al., 2008 [41]
	Narushima, et. al., 2010 [42]
	Dominici, et. al., 2014 [43]
	Villarini, et. al., 2008 [44]
	Chen, et. al., 2012 [45]
	Hakansson, et. al., 2012 [46]
	Chung, et. al., 2017 [47]
	Bassaganya et. al., 2012 [48]
	Appleyard, et. al., 2011 [49]
	Eun-ju Do, et. al., 2016 [50]
	Talero, et. al., 2015 [51]
	Lee, et. al., 2015 [52]
	Kim, et. al., 2010 [53]
	Sum
	Percentage
	4 12.1
Funding	
List of funding sources and the role of the funder(s) in the study	
Results	22 ✓ 29 ✓ 26 ✓ 25 ✓ 24 ✓ 26 ✓ 29 ✓ 28 ✓ 25 ✓ 28 ✓ 24 ✓ 28 ✓ 26 ✓ 21 ✓ 20 ✓ 23 ✓ 26 ✓ 17 ✓ 24 ✓ 23 ✓ 25 ✓ 25 ✓ 28 ✓ 27 ✓ 26 ✓ 26 ✓ 21 ✓ 23 ✓ 28 ✓ 23 ✓ 25 ✓ 21 ✓ 25
	25 75.7
NA: não se aplica.	

Tabela 5 - Análise dos vieses dos estudos clínicos sobre os efeitos dos probióticos e simbióticos na carcinogênese colorretal, segundo Downs & Black¹⁹.

	Pala, et. al., 2011 [54]	Worthley, et. al.,2009 [55]	Hatakka, et. al., 2008 [56]	Sum	Percentage
References					
Is the hypothesis/aim/objective of the study clearly described	1	1	1	3	100
Are the main outcomes to be measured clearly described in the introduction or methods section	1	1	1	3	100
Are the characteristics of the patients included in the study clearly described	1	1	1	3	100
Are the interventions of interest clearly described	1	1	1	3	100
Are the main findings of the study clearly described	1	1	1	3	100
Does the study provide estimates of the random variability in the data for the main outcomes	1	1	1	3	100
Have actual probability values been reported for the main outcomes	0	0	0	0	0
Representativeness of the population	0	0	0	0	0
Clear data deletion	0	0	0	0	0
Appropriate use of statistical test to evaluate the data	1	1	1	3	100
Absence of selection bias	1	1	1	3	100
Presence of adequate adjustment to interfering factors	1	1	1	3	100
Presence of statistical power correctly described				0	0
Results	9	9	9		

Discussão

Após a análise dos resultados dos estudos incluídos nessa revisão, foi possível identificarmos os mecanismos subjacentes ao papel protetor dos probióticos/simbióticos na carcinogênese colorretal, sendo eles: alteração da composição e da atividade metabólica da microbiota intestinal; redução da inflamação; indução de apoptose e/ou inibição da proliferação de células tumorais; modulação da resposta imune; melhora da função da barreira intestinal; produção de compostos com atividade anticarcinogênica e modulação do estresse oxidativo.

O CCR é uma doença comum e sua incidência tem aumentado ao longo das últimas cinco décadas, assim como as taxas de mortalidade. A compreensão dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença permite a criação de políticas de prevenção e de rastreamento mais efetivas no âmbito do controle da doença⁵⁷. A maioria dos casos de CCR é considerada esporádica, ou seja, estão relacionados a fatores ambientais. Os microrganismos foram associados à ocorrência de cerca de 16% dos casos de cânceres no mundo⁵⁸.

A microbiota intestinal é composta por milhares de espécies de microrganismos altamente heterogêneos e que desempenham múltiplas funções. Devido à complexidade da carcinogênese colorretal, é inviável estabelecer uma ligação conclusiva entre o risco de CCR e um único microrganismo. Assim, o CCR foi abordado como resultante do desequilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota como um todo.

O microbioma intestinal compreende a população de microrganismos que reside no intestino, sendo a densidade microbiana no intestino grosso consideravelmente superior à observada no intestino delgado ($10^{12} \times 10^2$ células/mL), paralelamente tem-se um aumento de 12 vezes no risco de câncer no intestino grosso em comparação com o intestino delgado⁵⁷. Por outro lado, sabe-se que uma microbiota intestinal equilibrada contribui para a maturação do sistema imunológico, proporciona uma barreira direta contra a colonização intestinal por agentes patogênicos⁵⁹ e participa da metabolização de compostos carcinogênicos⁶⁰.

Rafter e colaboradores (2007)⁶¹ realizaram uma intervenção com 37 indivíduos com câncer de cólon e 43 indivíduos polipectomizados, onde receberam um simbiótico composto pelos prebióticos inulina e oligofrutose e os probióticos,

Bifidobacterium lactis Bb12 e *Lactobacillus delbreuckii* spp. *ramnosus* GG, pelo período de 12 semanas. A intervenção resultou em alterações significativas na composição da microbiota intestinal, com aumento da contagem de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e redução de *Clostridium perfringens*. Observou-se ainda melhora da função da barreira intestinal, menor exposição à genotoxinas e secreção de interleucina-2 por células mononucleares de sangue periférico.

O consumo de frutooligossacarídeo (FOS) também está associado ao aumento da população de lactobacilos e bifidobactérias e redução dos microrganismos patogênicos. O FOS atua como bom substrato para os probióticos devido à atividade da β -frutose oxidase observada nessas bactérias e que não está presente em bactérias patogênicas, como *E. coli* e *C. perfringens*⁶².

A modulação da composição da microbiota é relevante uma vez que, bactérias intestinais, sobretudo as patogênicas, podem produzir agentes cancerígenos por meio da atuação de enzimas como a β -glucuronidase, β -glucosidase, azorreductase e nitroredutase. Essas enzimas são capazes de gerar metabólitos citotóxicos e genotóxicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ácidos biliares secundários, agliconas, aminas heterocíclicas aromáticas e compostos N-nitrosos⁶³ e liberar intermediários químicos carcinogênicos. A DMH, por exemplo, pode ser conjugada com o ácido glucurônico no fígado e secretada através do ducto biliar para o intestino, onde será eliminada. No entanto, a β -glucuronidase presente no intestino, é capaz de hidrolisar o complexo formado no fígado, liberando o carcinógeno ativo na mucosa intestinal; este, estimula a proliferação celular e ativa vias antiapoptóticas, que contribuem para o desenvolvimento do CCR^{64,65}.

Os probióticos exercem efeitos anticarcinogênicos, em parte pela inibição da atividade das enzimas microbianas mencionadas acima. As bactérias do ácido lático (BAL), como as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, apresentam baixa atividade dessas enzimas comparadas às bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*⁶⁶; além disso, promovem competição pela colonização do intestino e produzem substâncias antibacterianas⁶⁷. A redução da incidência dos FCA induzidas por AOM, após administração de *B. longum* esteve fortemente correlacionada com a diminuição da atividade da β -glucuronidase⁶⁵. Resultados semelhantes foram observados em 16,7% (n=6) dos estudos incluídos nessa revisão^{30,34,36,43,44}, sendo um deles conduzido com humanos⁵⁶.

O efeito protetor dos probióticos e simbióticos também foram atribuídos à produção dos AGCC, por meio da fermentação, sendo que os prebióticos são os principais substratos fermentáveis⁶⁸. Os AGCC são produzidos em quantidades variáveis (cerca de 100 a 450 mmol ao dia) e os mais estudados são os ácidos acético, propiônico e butírico. São considerados uma fonte de energia importante para os colonócitos, aumentam a produção de muco e a proliferação de células saudáveis, contribuindo para o adequado funcionamento da barreira intestinal^{67,69}.

O ácido butírico tem sido amplamente estudado como agente protetor contra o CCR: participa da defesa contra o dano oxidativo ao DNA; auxilia na regulação do balanço entre proliferação, diferenciação e apoptose dos colonócitos, regulando a atividade de proteínas como Bcl-2, Bax, caspase 3 e 7^{70,71}; estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 e reduz as citocinas inflamatórias, por meio da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB e ciclooxigenase-2^{69,71}.

Mais recentemente, foi elucidado seu papel como inibidor das histonas desacetilases, proteínas responsáveis por catalisar a remoção de grupos acetil, levando à condensação da cromatina e repressão transcricional^{72,73}. A capacidade do butirato e outros inibidores de histonas em promover a apoptose e reprimir o crescimento celular está relacionada à atenuação da ativação da via Wnt/β-catenina, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos^{74,75,76}.

Um estudo realizado com células tumorais HCT-116 tratadas com 5mM de butirato de sódio exibiram mudanças na expressão de mais de mil genes funcionalmente relacionados à via Wnt/β-catenina⁷⁶. A ativação constitutiva dessa via, causada por mutações nos genes *polipose coli adenomatosa* (APC), *β-catenina* ou *axina*, é possivelmente o evento iniciador da tumorigênese colorretal⁷⁷.

Os ácidos acético e propiônico também apresentam atividade antiinflamatória, sendo capazes de suprimir a ativação do NF-κB e regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias⁷⁸. O ácido propiônico, especificamente, pode estimular a apoptose de células tumorais, exibe atividade antiproliferativa e é o segundo ácido graxo preferencialmente utilizado pelos colonócitos como fonte de energia⁷⁹.

Dois estudos incluídos na revisão^{33,37}, que utilizaram o probiótico *Lactobacillus salivarius* Ren e o simbiótico *B. lactis* associado a amido de milho

com alto teor de amilose demonstraram aumento das concentrações dos AGCC total após a intervenção, em ambos os casos houve redução da incidência das lesões pré-neoplásicas ou tumores.

O câncer pode surgir em locais acometidos por infecção, irritação crônica ou inflamação. A associação entre inflamação crônica e doenças malignas é encontrada nas doenças inflamatórias intestinais (DII)⁸⁰. Indivíduos com DII crônica, como doença de Crohn e colite ulcerativa são considerados com alto risco para desenvolvimento de CCR⁸¹. No estudo de Arthur e colaboradores (2013)²⁷, camundongos nocautes para interleucina-10 (IL-10^{-/-}) apresentaram maior incidência de tumores associados à colite após serem tratados com o probiótico VSL#3. Apesar da microbiota ter influenciado o desenvolvimento do câncer, esse processo ainda não é claro; possivelmente, algumas bactérias são capazes de estimular mediadores pró-inflamatórios e imunológicos.

Um exemplo é o *Bacteroides fragilis*, uma bactéria comensal, que induz câncer por um mecanismo dependente de resposta Th17. Foi observado que animais que receberam *B. fragilis* apresentaram mais lesões pré-neoplásicas e tumores comparados aos controles; efeito que pode ser suprimido usando anticorpo anti-IL-17⁸². Essas observações são consistentes com a infiltração de células inflamatórias e imunes na mucosa de indivíduos com câncer⁵⁷. Por outro lado, em estudo também realizado com camundongos nocautes para IL-10, a administração de *Lactobacillus salivarius* UCC118 reduziu a inflamação da mucosa e incidência de tumores no cólon, e diminuiu as concentrações de coliformes, enterococos e *Clostridium perfringens* na microbiota intestinal⁸³.

O intestino é composto por uma mistura complexa de células, microrganismos vivos e seus metabólitos, restos de alimentos não digeridos ou não absorvidos, toxinas ambientais e metais, tornando-o um tecido vulnerável. A barreira intestinal é constantemente desafiada por agentes oxidantes e carcinogênicos que atingem o lúmen. A exposição crônica pode levar a produção descontrolada de radicais livres, redução do desequilíbrio redox e dano do DNA, contribuindo com o desenvolvimento do CCR^{84,85}. Indivíduos com câncer apresentam maior concentração de produtos da oxidação no plasma e nos tecidos comparados a indivíduos saudáveis e as próprias células tumorais liberam uma quantidade substancial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para a circulação e esse composto pode participar da invasão e proliferação dos tumores⁸⁶.

A modulação do processo oxidativo é um dos mecanismos pelos quais os probióticos/simbióticos podem prevenir a carcinogênese. Algumas bactérias são produtoras de catalase, enzima responsável por reduzir as concentrações de H₂O₂. Acredita-se que se um número adequado de bactérias catalase positivas proliferarem na região do cólon ocorrerá um aumento da capacidade antioxidante e, conseqüentemente, maior proteção da mucosa intestinal. Em estudo realizado por de Moreno e colaboradores (2008)⁸⁷, foi observado aumento da atividade da catalase e redução das concentrações de H₂O₂ em ratos induzidos quimicamente ao CCR que receberam uma estirpe de *Lactococcus lactis* produtora de catalase (1,0 x 10⁹ UFC/dia, por 16 semanas).

Constatou-se também que os simbióticos contribuem para o aumento da capacidade antioxidante do organismo; quando substratos fermentáveis são disponibilizados para a microbiota intestinal, ocorrendo maior produção dos AGCC. O ácido butírico, ao alterar o estado de acetilação das histonas, é capaz de aumentar a expressão da enzima glutathione-S-transferase (GST). A GST faz parte do grupo de enzimas da fase II do processo de biotransformação, na qual é capaz de inativar compostos carcinogênicos absorvidos pelo organismo⁸⁸.

Conclusão

O desenvolvimento do câncer está relacionado a alterações genéticas mas, sobretudo, aos fatores ambientais. O estudo da microbiota intestinal constitui uma perspectiva adicional para prevenção do CCR uma vez que a modulação do microambiente intestinal é capaz de alterar as respostas do organismo aos estímulos carcinogênicos. As evidências científicas acumuladas nos estudos *in vivo* demonstram que o uso de probióticos e simbióticos são capazes de reduzir a incidência das lesões pré-neoplásicas e tumores em modelos animais, além de retardar a progressão do câncer associado às DII. Embora o efeito protetor possivelmente seja dependente de espécies bacterianas e substratos fermentáveis específicos, não existe na literatura consenso em relação aos microrganismos a serem utilizados, dose e tempo de administração. Existe ainda, a necessidade de melhorar os relatórios das pesquisas de estudos pré-clínicos, o que exige o esforço coletivo dos autores, editores de revistas, revisores e organizações financeiras para assegurar a

reprodutibilidade, a confiabilidade e a generalização da evidência. Considerando os resultados promissores dos estudos *in vivo* e a ausência de evidência de potenciais efeitos adversos associados ao uso dos probióticos/simbióticos (salvo nas situações em que são contra-indicados), os estudos clínicos devem ser priorizados em pesquisas futuras.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) pela concessão da bolsa de estudos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil).

Referências

- 1 World Health Organization (2012). International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_pop_sel.aspx. Acessado em 16 de janeiro de 2016.
- 2 World Health Organization (2014) global health observatory: cancer mortality and morbidity. [Internet]. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/; 2014.
- 3 Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **PLoS One**, 2012; 7:1-9.
- 4 Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. **Microb Ecol**, 2013;66:462-70.
- 5 Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, et al. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. **Int J Food Microbiol**. 2008; 128:406-10.
- 6 Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease—therapeutic rationale and role. **Adv Drug Deliv Rev**, 2004; 56:809-818.
- 7 Tuohy KM, Rouzaud GC, Bruck WM, Gibson GR. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics—assessment of efficacy. **Curr Pharm Des**, 2005; 11:75-90.
- 8 Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, 2009; 326: 1694-1697.
- 9 Wang SM, Zhang LW, Fan RB, Han X, Yi HX, Zhang LL, Xue CH, Li HB, et al. 2014 Induction of HT-29 cells apoptosis by lactobacilli isolated from fermented products. **Institut Pasteur**, 2014;165:202-14.
- 10 Glinghammar B, Inoue H, Rafter JJ. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. **Carcinogenesis**, 2002 23(5):839-845.
- 11 Joint FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada,2002.
- 12 Francesca, B., Corinne, J. R., Beatrice, L. P., Ian, R. R. **European Journal of Nutrition**, 2001; 40:293-300.
- 13 Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutr Res**, 2001; 21:569-579.

- 14 Le Leu,R.K. et al. Effect of resistant starch on genotoxin-induced apoptosis, colonic epithelium, and luminal contents in rats. **Carcinogenesis**, 2003;24,1347-52.
- 15 Dronamraju,S.S. et al. Cell kinetics and gene expression changes in colorectal cancer patients given resistant starch: a randomised controlled trial. **Gut**, 2009;58,413-20.
- 16 Le Leu,R.K. et al. A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. **J. Nutr.**, 2005; 135, 996-1001.
- 17 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta- Analyses: The PRISMA Statement. **Ann Intern Med**. 2009;151:264-9. PMID: 19622511
- 18 Kilkenney C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biol**. 2010; 8: e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412> PMID: 20613859
- 19 Downs SH, Black N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. **J Epidemiol Community Health**. 1998;52(6):377–84.
- 20 Fernando M, Crowther R, Lazzarini P, Sangla K, Cunningham M, Buttner P, et al. Biomechanical characteristics of peripheral diabetic neuropathy: A systematic review and meta-analysis of findings from the gait cycle, muscle activity and dynamic barefoot plantar pressure. **Clin Biomech**. 2013;28(8):831-45.
- 21 Jingtao Hu, Wang C, Ye L, Yang W, Huang H, Meng F, Shi S, Ding Z. Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. **J. Biosci**. 2015; 40(2):269-79.
- 22 Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoui-Jamali MA, Prakash S. Design and validation of an orally administered active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer ApcMin/+ mouse model. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2017;101:1999–2019.
- 23 Chen ZF, Ai LY, Wang JL, Ren LL, Yu YN, Xu J, et al. Probiotics *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis. **Future Microbiol** 2015;10:1433-45.
- 24 Kumar A, Singh NK, Sinha PR. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Mol Biol Rep** 2010; 37:1373-6.
- 25 Urbanska AM, Bhathena J, Cherif S, Prakash S. Orally delivered microencapsulated probiotic formulation favorably impacts polyp formation in APC (Min/+) model of intestinal carcinogenesis. **Artif Cells Nanomed Biotechnol** 2012; 1-11.

- 26 Mohania D, Kansal VK, Kruzliak P. Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* modulates the formation of aberrant crypt foci, mucin depleted foci and cell proliferation on 1, 2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Rejuvenation Res.** 2014 Aug;17(4):325-33.
- 27 Arthur, JC et al. VSL#3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer. **Scientific Reports**,3:2868.DOI: 10.1038, 2013.
- 28 Park E, Jeon GI, Park J-S, Paik HD. A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. **Biol Pharm Bull** 2007; 30:569-74.
- 29 Lee NK, Park JS, Park E, Paik HD. Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. **Lett Appl Microbiol** 2007; 44:274-8.
- 30 Mohania D, Kansal VK, Sagwal R, Shah D. Anticarcinogenic effect of probiotic Dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Am J Cancer Ther Pharmacol**, 2013; 1:1-17.
- 31 Zhang M, Fan X, Fang B, Zhu C, Zhu J, Ren F. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **J Microbiol**, 2015; 53:398-405.
- 32 Walia S, Kamal R, Kanwar SS, Dhawan DK. Cyclooxygenase as a target in chemoprevention by probiotics during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rats. **Nutr Cancer.** 2015:1-9.
- 33 Zhu J, Zhu C, Ge S, Zhang M, Jiang L, Cui J, et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat model. **J Appl Microbiol** 2014; 117:208-16.
- 34 Verma A, Shukla G. Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. **Nutr Cancer** 2013; 65:84-91.
- 35 Liboredo JC, Anastácio LR, Pelúzio MCG, Valente FX, Penido LCP, Nicoli JR, et al. Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. **Acta Cir Bras**, 2013; 28:367-72.
- 36 Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJT, Chee KM. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **J Med Microbiol**, 2012;61:361-8.
- 37 Leu RKL, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis.** 2010;31:246-51.

- 38 Kumar A, Singh NK, Sinha PR. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Mol Biol Rep** 2010; 37:1373-6.
- 39 Purohit DH, Hassan AN, Bhatia E, Zhang X, Dwivedi C. Rheological, sensorial, and chemopreventive properties of milk fermented with exopolysaccharide-producing lactic cultures. **Am Dairy Sci Assoc.** 2009; 92:847-56.
- 40 Chen X, Fruehauf J, Goldsmith JD, Xu H, Katchar KK, Koon HW, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits EGF receptor signaling and intestinal tumor growth in Apcmin mice. **Gastroenterology.** 2009; 137:914-92.
- 41 Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male wistar rats. **Eur Food Res Technol** 2008; 228:231-7.
- 42 Narushima S, Sakata T, Hioki K, Itoh T, Nomura T, Itoh K. Inhibitory effect of yogurt on aberrant crypt foci formation in the rat colon and colorectal tumorigenesis in RasH2 mice. **Exp Anim** 2010; 59:487-94.
- 43 Dominici L, Villarini M, Trotta F, Federici E, Cenci G, Moretti M. Protective effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC501 in mice treated with PhIP. **J Microbiol Biotechnol.** 2014; 28;24(3):371-8.
- 44 Villarini M¹, Caldini G, Moretti M, Trotta F, Pasquini R, Cenci G. Modulatory activity of a *Lactobacillus casei* strain on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity in rats. **Environ Mol Mutagen.** 2008; 49(3):192-9. DOI: 10.1002/em.20367.
- 45 Chen ZF, Ai LY, Wang JL, Ren LL, Yu YN, Xu J, et al. Probiotics *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* ameliorate intestinal tumorigenesis. **Future Microbiol** 2015;10:1433-45.
- 46 Hakansson A, Branning A, Molin G, Adawi D, Hagslatt ML. Blueberry Husks and Probiotics Attenuate Colorectal Inflammation and Oncogenesis, and Liver Injuries in Rats Exposed to Cycling DSS-Treatment. **Plos One.** 2012,(7).
- 47 Chung EJ, Do E, Kim SY, Cho EA, Kim DE, Pak S, Hwang SW, et. al. Combination of metformin and VSL#3 additively suppresses western-style diet induced colon cancer in mice. **European Journal of Pharmacology**, 2017;794:1-7.
- 48 Bassaganya-Riera, J et al. Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria. **Plos One.** 2012;7:4.
- 49 Appleyard, CB et al. Pretreatment with the probiotic VSL#3 delays transition from inflammation to dysplasia in a rat model of colitis-associated cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2011, 301: G1004–G1013.

- 50 Eun-ju Do, Hwang SW, Kim SY, Ryu YM, Cho EC, Chung EJ et. al. Suppression of colitis-associated carcinogenesis through modulation of IL-6/STAT3 pathway by balsalazide and VSL#3. **J of Gastroenterol Hepatol**, 2016;31:1453-61.
- 51 Talero E, Bolivar S, Ávila-Román J, Alcaide AM, Fiorucci S, Motilva V. Inhibition of Chronic Ulcerative Colitis-associated Adenocarcinoma Development in Mice by VSL#3. **Inflamm Bowel Dis**, 2015, 21(5).
- 52 Lee HA, Kim H, Lee K-W, Park K-Y. Dead nano-sized *Lactobacillus plantarum* inhibits azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer in Balb/c mice. **J Med Food** 2015;18:1400-5.
- 53 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, et al. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. **Gastroenterology**. 2005; 128(4):891-906.
- 54 Pala V, Sieri S, Berrino F, Vineis P, Sacerdote C, Palli D, et al. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. **Int J Cancer**. 2011; 129:2712-9.
- 55 Worthley DL, Leu RKL, Whitehall VL, Conlon M, Christophersen C, Belobrajdic D, et al. A human, doubleblind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. **Am J Clin Nutr**, 2009; 90:578-86.
- 56 Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, et al. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. **Int J Food Microbiol**. 2008; 128:406-10.
- 57 Sobhani I, Amiot A, Le Baleur Y, Levy M, Auriault ML, et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? **Ther Adv Gastroenterol**, 2013; 6:215–229.
- 58 deMartel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncol**, 2012; 13:607-615.
- 59 Gaboriau-Routhiau, V., Lecuyer, E. and Cerf- Bensussan, N. Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. **Curr Opin Gastroenterol**, 2011; 27:502-508.
- 60 Bordonaro, M., Lazarova, D. and Sartorelli, A. Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? **Cell Cycle**, 2008; 7:1178-83.
- 61 Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **Am J Clin Nutr**, 2007; 85:488-496.

- 62 Bornet FR. Undigestible sugars in food products. **Am J Clin Nutr**, 1994; 59:763S-769S.
- 63 Uccello, M. et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**, 2012; 12(1):1-8.
- 64 Zhu, Q. et al. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, 2013; 34:1285-1300.
- 65 Arthur, J. and Jobin, C. The struggle within: microbial influences on colorectal cancer. **Inflamm Bowel Dis**, 2011; 17:396-409.
- 66 Anuradha S, Rajeshwari K. Probiotics in health and disease. **J Ind Acad Clin Med**, 2005;6:67-72.
- 67 Wollowski, I. et al. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 2001,73:451-5..
- 68 Glenn RG, Karen PS, Robert AR, Kieran MT, Arland H, et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **IFIS Functional Foods Bulletin**, 2011; 7:1-19.
- 69 Vipperla, K.; O'Keefe, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. **Nutrition in Clinical Practice**. v. 27, n. 5, p. 624-635, 2012.
- 70 Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinuzzi F, Agea E, et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. **Carcinogenesis**, 2001;22:1675-80.
- 71 Serban, D. E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer Letters**, 2014; 345,258-70.
- 72 Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. **Annu Rev Biochem**. 2001; 70:81-120.
- 73 Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Ann N Y Acad Sci**. 2003;983:84-100.
- 74 Lazarova, D.L. Linear relationship between WNT activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate. **Internat J Cancer**, 2004,110:523-31.
- 75 Bordonaro, M. et al. The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. **Exp Cell Res**. 2007,313:1652-66.
- 76 Lazarova, D. L. et. al. Butyrate induced changes in Wnt-signaling specific gene expression in colorectal cancer cells. **BMC Research Notes**. 2014, 7:226.

77 Uchiyama, K. et al. Butyrate and bioactive proteolytic form of Wnt-5a regulate colonic epithelial proliferation and spatial development, **Scientific Reports**, 2016, DOI: 10.1038.

78 Tedelind, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**.2007,13(20):2826-32.

79 Hosseini, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**.2011, 69(5):245-258.

80 Balkwill, F. and Mantovani, A. (2010) Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. **Clin Pharmacol Ther** 87: 401–406.

81 Wang, D. and DuBois, R. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptors in chronic inflammation and colorectal cancer. **Gastroenterol Clin North Am**, 2010, 39:697-707.

82 Wu, S., Rhee, K., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H. *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. **Nat Med**, 2009;15:1016-1022.

83 O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, et al. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. **Aliment Pharmacol Ther**, 2001, 15:1219-25.

84 Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. **Nutr**, 2012; 64:871-878.

85 Guz J, Foksinski M, Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, et al. The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. **Mutation Research**, 2008;640:170-3.

86 Skrzydewska E, Stankiewicz A, Michalak K, Sulkowska M, Zalewski B, Piotrowski Z. Antioxidant status and proteolytic-antiproteolytic balance in colorectal cancer. **Folia Histochem Cytobiol**. 2001, 39 Suppl 2:98-99.

87 de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG, Perdigón G, Miyoshi A, Langella P, et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. **J Med Microbiol**, 2008; 57:100-105.

88 Pool-Zobel, B. et al. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutation Research**.2005,591,74-92.

4. ARTIGO II

4.2 ARTIGO ORIGINAL

Título: Intervenção com probiótico VSL#3 associado a um produto concentrado a base de yacon reduz o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos

Intervenção com probiótico VSL#3 associado a um produto concentrado a base de yacon reduz o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos

Resumo

O propósito do presente estudo foi avaliar o efeito do uso do probiótico VSL#3 isolado ou em associação a um produto concentrado a base de yacon, rico em frutooligossacarídeos e inulina, no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos. Os animais foram distribuídos, randomicamente pelo peso corporal, em três grupos (controle, probiótico e simbiótico) e receberam as dietas experimentais pelo período de 13 semanas. A indução das lesões pré-neoplásicas foi realizada com a aplicação da droga dimetilhidrazina (20 mg/kg), uma vez por semana, pelo período de oito semanas consecutivas. Os animais alimentados com o simbiótico reduziram em 38% a incidência das lesões pré-neoplásicas e a multiplicidade das criptas. Observamos ainda, diminuição das concentrações dos produtos de oxidação, malondialdeído e proteína carbonilada, tanto no grupo probiótico quanto no simbiótico, além do aumento da atividade da enzima catalase. A produção dos ácidos graxos de cadeia curta foram significativamente maiores quando o produto a base de yacon foi adicionado à dieta; conseqüentemente, foi identificado melhora da barreira intestinal e maior proliferação epitelial das células saudáveis do cólon. A combinação simbiótica do VSL#3 com o produto a base de yacon exerceu efeito benéfico de forma mais efetiva contra o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas quando comparado à utilização do probiótico isoladamente. Os mecanismos subjacentes atribuídos ao efeito protetor dos simbióticos na carcinogênese colorretal envolvem a modulação do estresse oxidativo, a produção de compostos com atividade anticarcinogênica e a melhora da barreira intestinal.

Palavras-chave: probiótico; prebiótico; simbiótico; focos de criptas aberrantes; câncer colorretal.

Intervention with probiotic VSL # 3 associated with a concentrated yacon-based product reduces the development of pre-neoplastic lesions in the colon of mice

Abstract

The aim of present study was to evaluate the effect of the use of VSL # 3 probiotic alone or in combination with a yacon-based product rich in fructooligosaccharides and inulin in the development of pre-neoplastic lesions in the colon of mice. The animals were allocated in three experimental groups (control, probiotic and symbiotic) and received the diets for a period of 13 weeks. Induction of pre-neoplastic lesions was performed with the drug dimethylhydrazine (20 mg/kg) once a week, for eight consecutive weeks. The symbiotic group reduced the incidence of pre-neoplastic lesions by 38% and the multiplicity of crypts. We also observed a decrease in the concentrations of oxidation products, malondialdehyde and carbonylated protein, both in the probiotic and in the symbiotic group, as well as an increase in the activity of the catalase enzyme. Production of short chain fatty acids was significantly higher when the yacon-based product was added to the diet; consequently, an improvement in intestinal permeability and increased epithelial proliferation of healthy cells of the colon. The symbiotic combination of VSL # 3 with the yacon-based product exerted a beneficial effect more effectively against the development of pre-neoplastic lesions when compared to probiotic use alone. The underlying mechanisms attributed to the protective effect of symbiotics in colorectal carcinogenesis involve the modulation of oxidative stress, the production of compounds with anticarcinogenic activity and the improvement of intestinal permeability.

Key-words: probiotic; prebiotic; synbiotic; aberrant crypt foci; colorectal neoplasms.

Introdução

O câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial. Atualmente, o câncer colorretal (CCR) atinge mais de um milhão de indivíduos por ano e é responsável pela morte de mais de 500.000 pessoas. Estima-se que até o ano de 2030 haverá cerca de 17 milhões de mortes, 27 milhões de novos casos de câncer e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença¹.

A carcinogênese colorretal é um processo complexo que envolve a ativação de protooncogenes e a inativação de genes supressores de tumor. Essas alterações genéticas conduzem a mudanças na transdução de sinais que estão envolvidos na regulação de processos como apoptose, proliferação e diferenciação celular². Ocorre ainda, aumento do estresse oxidativo: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), ou radicais livres, são altamente instáveis e responsáveis por causar danos aos lipídeos, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), contribuindo para iniciação, promoção e progressão do tumor^{3,4}.

As alterações morfológicas no cólon variam de lesões microscópicas, como os focos de criptas aberrantes (FCA), até tumores malignos^{5,6}. Os FCA são lesões pré-neoplásicas encontradas em animais expostos a carcinógenos químicos^{7,8} e em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de CCR⁹. A detecção e quantificação dos FCA foram propostas para identificar potenciais agentes quimiopreventivos⁷.

A microbiota intestinal atua como determinante para saúde do organismo, influenciando a etiologia de diversas doenças¹⁰. Fatores genéticos e ambientais podem alterar a composição, a distribuição e a atividade metabólica do microbioma, resultando em disbiose, que contribui para o aparecimento e progressão do CCR^{11,12,13}.

Evidências indicam associação inversa entre o consumo de probióticos e prebióticos e a incidência do CCR^{14,15}. Os probióticos são *“microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”*¹⁶. Já o termo prebiótico, refere-se aos *“ingredientes seletivamente fermentados que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefício sobre à saúde do hospedeiro”*¹⁷. Tem-se sugerido que a utilização de simbióticos (combinação de probiótico e prebiótico) promova mudanças substanciais no microambiente intestinal¹⁸, sendo

mais eficazes do que os probióticos ou prebióticos isoladamente na prevenção do câncer¹⁹.

O VSL#3 é um probiótico comercialmente disponível, composto por oito cepas de bactérias probióticas, eficaz no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII). Em indivíduos com colite ulcerativa, promoveu melhora na resposta clínica e remissão da doença^{20,21}; a administração preventiva também atenuou a colite²² e ileíte em modelos animais²³. No entanto, estudos com VSL#3 no desenvolvimento do CCR são controversos^{24,25} e todos foram conduzidos em modelos de câncer associado à colite. A literatura científica ainda não dispõe, até o momento, de dados relativos aos efeitos do VSL#3 na carcinogênese colorretal induzida pelo carcinógeno químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

A yacon (*Smallanthus sonchifolius*), por sua vez, uma raiz rica nos prebióticos frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, apresentou efeito protetor em modelo animal induzido a lesões pré-neoplásicas com DMH. Redução significativa na incidência dos FCA foi observada em animais que receberam dieta contendo yacon, sendo os efeitos potencializados quando a yacon foi associada ao probiótico *Lactobacillus casei* ($2,5 \times 10^{10}$ UFC/kg)²⁶.

Diante do exposto, nossa hipótese é que a administração do probiótico VSL#3 associado a um produto concentrado a base de yacon (PBY) apresenta potenciais benefícios na redução da incidência de lesões pré-neoplásicas. Além disso, avaliaram-se os efeitos dessa intervenção na modulação do estresse oxidativo e na permeabilidade intestinal. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anticarcinogênicos do probiótico VSL#3 isolado ou combinado com o PBY em camundongos submetidos à indução de lesões pré-neoplásicas com DMH.

Materiais e Métodos

Probiótico

O VSL#3[®] (Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.) é uma mistura probiótica composta por oito espécies bacterianas, incluindo quatro cepas de lactobacilos (16% de *Lactobacillus casei*; 3,1% de *Lactobacillus plantarum*; 7,3% de *Lactobacillus acidophilus*; 8,4% de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), três cepas de bifidobactérias (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*, totalizando 17,7%) e 47,5% de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. O probiótico foi adquirido liofilizado, em sachês contendo 450 bilhões de bactérias vivas, mantido sob refrigeração e reconstituído em água destilada, diariamente, antes de ser administrado. Os animais (com exceção do grupo controle) receberam o probiótico no volume de 0,1 mL, por gavagem orogástrica, no período da manhã, cinco dias na semana²⁵, totalizando 13 semanas. O volume administrado foi ajustado para garantir a oferta diária de $2,25 \times 10^9$ UFC/animal, dose essa baseada em uma ingestão diária de cerca de 3,6 bilhões de bactérias para um humano adulto de 70 kg^{27,28,29}.

Simbiótico

O simbiótico utilizado foi composto pelo probiótico VSL#3 e os prebióticos FOS e inulina, provenientes do produto concentrado à base de yacon (PBY). A descrição do processamento do PBY foi resguardada devido às exigências da solicitação de patente (INPI: 014110002964). O PBY foi adicionado à dieta purificada para roedores AIN-93M³⁰ em quantidade suficiente para fornecer 6% de inulina e FOS³¹. Considerando que cada 100g de PBY contém 23,6g de inulina e FOS (resultados prévios da composição do produto), foram adicionados 25,4g de PBY para cada 100g de dieta (Tabela 1). Tendo em vista a ingestão diária média do camundongo cerca de 4 g e a dose proposta de 6% de inulina e FOS, a conversão de dose para um humano adulto de 70 kg³² (Jin et. al., 2008), corresponderia a 205,9 g de PBY ao dia. As dietas foram ajustadas para fornecerem quantidades semelhantes de calorias e proteínas.

Tabela 1 – Composição das dietas controle e experimental.

Ingredientes (g 100g ⁻¹)	Dieta AIN-93M	Dieta AIN-93M com PBY
Amido de Milho	33,20	28,55
Caseína	16,50	16,40
Maltodextrina	15,50	15,50
Sacarose	10,00	5,20
Óleo de Soja	4,00	4,00
Celulose Microcristalina	6,40	0,00
Produto à base de Yacon (PBY)*	0,00	25,40
Mistura de Minerais	3,50	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25

*Composição do Centesimal do Produto à base de Yacon (%): frutose: 9,40; glicose: 6,45; sacarose: 3,05; frutooligossacarídeos: 17,65; inulina: 5,95; carboidratos totais: 42,49; fibras: 1,64; umidade: 37,20; cinzas: 1,55; proteína: 2,51; lipídeos: 0,04.

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 saudáveis, machos, com oito semanas de idade, peso corporal de aproximadamente 22g, obtidos no Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa-MG. Os animais foram alojados coletivamente em caixas de polipropileno cobertas com grades metálicas, em ambiente com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas e passaram por uma semana de aclimação, com acesso livre à dieta comercial (Purina[®], Brasil) e água. Após esse período, um total de 45 animais foram randomizados por peso corporal em três grupos (15 animais por grupo) para receberem a dieta controle ou experimental: (1) grupo controle (CON): dieta AIN-93M e gavagem com água destilada; (2) grupo probiótico (PRO): dieta AIN-93M e gavagem com probiótico VSL#3 (2,25x10⁹ UFC); (3) grupo simbiótico (SIM): dieta AIN-93M acrescida de PBY (6% de inulina e FOS) e gavagem com probiótico VSL#3 (2,25x10⁹ UFC). As dietas e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

O cálculo amostral foi realizado segundo Mera et. al. (1998)³³. O estudo de Moura et. al. (2012)²⁶ foi utilizado como referência para comparação da redução da contagem dos FCA entre o grupo controle e o grupo que recebeu o simbiótico.

Desenho experimental

Após o período de aclimação, as dietas foram introduzidas de acordo com cada grupo experimental (Figura 1). A partir da terceira semana, foi iniciado o protocolo de indução das lesões pré-neoplásicas e todos os animais receberam injeção intraperitoneal com a droga DMH (Sigma-Aldrich[®], Inc.), 20mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas. A DMH foi preparada em solução salina 0,9%, contendo 1mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio, pH 8. O volume injetado foi de 0,1 mL por animal³⁴. É relatado que existem diferenças específicas na sensibilidade animal à DMH, sendo os roedores C57BL/6, Balb/c e SWR/J moderadamente sensíveis ao desenvolvimento de tumores no cólon³⁵. Desta forma, escolheu-se a linhagem C57BL/6 devido à sua disponibilidade e sensibilidade relativa à droga. As dietas testes foram ofertadas continuamente pelo período total de 13 semanas.

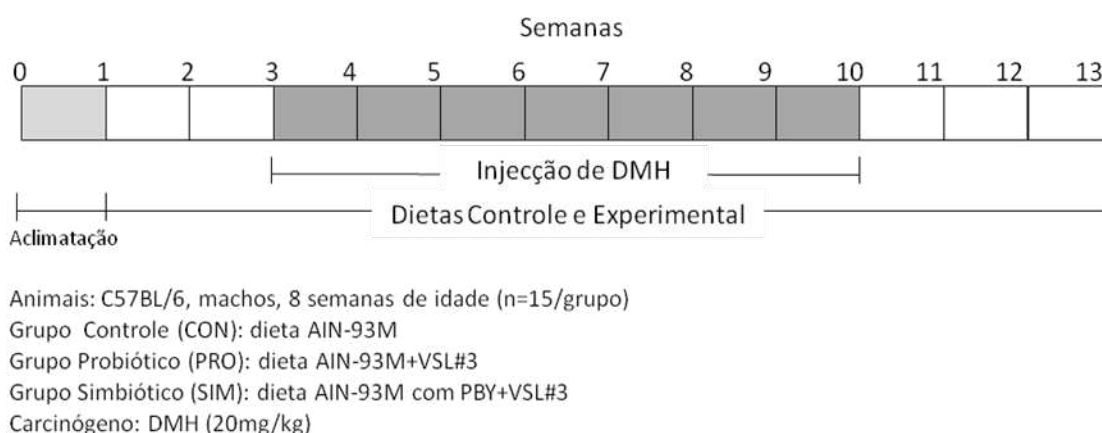


Figura 1 – Desenho Experimental.

O peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente e ingestão alimentar, diariamente, sendo considerada a média de ingestão semanal para fins de cálculo estatístico. O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi calculado por meio da fórmula: $CEA = \text{ganho de peso}(g)/\text{consumo de dieta total}(g)$. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com isoflurano 3% (Isoflorine[®], Cristália), seguido de exsanguinação total pelo *sinus* retro orbital.

Esse estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa com Animais, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa-MG (nº 08/2017).

Análises Bioquímicas no Soro

O sangue coletado durante a eutanásia foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Foram avaliadas as concentrações das enzimas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT), além de ureia e creatinina. O procedimento metodológico foi realizado de acordo com a recomendação do fabricante dos kits (Bioclin[®], Inc.) e as leituras efetuadas no equipamento BS-200 (Mindray[®], Inc.).

Processamento do Cólon e Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes

Foi utilizado todo o comprimento do cólon. O tecido foi lavado com tampão fosfato, aberto longitudinalmente pela margem contra mesentérica, colocado em placas de parafina com a mucosa voltada para cima e fixado com formalina de Carson por 24 horas³⁶. Após a fixação, o cólon foi dividido em três fragmentos iguais, denominados proximal, medial e distal (em relação ao ceco) e corados com azul de metileno (Vetec[®]) 0,1%, por aproximadamente 4 minutos⁷. Os FCA foram contados em toda a superfície mucosa, com auxílio de um microscópio (Zeiss[®], Primo Star, Inc.), por dois avaliadores treinados, de forma independente. Os FCA foram identificados como lesões focais elevadas com criptas aberrantes (CA) múltiplas, com epitélio de revestimento espessado e abertura luminal aumentada em relação à mucosa normal adjacente⁷.

Capacidade Antioxidante *In Vitro* do VSL#3 e do Produto à Base de Yacon e Determinação dos Fenólicos Totais do Produto à Base de Yacon

A capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada utilizando-se o índice de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), conforme sugerido por Brand-Williams e colaboradores (1995)³⁷, com adaptações. Este método baseia-se na

captura do radical DPPH pelos antioxidantes presentes na amostra, produzindo um decréscimo da absorvância, medida por espectrofotometria a 517 nm.

Foi utilizado o volume de 100 µL da solução estoque do probiótico e adicionado 1,5 mL da solução metanólica de DPPH. As amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 1 minuto e mantidas em repouso por 30 minutos, no escuro. Foi preparado o branco com 100 µL de metanol 65% e 1,5 mL de metanol puro e o controle com 1,5 mL de DPPH. As amostras foram analisadas em triplicata. O sequestro do radical DPPH (%ARR) foi calculado de acordo com a fórmula: $\% ARR = [1 - (A_{amostra}/A_{controle}) \times 100$, onde A=absorvância. Para avaliação da capacidade antioxidante do PBY, foi utilizado 5 g do produto em 30 mL de água destilada. Após homogeneização, a mistura foi filtrada em filtro de papel e procedeu-se à análise como descrito anteriormente.

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu³⁸. Amostras de PBY foram homogeneizadas em água deionizada, com auxílio de um *shaker*, durante 30 minutos, e, posteriormente, filtrada. A reação foi composta pela amostra, pelo reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich[®], Inc.) e carbonato de sódio (Sigma Aldrich[®], Inc.). As amostras foram agitadas em vórtex e deixadas em repouso durante 15 minutos, em banho de água a 50°C. Após esse tempo, foram colocadas em banho de gelo para um resfriamento rápido. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®], Multiskan GO) a 760 nm, em triplicata. Para determinação dos resultados, foi construída uma curva padrão com o ácido gálico (Sigma Aldrich[®], Inc.). A partir da equação da reta obtida, interpolaram-se os valores de absorvância obtidos para a amostra e fez-se a correção com os fatores de diluição. A concentração dos fenólicos totais foi expressa como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/100 mg de sólidos totais).

Avaliação do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da determinação e quantificação dos produtos da oxidação: malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada³⁹; e da avaliação da atividade das enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST). Os resultados foram normalizados segundo o teor de proteínas totais presentes em cada amostra. Para isso, 150 mg do tecido hepático e do ceco foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão fosfato contendo EDTA e

centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado para as análises de MDA, CAT, SOD, GST e proteínas totais e o *pellet* formado, para quantificação de proteína carbonilada.

O MDA foi determinado de acordo com método de Buege e colaboradores (1978)⁴⁰ e Wallin e colaboradores (1993)⁴¹. Este é considerado um dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico, comumente utilizado como marcador de peroxidação lipídica que, quando aquecido em meio ácido, forma um produto de coloração rósea que pode ser mensurado por espectrofotometria a 535 nm.

A atividade da CAT, segundo Aebi (1984)⁴², é um método baseado na taxa de decaimento, durante 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), determinada por espectrofotometria a 240nm. Já a atividade da SOD foi determinada a partir da sua habilidade em eliminar o radical livre superóxido e, conseqüentemente, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol⁴³.

A determinação da GST foi realizada segundo Habig e colaboradores (2002)⁴⁴ e baseia-se na habilidade de metabolizar o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, conjugado com a glutathiona reduzida (GSH). A leitura da absorbância foi verificada em diferentes momentos até serem completados 90 segundos de reação, em espectrofotômetro a 340 nm. A quantificação das proteínas totais baseia-se na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com Folin-Ciocalteu, sendo a intensidade da coloração proporcional à concentração de proteína da amostra⁴⁵. A curva padrão de proteínas foi preparada com solução de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich[®], Inc.). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®], Multiskan GO) a 700 nm.

Extração e Dosagem dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta nas Fezes

A extração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi baseada no método de Smiricky-Tjardes e colaboradores (2003)⁴⁶, com modificações. Fezes coletadas na primeira (*t0*) e na última semana (*t1*) do experimento foram acondicionadas à -80°C até o processamento. Amostras de aproximadamente 50 mg foram homogeneizadas em 950 µL de água deionizada, com auxílio de um vórtex, e mantidas durante 30 minutos em gelo, sendo novamente homogeneizadas a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm por 30 minutos, a 4°C e o *pellet*

descartado (procedimento repetido três vezes). O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de 0,45 µm (Analítica[®]). A leitura foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo (Shimadzu[®], Inc.), acoplado ao detector UV, modelo SPD-20A VP. As condições cromatográficas foram: comprimento de onda de 210 nm, coluna (Aminex[®], modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro e pré coluna de mesma fase (Bio-Rad[®], Inc.), fluxo da corrida 0,6 mL/minuto, duração da corrida 50min, pressão na coluna de 75 KgF, temperatura do forno 32°C, volume injetado de 10 µL. Fase móvel: água acidificada (0,005 M de ácido sulfúrico).

A concentração dos ácidos graxos foi determinada de acordo com a curva padrão dos ácidos acético, propiônico e butírico (Supelco mix[®]) e o resultado expresso em µmol do ácido graxo/g de fezes.

Avaliação da Permeabilidade Intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal (PI) é baseada no percentual de excreção urinária do dissacarídeo lactulose e do monossacarídeo manitol. Na última semana do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam gavagem orogástrica (0,2 mL) com solução contendo 11,8 mg de lactulose e 8,9 mg de manitol³². Permaneceram em jejum por mais seis horas e a urina foi coletada durante 24 horas, sendo o volume medido, registrado e armazenado a -80° C até o processamento.

Para realização do teste, a urina foi descongelada em temperatura ambiente, aquecida em banho-maria a 56° C por 10 minutos, centrifugada a 10.000 rpm por 7 minutos e filtrada em filtros de 0,22 µm (Jet Biofil[®]). A leitura foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo (Shimadzu[®], Inc.), utilizando comprimento de onda de 220 nm, coluna (Aminex[®], modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro e fluxo de 1 mL/minuto e pressão de 54 Kgf. Fase móvel: água acidificada (0,005 M de ácido sulfúrico). Os resultados foram apresentados como percentual de excreção urinária dos açúcares⁴⁷.

Morfometria do Cólon e Escore Histopatológico

Imediatamente após a eutanásia, fragmentos aleatórios do cólon foram removidos e fixados com formalina de Carson³⁶ por 24 horas e transferidos para solução de etanol 70%. Os tecidos fixados foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados com xilol e incluídos em parafina (Sigma-Aldrich[®], Inc.). Secções transversais de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Olympus America[®], CUT 4055). Foram preparadas lâminas de sete animais por grupo, cada uma contendo 10 cortes não consecutivos e capturadas aproximadamente 20 imagens de cada uma delas (objetiva 20X). As imagens foram obtidas diretamente do microscópio (Leica Microsystems[®], Inc.), acoplado a uma câmera fotográfica. A análise morfométrica foi realizada utilizando-se o *software* de análise de imagem, Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc, EUA) e foram aferidas as medidas de profundidade das criptas, espessura da camada submucosa, muscular e muscular circular. A realização da medida de profundidade das criptas foi condicionada à possibilidade de identificar base e ápice, que apresentassem aspecto retilíneo.

O escore histopatológico foi determinado por meio da avaliação de três parâmetros independentes: dano na cripta (0: nenhum; 1: 1/3 danificada; 2: 2/3 danificada; 3: apenas o epitélio superficial intacto, cripta inteira e, 4: epitélio perdido); gravidade da inflamação (0: nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: grave) e profundidade da lesão (0: nenhuma; 1: mucosa; 2: mucosa; 3: submucosa e, 4: transmural)⁴⁸. Para cada parâmetro foi atribuída uma pontuação e o escore foi obtido pela média dos pontos.

Análises Estatísticas

O processamento e análise estatística dos dados foram realizados utilizando o *software* *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS[®], versão 20.0, Inc. Chicago, IL, EUA) e a construção dos gráficos no *software* GraphPad Prism5[®]. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações de médias entre os três grupos foram determinadas pela análise de variância *ANOVA* seguida do *post-hoc* de *Bonferroni*, para dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, foi

aplicado o teste de *Kruskal Wallis*, complementado pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. O teste *t pareado* foi utilizado nas comparações dos resultados pré e pós-tratamento dentro de um mesmo grupo. Para significância estatística, foi adotado o $\alpha < 0,05$.

Resultados

Ingestão alimentar e peso corporal e tecidual dos animais experimentais

A ingestão alimentar média foi igual entre os grupos, em todas as semanas experimentais (Figura 2A). No entanto, considerando a ingestão alimentar total por semana, observa-se uma redução significativa na terceira semana experimental (início da indução dos FCA) quando comparada à primeira ($2,73 \pm 0,15\text{g} \times 4,06 \pm 0,05\text{g}$; $p=0,000$) e segunda semana ($2,73 \pm 0,15\text{g} \times 3,46 \pm 0,15\text{g}$; $p=0,018$). Essa redução permaneceu significativa em relação à 11^a ($2,73 \pm 0,15\text{g} \times 3,70 \pm 0,17\text{g}$; $p=0,000$) e 12^a semana ($2,73 \pm 0,15\text{g} \times 3,73 \pm 0,20\text{g}$; $p=0,000$). Quanto ao peso corporal, também não foi observado diferença entre os grupos experimentais (Figura 2B). No entanto, o grupo PRO apresentou o coeficiente de eficácia alimentar (CEA) superior ao grupo CON ($0,63 \pm 0,34 \times 1,15 \pm 0,67\text{g}$; $p=0,034$). O grupo SIM não diferiu dos demais.

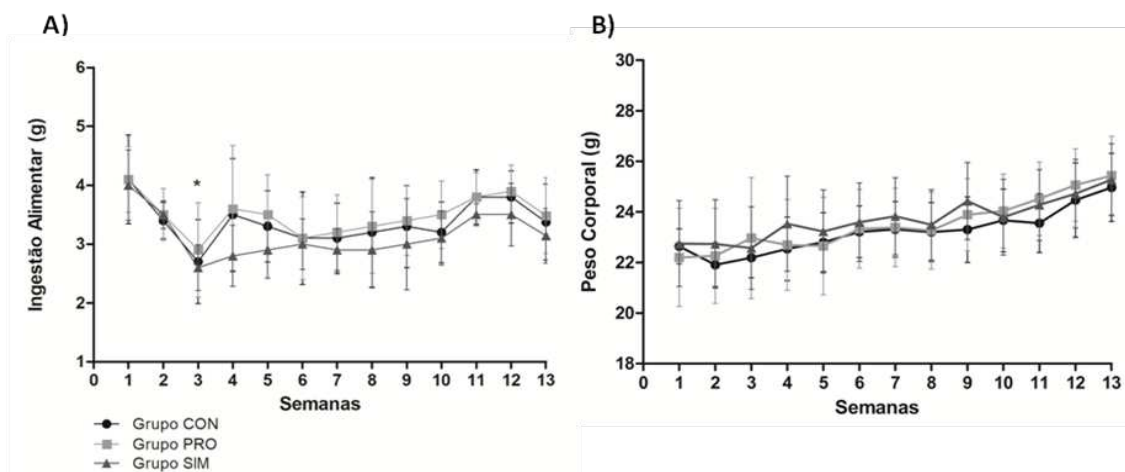


Figura 2 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico na (A) ingestão alimentar e (B) peso corporal de camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas. Grupo CON: dieta AIN-93M; grupo PRO: dieta AIN-93M + probiótico VSL#3; grupo SIM: dieta AIN-93M acrescida de PBY + probiótico VSL#3 (n=15/grupo). ANOVA test. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à ingestão alimentar total, por semana, independente do grupo.

O peso do fígado aumentou significativamente com o uso do probiótico e do simbiótico (Tabela 2). No grupo SIM, foi observado aumento do peso do ceco e do cólon, porém sem alteração no comprimento do mesmo.

Tabela 2 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico no peso dos órgãos e medida do cólon de camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Peso/Medida dos Órgãos	CON	PRO	SIM	<i>p</i>
Peso do fígado (g)	0,93 ± 0,13 ^a	1,08 ± 0,09 ^b	1,36 ± 0,14 ^c	0,000*
Peso do ceco (g)	0,24 ± 0,04 ^a	0,28 ± 0,05 ^a	0,42 ± 0,07 ^b	0,040*
Peso do cólon (g)	0,15 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,03 ^b	0,000*
Comprimento do cólon (cm)	7,23 ± 0,92	7,02 ± 0,90	6,89 ± 0,63	0,540*

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=15/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). *ANOVA test.

Análises Bioquímicas

As concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas e dos produtos do metabolismo renal foram determinadas para verificar uma possível toxicidade. Os resultados obtidos não diferiram entre os grupos (Tabela 3), além de estarem dentro dos limites de normalidade preconizados para o modelo animal utilizado. A taxa de mortalidade foi de 0%.

Tabela 3 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nos testes bioquímicos em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Dados Bioquímicos	CON	PRO	SIM	<i>p</i>
AST (U/L)	235,67 ± 49,14	218,00 ± 31,74	225,86 ± 27,17	0,827*
ALT (U/L)	84,00 ± 12,90	72,33 ± 12,34	68,00 ± 7,80	0,067*
FA (U/L)	111,14 ± 18,14	118,17 ± 27,12	114,86 ± 24,98	0,873 [#]
GGT (U/L)	20,86 ± 3,24	23,43 ± 5,41	21,86 ± 2,97	0,641 [#]
Ureia (mg/dL)	31,05 ± 2,67	27,88 ± 5,07	28,50 ± 2,07	0,215*
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,07	0,32 ± 0,06	0,28 ± 0,03	0,130*

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamiltransferase; PCR: proteína C-reativa. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=8/grupo). *ANOVA test [#]Kruskal-Wallis test.

Efeito do uso do probiótico e simbiótico no desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas

Os FCA foram identificados em todos os grupos experimentais e distribuíram-se uniformemente nas três regiões do cólon (p=0,304) (dados não mostrados). Foram constituídos, predominantemente, por até três criptas aberrantes (CA) cada. As CA são mais largas e exibem uma abertura tipo fenda em comparação com a aparência circular das criptas normais (Figuras 3A e 3B).

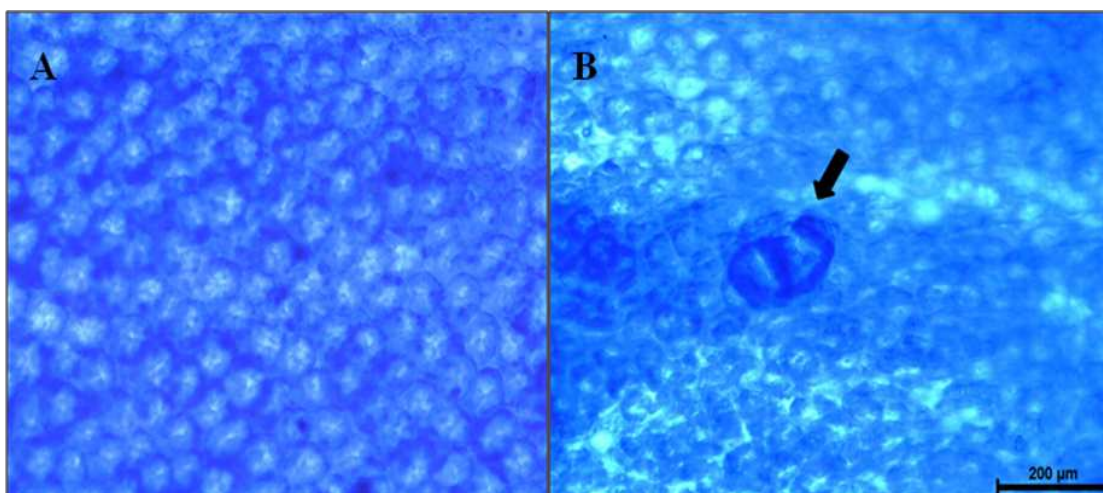


Figura 3 – Fotomicrografia do cólon de camundongos C57BL/6 induzidos a lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, corado em azul de metileno 1%. A: criptas colônicas normais. B: foco de cripta aberrante, com duas criptas aberrantes (indicado pela seta). Objettiva 10X.

A administração do probiótico e simbiótico reduziu a incidência dos FCA totais em 19,6% e 38,1%, respectivamente, comparado ao grupo CON (diferença

significativa apenas para o grupo SIM) (Tabela 4). Na análise por segmento do cólon, observamos que o grupo SIM apresentou menor contagem de FCA nas regiões proximal e medial, comparado ao grupo CON. Já no cólon distal, não houve diferença entre os grupos.

O número médio de CA total foi significativamente maior no grupo CON, indicando uma maior multiplicidade das lesões pré-neoplásicas neste grupo. Esses resultados demonstram que o simbiótico VSL#3 e PBY foi capaz de reduzir o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas no cólon dos camundongos.

Tabela 4 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico no desenvolvimento dos focos de criptas aberrantes no cólon de camundongos.

Número de FCA	CON	PRO	SIM	<i>p</i>
<i>FCA Total</i>	48,71 ± 9,34 ^a	39,14 ± 5,08 ^{a,b}	30,14 ± 5,58 ^b	0,001 [#]
Cólon proximal	18,86 ± 5,87 ^a	14,29 ± 3,68 ^{a,b}	10,71 ± 5,74 ^b	0,029 [*]
Cólon medial	17,00 ± 7,57 ^a	11,14 ± 3,58 ^{a,b}	7,43 ± 4,16 ^b	0,013 [*]
Cólon distal	12,86 ± 5,34	13,71 ± 4,54	12,00 ± 5,13	0,817 [*]
<i>CA Total</i>	68,33 ± 10,86 ^a	50,67 ± 4,63 ^b	41,17 ± 7,78 ^b	0,000
<i>CA/FCA</i>	1,36 ± 0,14	1,35 ± 0,09	1,42 ± 0,23	0,681

FCA: foco de criptas aberrantes. Valores expressos como média±desvio padrão (n=7/grupo).

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

^{*}ANOVA test [#]Kruskal-Wallis test.

Capacidade antioxidante in vitro do probiótico VSL#3 e do PBY e compostos fenólicos totais do PBY

A eliminação do radical livre DPPH foi medida por meio da redução da absorbância a 517 nm. No nosso teste *in vitro*, o probiótico VSL#3 apresentou um percentual de eliminação (% ARR) igual a 69,7±0,4%. Para o prebiótico PBY, o percentual correspondeu a 74,3±0,1%. Esse percentual elevado de captação do radical DPPH observado para o PBY, possivelmente, é devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos, identificados na concentração de 627,6 mg/L (mg EAG/100g de sólidos totais).

Efeito do uso do probiótico e simbiótico na modulação do estresse oxidativo no fígado e ceco

Observamos redução significativa dos produtos da oxidação de macromoléculas, MDA e proteína carbonilada no tecido hepático dos animais que receberam o probiótico ou simbiótico (Tabela 5). Corroborando estes resultados, verificamos ainda o aumento da atividade da enzima antioxidante catalase no grupo SIM; já a atividade da SOD e GST foi igual entre os três grupos. Nas análises realizadas com tecido do ceco, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 5 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nos produtos da oxidação e atividade das enzimas antioxidantes em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

	CON	PRO	SIM	<i>p</i>
<i>MDA (nmol/mg de proteína)</i>				
Fígado	0,23 ± 0,06 ^a	0,13 ± 0,06 ^b	0,15 ± 0,03 ^b	0,011 [#]
Ceco	0,97 ± 0,23	0,81 ± 0,12	1,02 ± 0,27	0,280 [*]
<i>Proteína Carbonilada (nmol/mL)</i>				
Fígado	19,31 ± 7,02 ^a	9,69 ± 6,57 ^b	3,42 ± 1,49 ^b	0,000 [*]
Ceco	2,63 ± 1,19	2,26 ± 1,22	2,29 ± 0,74	0,584 [#]
<i>SOD (U/mg de proteína)</i>				
Fígado	19,90 ± 4,51	19,50 ± 1,60	21,52 ± 3,30	0,485 [*]
Ceco	38,44 ± 2,58	42,88 ± 4,73	37,78 ± 7,09	0,773 [*]
<i>CAT (U/mg de proteína)</i>				
Fígado	4,06 ± 1,34 ^a	4,41 ± 0,66 ^{a,b}	5,83 ± 1,06 ^b	0,014 [*]
Ceco	0,35 ± 0,18	0,29 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,474 [*]
<i>GST (nmol/min/mg de proteína)</i>				
Fígado	71,67 ± 5,30	73,10 ± 3,46	71,15 ± 5,01	0,726 [*]
Ceco	12,77 ± 1,23	13,52 ± 1,83	13,65 ± 2,90	0,701 [*]

MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathiona-S-transferase. Valores expressos em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). ^{*}ANOVA test [#]Kruskal-Wallis test.

Efeito do uso do probiótico e simbiótico na concentração dos AGCC fecais

O grupo que recebeu a combinação de prebiótico e probiótico apresentou aumento significativo na produção de todos os AGCC tanto no início quanto no final do experimento; já a administração do probiótico isoladamente não influenciou essas concentrações (Tabela 6). Destacamos ainda que, a análise intra-grupo demonstrou que, no grupo CON houve redução significativa dos ácidos acético, propiônico e butírico ao longo do experimento. No grupo PRO essa redução foi observada apenas

para os ácidos acético e butírico; o grupo SIM, por sua vez, foi capaz de manter as concentrações de AGCC por todo o período experimental.

Tabela 6 – Efeito do uso de probiótico e simbiótico nas concentrações fecais dos ácidos graxos de cadeia curta em camundongos induzidos a lesões pré-neoplásicas.

AGCC	Tempo	CON	PRO	SIM	<i>p</i>
Acético ($\mu\text{mol/g fezes}$)	<i>t0</i>	95,13 \pm 11,24 ^a	114,51 \pm 11,16 ^a	475,09 \pm 65,21 ^b	0,000*
	<i>t1</i>	46,23 \pm 4,92 ^a	59,75 \pm 7,29 ^a	460,60 \pm 83,19 ^b	0,000*
	<i>p</i>	0,018 [§]	0,018 [§]	0,889 [§]	
Propiônico ($\mu\text{mol/g fezes}$)	<i>t0</i>	3,63 \pm 0,54 ^a	2,60 \pm 0,54 ^a	14,88 \pm 2,88 ^b	0,000*
	<i>t1</i>	2,14 \pm 0,33 ^a	2,27 \pm 0,46 ^a	21,23 \pm 5,59 ^b	0,002*
	<i>p</i>	0,042 [§]	0,717 [§]	0,324 [§]	
Butírico ($\mu\text{mol/g fezes}$)	<i>t0</i>	4,20 \pm 0,50 ^a	4,70 \pm 0,37 ^a	9,93 \pm 0,76 ^b	0,001*
	<i>t1</i>	2,70 \pm 0,16 ^a	3,27 \pm 0,25 ^a	7,17 \pm 1,26 ^b	0,001*
	<i>p</i>	0,028 [§]	0,018 [§]	0,249 [§]	

t0: concentração inicial, uma semana após a introdução das dietas testes; *t1*: concentração final, última semana do experimento. Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=8/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). *ANOVA test [§]Teste t pareado.

Efeito do uso do probiótico e simbiótico na permeabilidade intestinal

O percentual de excreção de lactulose foi significativamente maior no grupo CON comparado aos grupos PRO (0,93 \pm 0,62% x 0,44 \pm 0,05%; p=0,048) e SIM (0,93 \pm 0,62% x 0,41 \pm 0,12%; p=0,043). Os grupos PRO e SIM não diferiram entre si (p=1,000). O monossacarídeo manitol não foi identificado em nenhum das amostras de urina analisadas.

Efeito do uso do probiótico e simbiótico na morfometria intestinal e escore histopatológico

As medidas das camadas que compõe o cólon foram alteradas significativamente após utilização do probiótico ou simbiótico. A profundidade das criptas foi maior no grupo SIM (147,7 \pm 32,8 μm), seguida do grupo PRO (127,6 \pm 23,5 μm) e, por último, o grupo CON (106,2 \pm 22,5 μm). Na camada muscular, ocorreu aumento significativo apenas no grupo PRO (154,8 \pm 57,1 μm); os grupos CON (105,8 \pm 41,8 μm) e SIM (120,7 \pm 33,8 μm) não diferiram entre si. Já na camada muscular circular, o aumento foi observado nos grupos PRO (53,5 \pm 26,6 μm) e SIM (50,3 \pm 21,0 μm), comparados ao CON (35,7 \pm 10,7 μm). Curiosamente, a

medida da submucosa reduziu de forma significativa nos grupos PRO ($29,0 \pm 8,0 \mu\text{m}$) e SIM ($24,5 \pm 8,7 \mu\text{m}$), comparado ao CON ($32,5 \pm 9,7 \mu\text{m}$).

A pontuação total média do escore histopatológico foi superior no grupo CON comparado aos demais grupos (Figura 4A). Os parâmetros avaliados que diferiram entre os grupos foram o dano na cripta e a profundidade da lesão (Figura 4B).

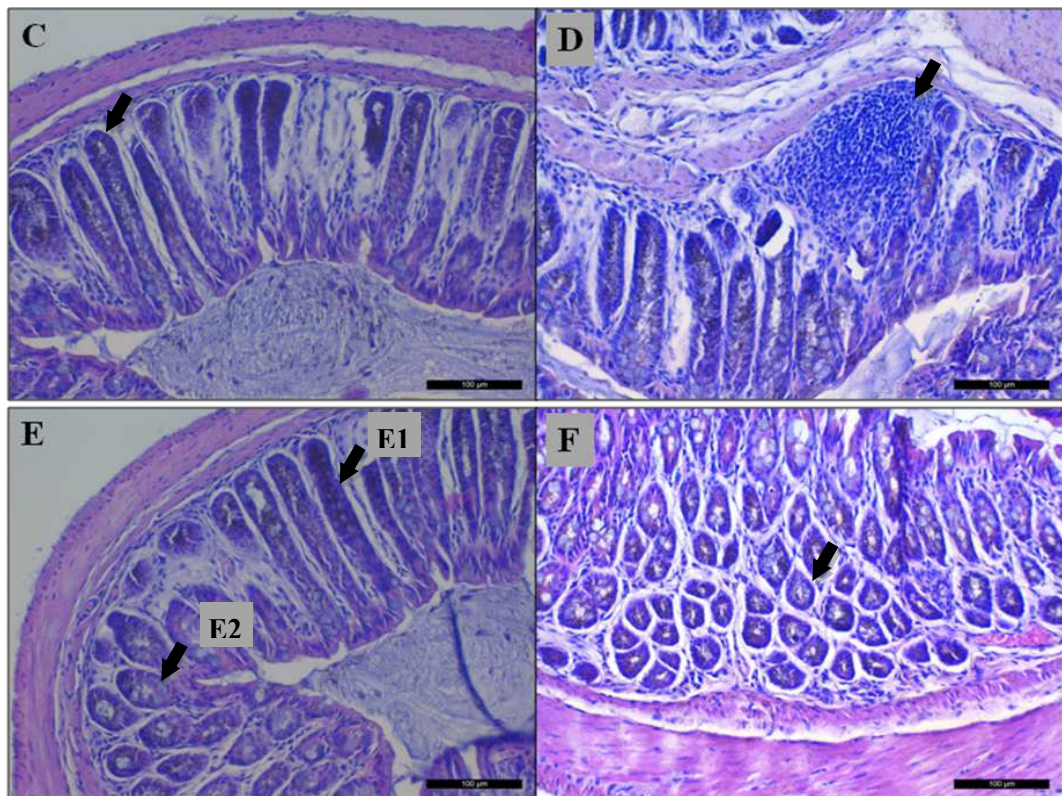
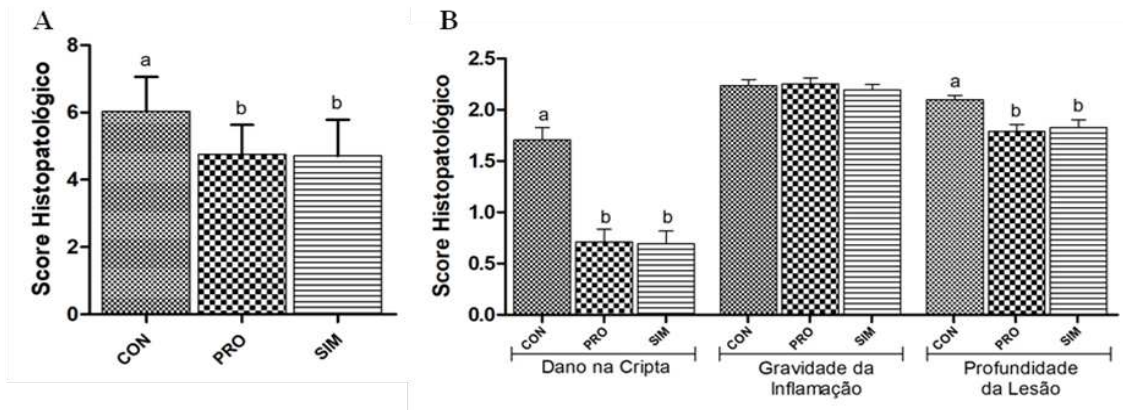


Figura 4 – Escore Histopatológico. A: pontuação total do escore histopatológico. B: parâmetros que compõe o escore histopatológico e comparação entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). ANOVA test. Fotomicrografias do cólon de camundongos C57BL/6 induzidos a lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina, coradas com Hematoxilina & Eosina. C: criptas colônicas preservadas. D: presença de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa. E: área de transição de criptas colônicas preservadas (E1) e criptas danificadas (E2). F: área extensa de criptas danificadas. Objetiva 20X.

Discussão

A microbiota intestinal está diretamente relacionada ao CCR, podendo inibir ou favorecer o desenvolvimento do mesmo⁴⁹. Acredita-se que a introdução de bilhões de bactérias em um ecossistema, como o intestino, seja capaz de induzir modificações na microbiota e assim, alterar as respostas do organismo aos estímulos carcinogênicos^{50,51}. Deste modo, a utilização de probióticos e prebióticos, que atuam estimulando seletivamente o crescimento das bactérias benéficas, constitui estratégia promissora para redução do risco do CCR.

Para testar os efeitos anticarcinogênicos *in vivo* do probiótico VSL#3 e do simbiótico VSL#3 combinado com PBY, utilizamos um modelo animal submetido à indução de lesões pré-neoplásicas com DMH. O probiótico VSL#3 é usado no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII) e alguns estudos investigaram seu papel no câncer associado à colite^{23,25,49,52}. Contudo, não foram encontrados estudos que avaliassem seus efeitos na carcinogênese induzida quimicamente, sem associação com colite ou outras DII.

A DMH e seu metabólito, azoximetano (AOM), são agentes cancerígenos amplamente utilizados em modelos experimentais de CCR^{53,54}. Os tumores resultantes são de origem epitelial com histologia, morfologia e anatomia semelhantes às neoplasias observadas em humanos, sendo considerados de alta reprodutibilidade para o estudo do CCR^{34,55}.

Os animais apresentaram redução na ingestão alimentar após a primeira aplicação de DMH, porém, sem impactar negativamente no peso corporal. Ao contrário, mantiveram ganho de peso progressivo até a 13ª semana experimental, sem diferenças entre os grupos. Resultados de ganho de peso são contraditórios entre os estudos, onde alguns autores observaram aumento de peso nos grupos tratados com probiótico e/ou simbiótico^{56,57,58} e outros não encontram diferenças^{24,59,60,61}. Em estudo de Leu e colaboradores (2010)⁵⁹, animais induzidos ao CCR e que receberam o probiótico *Bifidobacterium lactis* (1×10^{11} UFC/g), combinado ou não ao prebiótico amido resistente, por 26 semanas, também não apresentaram diferenças no peso corporal.

Embora fosse esperada perda de peso dos animais em decorrência do uso da DMH, nossos resultados demonstraram que as dietas elaboradas foram adequadas para manter o crescimento normal dos animais. Além disso, quando a relação do

ganho de peso e a ingestão alimentar foram avaliadas, por meio do cálculo do CEA, verificou-se que o grupo PRO obteve o melhor resultado.

O uso do probiótico e/ou simbiótico impactou o peso de alguns órgãos. Detectamos aumento significativo no peso do fígado dos animais que receberam o probiótico ou simbiótico. Esses dados corroboram com um estudo realizado com ratos que receberam o probiótico *Lactobacillus salivarius* Ren (1×10^{10} UFC/kg ou 5×10^8 UFC/kg), por 15 semanas⁶². Gomide e colaboradores (2014)⁶³ observaram aumento do peso relativo do fígado de animais que receberam inulina ou FOS. As variações de peso sugerem uma mudança na homeostase do órgão, possivelmente causada pela DMH; o uso do probiótico ou prebiótico foi capaz de proteger o fígado destas alterações. O peso do ceco também aumentou com o uso do simbiótico, resultado semelhante ao encontrado por Pattananandecha et. al. (2016)⁶⁴, em estudo que teve por objetivo avaliar o efeito da inulina no desenvolvimento dos FCA.

De forma similar, o peso do cólon aumentou após suplementação com simbiótico, sem alterar o comprimento. Chang e colaboradores (2012)⁶⁰ constataram aumento no peso e comprimento do cólon em ratos tratados com *Lactobacillus acidophilus* (2×10^9 UFC ml⁻¹), por 10 semanas. Sung e colaboradores (2004)⁶⁵ também verificaram aumento do peso e comprimento do cólon nos animais que receberam probiótico e alteração na microbiota quando prebióticos foram adicionados à dieta.

O uso do probiótico ou simbiótico não provocou nenhuma alteração nos marcadores bioquímicos analisados (ALT, AST, FA, GGT, uréia e creatinina), após as 13 semanas experimentais. Resultados semelhantes foram observados por Sivieri (2008)⁶⁶, em estudo com ratos wistar submetidos à indução de FCA com DMH e que receberam o probiótico *E. faecium* CRL 183 (10^8 UFC/mL), por 42 semanas.

O FCA é caracterizado morfológicamente por criptas anormais na superfície do cólon e reconhecido como lesões neoplásicas precoces⁶⁷. É considerado biomarcador confiável do estágio inicial da carcinogênese, sendo a progressão do foco displásico uma das vias de desenvolvimento do CCR⁶⁸. O crescimento do FCA ocorre por um mecanismo de "fissão da cripta"⁶⁹, assim, FCA com mais criptas (maior multiplicidade) indicam um estágio mais avançado da lesão⁷⁰. Devido à progressão potencial das lesões pré-neoplásicas, o estudo dos FCA é fundamental para a compreensão da patogênese do CCR e representa um desafio para o rastreamento e vigilância do câncer nos estágios iniciais.

No presente estudo, os FCA distribuíram-se uniformemente nos segmentos proximal, medial e distal do cólon. O número de criptas aberrantes total foi significativamente inferior nos grupos que receberam probiótico ou simbiótico, indicando o efeito protetor das bactérias probióticas e do prebiótico utilizado.

Lee e colaboradores (2007)⁷¹, observaram redução de cerca de 40% dos FCA em camundongos induzidos com DMH a lesões pré-neoplásicas que receberam o probiótico *Bacillus polyfermenticus*, por 10 semanas. Identificamos redução significativa nos FCA totais no grupo SIM (38,1% x 19,6% no grupo PRO), assim como os FCA no cólon proximal e distal. Esses resultados indicam que o probiótico e o prebiótico atuaram de forma sinérgica, conferindo maior proteção.

Uma vez que o simbiótico foi introduzido duas semanas antes da primeira administração do carcinógeno, acreditamos que a proteção ocorra nas fases iniciais da carcinogênese. Há evidências de que a intervenção com probiótico, prebiótico ou simbiótico pode diminuir a exposição das células epiteliais do cólon aos agentes genotóxicos, além de modular o equilíbrio entre proliferação e apoptose celular.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, com acúmulo de quantidades excessivas de radicais livres (RL). Como consequência é observada a oxidação de moléculas, dentre elas a oxidação do DNA e perda de suas funções biológicas. A cronicidade desse processo tem implicações diretas na etiologia do câncer⁷².

Durante a metabolização da dimetilhidrazina, altas concentrações de RL são produzidas concomitantes à diminuição da atividade de enzimas antioxidantes⁷³. Esses fatores podem iniciar a cascata da peroxidação lipídica, observada em estudos de CCR clínicos e experimentais^{74,75}.

Uma diversidade de compostos apresenta atividade antioxidante e são capazes de eliminar diretamente os RL ou interferirem na sua geração. A capacidade antioxidante dos probióticos tem sido relatada desde décadas passadas⁷⁶. Para comprovar essa propriedade, realizamos um teste *in vitro* de sequestro do radical DPPH, usando o probiótico VSL#3 e também o prebiótico PBY. De fato, foi identificado um percentual elevado de captação do radical pelo probiótico, cerca de 70% e de 74% para o PBY.

A propriedade antioxidante dos probióticos é atribuída à capacidade de eliminar e/ou inibir a formação dos RL no intestino, de quelar íons metálicos e de inibir a auto-oxidação do ascorbato⁷⁷. Podem ainda, induzir a transcrição de genes

envolvidos na síntese de glutathione pela mucosa intestinal⁷⁸ e células pancreáticas⁷⁹. Algumas espécies de lactobacilos mostraram produzir e liberar SOD no intestino de ratos^{80,81}. A administração de *Lactobacillus fermentum* ME-3 aumenta a expressão de Mn-SOD e do complexo glutathione (GSSH, GPx e GR), necessários para a reciclagem, transporte e síntese da glutathione⁸².

Tem-se ainda a redução da ligação do NF-κB ao DNA, com consequente redução da expressão de mediadores inflamatórios^{83,84} e indução da secreção de interleucina-10⁸⁵. Ademais, Pochart (1992)⁸⁶ sugeriu que as bactérias presentes no cólon podem se ligar ao metabólito ativo do DMH, que é liberado no lúmen intestinal, minimizando assim sua reabsorção na circulação, removendo-o fisicamente pelas fezes.

A yacon, alimento base para produção do PBY, contém flavonóides, ácidos fenólicos e triptofano, que apresentam atividade antioxidante e antiinflamatória. Os compostos fenólicos protegem as biomoléculas, como DNA, lipídeos e proteínas contra os danos causados pelos RL⁸⁷. Na análise dos compostos fenólicos totais do PBY, foi detectado uma concentração de 627,6 mg/L (mg EAG/100g de sólidos totais). Esses dados dão suporte aos resultados encontrados, onde observamos uma modulação do estresse oxidativo, que podem ter contribuído para uma redução no aparecimento dos FCA.

Em estudos anteriores foi identificado redução da peroxidação lipídica, por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no intestino e no tecido hepático de animais que foram tratados com probiótico^{56,88}. No presente estudo, uma redução significativa nas concentrações de MDA foi constatada nos grupos PRO e SIM, assim como a redução da proteína carbonilada. O aumento dos níveis de MDA no fígado do grupo CON ocorreu, possivelmente, devido à toxicidade causada pela DMH.

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, os resultados dos estudos são divergentes. Kumar e colaboradores (2012)⁸⁸, notaram elevação nos níveis de peróxidos lipídicos e da atividade das enzimas antioxidantes em ratos Wistar submetidos à aplicação de DMH; com a administração do probiótico *Lactobacillus plantarum* AS1, houve redução da peroxidação lipídica e diminuição nas concentrações de SOD, CAT e GST (sem, contudo, atingir os valores do controle negativo). Para esses autores, as defesas antioxidantes poderiam sofrer uma modulação pelo probiótico como resposta a um estado antioxidante melhorado. Por

outro lado, Villarini (2008)⁶¹, observaram redução das concentrações da SOD e manutenção da GST no fígado dos animais tratados com *Lactobacillus casei* e concluíram que a dieta suplementada com lactobacilos não protegeu contra a genotoxicidade da DMH, uma vez que não houve aumento da defesa antioxidante endógena.

Segundo Mohania e colaboradores (2013)⁵⁶ a diminuição significativa da atividade da GST no fígado e cólon pode ser devido à sua utilização na desintoxicação de metabólitos da DMH, sendo que a indução da GST pelo probiótico seria considerada um mecanismo protetor, resultando inibição da tumorigênese colônica. A GST é uma enzima antioxidante que pertence ao grupo de enzimas de fase 2 do processo de biotransformação; é encontrada em diversos órgãos, porém em grande quantidade no fígado⁸⁹. Acredita-se que os probióticos são capazes de aumentar a expressão de GST por meio da ação do ácido butírico⁹⁰.

Além da diminuição dos produtos da oxidação, observamos aumento significativo na atividade da CAT no fígado do grupo SIM. A CAT compõe um dos principais sistemas de defesa contra o estresse oxidativo, pois converte rapidamente H₂O₂ em H₂O e O₂⁹¹. Como a CAT e a GST são produzidas em grandes quantidades no fígado e por este ser o principal local de metabolização da DMH, acreditamos que as diferenças observadas entre a atividade das enzimas no fígado e ceco se devam a esses fatores. Nesse sentido, a modulação do estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos subjacente à redução dos FCA nos grupos que receberam probiótico ou simbiótico, conclusão essa ratificada pela elevada capacidade antioxidante *in vitro* do VSL#3 e do PBY.

A redução do aparecimento dos FCA no grupo que recebeu o simbiótico também pode estar relacionada ao aumento da produção dos AGCC; estes são os produtos finais da fermentação bacteriana de carboidratos não digeríveis, como o FOS e a inulina⁹². Os AGCC apresentam atividade antiinflamatória e capacidade de suprimir a ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB⁹³. Além disso, melhoram a barreira intestinal, uma vez que aumentam a produção de muco e a proliferação de células saudáveis. O ácido propiônico estimula a apoptose das células tumorais e exibe atividade anti-proliferativa, sendo o segundo AGCC preferencialmente utilizado pelos colonócitos como substrato energético⁹⁴.

O butirato, no entanto, é de interesse particular, uma vez que atua como inibidor das histonas desacetilases (HDACi); estes são considerados uma classe de

agentes anti-tumorais que regulam a proliferação, diferenciação, apoptose e angiogênese tumoral⁹⁴. O desequilíbrio entre acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras contribui para desregulação da expressão gênica, que pode levar à carcinogênese^{94,95}. A produção de butirato é dependente da composição da microbiota intestinal, da composição química e da quantidade dos substratos disponíveis para o processo de fermentação⁹⁶.

A concentração dos AGCC fecais foi determinada em dois momentos: uma semana após a introdução do probiótico/simbiótico e na última semana do experimento e obtivemos resultados interessantes. Com apenas uma semana de uso do simbiótico, todos os AGCC aumentaram significativamente. Da mesma forma, na última semana do experimento a concentração dos ácidos acético, propiônico e butírico permaneceram significativamente elevados no grupo SIM.

Contudo, comparando-se os valores observados no início e final do experimento dentro do mesmo grupo, percebemos que, no geral, a produção dos AGCC diminuiu. Essa redução, provavelmente foi causada pela DMH, que interfere no metabolismo microbiano. No grupo CON, houve redução significativa dos três ácidos graxos comparando-se os dois tempos; já no grupo PRO, esse efeito foi observado para os ácidos acético e butírico. O grupo SIM foi o único capaz de manter as concentrações dos ácidos graxos, mesmo com a aplicação da DMH. Esses dados reforçam a importância de se fornecer os substratos fermentáveis necessários para aumentar a produção dos AGCC.

Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores^{59,97}. Em estudo realizado por Moura (2012)²⁶, com ratos Wistar submetidos à indução de lesões pré-neoplásicas com DMH, observaram aumento significativo nas concentrações de ácido acético e butírico nos grupos que receberam dieta contendo 1% de yacon e nos que receberam a formulação simbiótica, com $2,5 \times 10^{10}$ UFC/kg de *L. casei* e dieta com 1% de yacon. Esse aumento não foi observado no grupo que recebeu 0,5% de yacon, indicando que existe uma concentração mínima necessária do prebiótico para detecção do efeito. Para os autores, o efeito protetor do probiótico ou simbiótico envolveu o aumento da produção dos AGCC que se correlacionaram à redução do desenvolvimento de FCA e de tumores do cólon.

A integridade do epitélio do trato gastrointestinal é fundamental para a manutenção da barreira intestinal. Além das células epiteliais, o estado de ativação do sistema imunológico, a microbiota intestinal e seu metabolismo, a produção de

muco, a secreção de peptídeos antimicrobianos, as proteínas de junção e o sistema nervoso entérico contribuem para o adequado funcionamento da mesma⁹⁸. A disfunção da barreira intestinal pode aumentar a passagem de antígenos pela mucosa e iniciar um processo inflamatório e desenvolvimento do CCR⁹⁹.

Indivíduos que apresentam doenças intestinais cursam com aumento da permeabilidade intestinal¹⁰⁰. Não está totalmente claro se esse aumento é causa ou consequência, no entanto, a melhora da barreira intestinal pode ser um alvo importante na prevenção e tratamento de distúrbios intestinais¹⁰¹.

Uma variedade de testes tem sido utilizados para avaliar a integridade da barreira intestinal, incluindo o uso de radiofármacos ou açúcares não metabolizáveis, como a lactulose e o manitol¹⁰². A lactulose é um dissacarídeo absorvido por via paracelular, ou seja, entre as células epiteliais. Já o manitol é um monossacarídeo absorvido pela via transcelular, através de pequenos poros aquosos, de alta incidência, presentes na membrana das células epiteliais intestinais. O aumento da absorção de lactulose é indicativo de aumento da permeabilidade intestinal¹⁰³.

Os prebióticos, probióticos e simbióticos foram propostos como intervenções promissoras para melhorar a função de barreira intestinal. De fato, estudos comprovaram melhoria na permeabilidade intestinal após o uso de probiótico^{104,105}, prebiótico¹⁰⁶ ou simbiótico¹⁰⁷. Nossos resultados corroboram estudos anteriores, onde observamos menores taxas de excreção de lactulose nos animais que receberam probiótico ou simbiótico. A fermentação dos prebióticos pela microbiota aumenta a produção dos AGCC, que funcionam como combustível para os colonócitos e, conseqüentemente melhora a função de barreira intestinal¹⁰⁸.

Além dos efeitos sobre a permeabilidade intestinal, o aumento das concentrações dos AGCC provavelmente contribuiu para os resultados observados na proliferação epitelial no cólon, identificados por meio do aumento da profundidade das criptas. O aumento foi significativo e progressivo nos grupos PRO e SIM em relação ao grupo CON. Leu e colaboradores (2010)⁵⁹ concluíram que a profundidade da cripta depende da presença de um substrato fermentável, uma vez que animais que receberam dieta restrita em prebióticos apresentaram criptas menores. A produção fermentativa dos AGCC é considerada um fator trófico para o epitélio colônico¹⁰⁹.

Concluimos que a combinação simbiótica do VSL#3 e do PBY é mais eficaz na redução da incidência das lesões pré-neoplásicas induzidas por DMH comparado ao uso do probiótico isoladamente. O mecanismo subjacente à redução dos FCA

envolve a capacidade antioxidante do VSL#3 e do PBY, sendo capazes de promover diminuição da concentração dos produtos da oxidação e estimular a atividade de enzimas antioxidantes. O simbiótico interfere no metabolismo da microbiota do cólon, aumentando a produção de compostos com atividade anticarcinogênica, como o butirato. Em conjunto, esses fatores contribuíram para melhora da barreira intestinal e proliferação das células saudáveis do cólon.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil – CAG-APQ 02664-14). Agradecemos a Bioclin® por ter gentilmente cedido os kits para as análises bioquímicas.

Referências

1. World Health Organization. WHO global health observatory: cancer mortality and morbidity. [Internet]. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/ 2014.
2. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, et al. Wnt/betacatenin signaling pathway as a novel cancer drug target. **Curr Cancer Drug Targets**, 2004; 4: 653-671.
3. Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, Vanhoutvin SA, Fischer MA, Kodde A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. **Clin Nutr**, 2009;28:88–93.
4. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 2004; 44:239–67.
5. Gupta, A.K., Schoen, R.E. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? **Current Opinion in Gastroenterology**, 2009; 25, 59-65.
6. Tanaka, T.. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, 2009; 8(5).
7. Bird, R.P., Good, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, 2000; 112,395-402.
8. Cheng, L., Lai, M.D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 2003; 9,2642-49.
9. Khare, S., Chaudhary, K., Bissonnette, M., Carroll, R. Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. **Methods in Molecular Biology**, 2009; 472,373-86.
10. Grootaert C, Van den AP, Marzorati M, Broekaert WF, Courtin CM, Delcour JA, et al. Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiol Ecol** 2009;69:231–42.
11. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, et al. (2011) Linking longterm dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science** 334: 105-108.
12. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, 2012; 488:178-184.
13. Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, et al. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infect Immun**, 2009;77:2367-75.

14. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **J Nutr Biochem**, 2009; 20:743–52.
15. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, 2014; 20:7878-86.
16. Joint FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, 2002.
17. Glenn RG, Karen PS, Robert AR, Kieran MT, Arland H, et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **IFIS Functional Foods Bulletin**, 2011;7:1-19.
18. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. **J Nutr**. 2007; 137:830S-7S.
19. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **Am J Clin Nutr**, 2007;85:488–96.
20. Huynh HQ, Debruyne J, Guan L et al. Probiotic preparation VSL# 3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: a pilot study. **Inflamm. Bowel Dis**. 2009; 15:760–8.
21. Sood A, Midha V, Makharia GK et al. The probiotic preparation, VSL# induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. **Clin. Gastroenterol. Hepatol**. 2009; 7: 1202–9.
22. Madsen, K. et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, 2001; 121, 580-591.
23. Pagnini, C. et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010; 107, 454-9.
24. Appleyard, CB et al. Pretreatment with the probiotic VSL#3 delays transition from inflammation to dysplasia in a rat model of colitis-associated cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2011;301: G1004–G1013.
25. Arthur, JC et al. VSL#3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer. **Scientific Reports**, 2013; 3:2868. DOI: 10.1038.
26. Moura, NA et. al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis **Food and Chemical Toxicology**, 2012;50:2902-10.
27. Dai C, Zheng C-Q, Meng F-j, Zhou Z, Sang L-x, Jiang M. VSL# 3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF-κB pathway in rat model of DSS-induced colitis. **Mol and Cel Bio**, 2013; 374:1-11

28. Zavisic G, Petricevic S, Radulovic Z, Begovic J, Golic N, Topisirovic L, Strahinic I. Probiotic features of two oral Lactobacillus isolates. **Brazil Journ of Micr**, 2012; 43:418-28
29. Uronis, J. M. et al. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, 2011; 17:289-97.
30. Reeves, P. G. et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, 1993; 123:1939-51.
31. Paula, HAA. Efeito prebiótico de produto a base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na modulação de indicadores da saúde óssea em ratas wistar. Tese. Universidade Federal de Viçosa, 2013.
32. Jin W, Wang H, Ji Y, Hu Q, Yan W, Chen G, Yin H. Increased intestinal inflammatory response and gut barrier dysfunction in Nrf2-deficient mice after traumatic brain injury. **Cytokine**, 2008; 44:135-40.
33. Mera, R. et al. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, 1998; 1(1):87-91.
34. Newell, L.; Heddle, JA. The potent colon carcinogen, 1,2 dimethylhydrazine induced mutations primarily in the colon. **Mutation Research**. 2004; 564:1-7.
35. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 2009; 30(2):183-96..
36. Carson, F. L. et al. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**. 1973;59:365-73.
37. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT: Food Science and Technology**, 1995; 28:25-30.
38. Albarici, T. R.; De Freitas, D. M.; Pessoa, J. D. C. Protocolos de análises para polpa de açaí: um guia prático de consulta. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos (SP), 2009.
39. Levine RL et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 1990; 186:464-78.
40. Buege, J. A.; Aust, S. D. **In Methods of Enzymology**. New York: Academic Press. Cap. Microsomal lipid peroxidation. 1978,302-10.
41. Wallin B, Rosengren B, Shetzer HG, Cameja G. Lipid oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) formation in a single microtitre plate: its use for evaluation of antioxidants. **Anal. Biochem**. 1993; 208:10-15.

42. Aebi, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzymology**. 1984;105:121-7.
43. Dieterich, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 2000, 101, 33-39.
44. Habig, WH.; Jakoby, WB. Glutathione S-Transferase (rat and human). **Methods in Enzymology**, 1981; 77(27), 218-39.
45. Lowry, O. H. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193:265-75.
46. Smiricky-Tjardes, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, 2003;81, 2535-45.
47. Mendonça, J. N. et al. Padronização e validação de metodologia para verificação de permeabilidade intestinal utilizando cromatografia gasosa. **RBAC.**, 2009; 41(4):271-4.
48. Dieleam LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Occurs in Severe Combined Immunodeficient Mice. **Gastroenterology**. 1994;107(6):1643-52.
49. Bassaganya-Riera, J et al. Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria. **Plos One**. 2012; 7:4.
50. Uronis JM, Arthur JC, Keku T, et al. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**. 2011;17:289-97.
51. Reiff, C. et al. Balancing inflammatory, lipid, and xenobiotic signaling pathways by VSL#3, a biotherapeutic agent, in the treatment of inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis**. 2009; 15, 1721-36.
52. Chung EJ, Do E, Kim SY, Cho EA, Kim DE, Pak S, Hwang SW, et. al. Combination of metformin and VSL#3 additively suppresses western-style diet induced colon cancer in mice. **European Journal of Pharmacology**, 2017;794:1-7.
53. Freeman HJ, Kim Y, and Kim YS: Glycoprotein metabolism in normal proximal and distal rat colon and changes associated with 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic neoplasia. **Cancer Res**, 1978; 38,3385-90.
54. Srihari T, Sengottuvelan M, and Nalini N: Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **J Pharm Pharmacol**, 2008; 60,787-794.

55. Femia AP and Caderni G: Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. **Planta Med**, 2008; 74, 1602-07..
56. Mohania D, Kansal VK, Sagwal R, Shah D. Anticarcinogenic effect of probiotic Dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Am J Cancer Ther Pharmacol**, 2013;1:1-17.
57. Urbanska AM, Bhathena J, Cherif S, Prakash S. Orally delivered microencapsulated probiotic formulation favorably impacts polyp formation in APC (Min/+) model of intestinal carcinogenesis. **Artif Cells Nanomed Biotechnol** 2012; 1-11.
58. Kumar A, Singh NK, Sinha PR. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Mol Biol Rep** 2010; 37:1373-6.
59. Leu RKL, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**. 2010;31:246–51.
60. Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJT, Chee KM. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **J Med Microbiol** 2012;61:361-8.
61. Villarini M¹, Caldini G, Moretti M, Trotta F, Pasquini R, Cenci G. Modulatory activity of a *Lactobacillus casei* strain on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity in rats. **Environ Mol Mutagen**. 2008;49(3):192-9. doi: 10.1002/em.20367.
62. Zhu J, Zhu C, Ge S, Zhang M, Jiang L, Cui J, et al. *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat model. **J Appl Microbiol** 2014;117:208–16.
63. Gomide AF, de Paula SO, Gonçalves RV, de Oliveira LL, Ferreira CL, Comastri DS, et al. Prebiotics prevent the appearance of aberrant crypt foci (ACF) in the colon of BALB/c mice for increasing the gene expression of p16 protein. **Nutr Hosp**. 2014; 30(4):883-90.
64. Pattananandecha et. al. Hydrolysed inulin alleviates the azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci by altering selected intestinal microbiota in Sprague Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, 2016;54(9),1596–1605 <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1110597>
65. Sung, H.-Y., Jeong, H.-J. & Choi, Y.-S. Effects of fructans and isomaltooligosaccharide on large bowel mass and plasma and fecal immunoglobulin A in rat. **Nutr Sci**, 2004; 7,196–200.
66. Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male wistar rats. **Eur Food Res Technol**, 2008; 228:231-7.

67. Rose DJ, Demeo MT, Keshavarzian A, Hamaker BT. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. **Nutr Rev**, 2007; 65:51-62.
68. Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. **Am J Pathol**. 2003; 163(4):1607-14.
69. Tsukamoto T, Kozaki KI, Nishikawa Y, Yamamoto M, Fukami H, Inoue M. Development and distribution of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]-pyridine (PhIP)-induced aberrant crypt foci in the rat large intestine. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:720-25.
70. Pretlow T. P., O'Rioridan M. A., Somich G. A., Amini S. B., Pretlow T. G., **Cancer Res.**, 1991; 51, 1564-7.
71. Lee NK, Park JS, Park E, Paik HD. Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. **Lett Appl Microbiol** 2007;44:274-8.
72. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 2004; 142(2): 231-55.
73. Jackson PE, O'Connor PJ, Cooper DP, Margison GP, Povey AC. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. **Carcinogenesis**. 2003, 24:527-33
74. Szatrowski T. P., Nathan C. F., **Cancer Res.**, 1991; 51, 794-8.
75. Skrzydewska E, Stankiewicz A, Michalak K, Sulkowska M, Zalewski B, Piotrowski Z. Antioxidant status and proteolytic-antiproteolytic balance in colorectal cancer. **Folia Histochem Cytobiol**. 2001, 39 Suppl 2:98-99
76. Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. **J Agric Food Chem**. 1999; 47(4):1460-6.
77. Azcárate-Peril, M. A.; Sikes, M.; Bruno-Bárcena, J. M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. Bethesda, 2011; 301(3), G401–G424.
78. Lutgendorff, F.; Nijmeijer, R. M.; Sandström, P. A.; Trulsson, L. M.; Magnusson, K. E.; Timmerman, H. M.; Van Minnen, L. P.; Rijkers, G. T.; Gooszen, H. G.; Akkermans, L. M.; Söderholm, J. D. Probiotics prevent intestinal barrier

dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. **PLoS One**, 2009; 4(2):4512-24.

79. Lutgendorff, F.; Trulsson, L. M.; Van Minnen, L. P.; Rijkers, G. T.; Timmerman, H. M.; Franzén, L. E.; Gooszen, H. G.; Akkermans, L. M.; Söderholm, J. D.; Sandström, P. A. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2008; 295(5), G1111–G1121.

80. Carroll, I. M.; Andrus, J. M.; Bruno-Barcena, J. M.; Klaenhammer, T. R.; Hassan, H. M.; Threadgill, D. S. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2007; 293 (4), G729-G738.

81. Han, W.; Mercenier, A.; Ait-Belgnaoui, A.; Pavan, S.; Lamine, F.; Van, S II.; Kleerebezem, M.; Salvador-Cartier, C.; Hisbergues, M.; Bueno, L. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2006; 12(11):1044-52.

82. Kullisaar, T., Songisepp, E., Aunapuu, M., Kilk, K., Arend, A., Mikelsaar, M., Rehema, A., Zilmer, M. Complete glutathione system in probiotic *L. fermentum* ME-3. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2010; 46(15):527-31, 2010.

83. BAI, A. P.; OUYANG, Q. XIAO, X.; R.; LI, S. F. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. **International Journal of Clinical Practical**, 2006; 60(3):284-8.

84. Hegazy, S. K.; El-Bedewy, M. M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology**, 2010; 16(33):4145-51.

85. Truusalu, K.; Mikelsaar, R. H.; Naaber, P.; Karki, T.; Kullisaar, T.; Zilmer, M.; Mikelsaar, M. Eradication of *Salmonella Typhimurium* infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. **BMC Microbiology**, 2008; 8(132):1-6.

86. Pochart P, Marteau P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud JC. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: An in vivo study using intestinal perfusion. **Am J Clin Nutr**. 1992, 55:78-80.

87. Simonovska B, Vovk I, Andresek S, Valentová K, Ulrichová J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **J Chromatogr A**;2003; 1016:89-98.

88. Kumar RS, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Thirunavukkarasu C, et al. Lactobacillus plantarum AS1 isolated from south Indian fermented food Kallappam suppress 1,2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male Wistar rats. **Appl Biochem Biotechnol.** 2012; 166(3):620-31.
89. Kumar A, Singh NK, Sinha PR, Kumar R. Intervention of acidophilus-casei dahi and wheat bran against molecular alteration in colon carcinogenesis. **Mol Biol Rep.** 2009, 37:621-627.
90. Pool-Zobel, B. et al. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutation Research,** 2005;591:74–92.
91. Ho JC, Zheng S, Comhair SAA, Farber C, Erzurum SC. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer. **Cancer Res** 2001; 61: 8578-85.
92. Vipperla, K.; O’Keefe, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. **Nutrition in Clinical Practice,** 2012; 27(5):624-35.
93. Tedelind, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology,** 2007; 13(20):2826-32.
94. Hosseini, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews,** 2011;69(5):245-58.
94. Huang, Y. et. al. Inhibition of histone deacetylases. **Methods Mol Biol.** 2011, 125(4):525-31.
95. Rajendran, P. et al. Histone deacetylase turnover and recovery in sulforaphane-treated colon cancer cells: competing actions of 14-3-3 and Pin1 in HDAC3/SMRT corepressor complex dissociation/reassembly. **Mol Cancer.** 2011, 30:10-68.
96. Irrazábal, T. et al. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. **Molecular Cell.** v. 54, p. 309-320, 2014.
97. Branning A, Molin G, Adawi D, Hagslatt ML. Blueberry Husks and Probiotics Attenuate Colorectal Inflammation and Oncogenesis, and Liver Injuries in Rats Exposed to Cycling DSS-Treatment. **Plos One.** 2012; (7).
98. Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR, Turner JR. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. **Lab Invest.** 2006; 86(2):191-201. doi: 10. 1038/labinvest.3700373 PMID: 16402035
99. Schwabe R. F., Jobin C. The microbiome and cancer. **Nat. Rev. Cancer** , 2013; 13, 800-12.

- 100.Mankertz J, Schulzke J. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications: **Curr Opin Gastroenterol.** 2007; 23(4):379-83. doi: 10.1097/MOG.0b013e32816aa392 PMID: 17545772
- 101.Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. **Intest Res.** 2015; 13(1):11. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11 PMID: 25691839
- 102.Uil JJ, van Elburg RM, van Overbeek FM, Mulder CJ, van Berge-Henegouwen GP, Heymans HS. Clinical implications of the sugar absorption test: intestinal permeability test to assess mucosal barrier function. **Scand J Gastroenterol** 1997;32:70-8.
- 103.Arrieta, M. C. et al. Alterations in intestinal permeability. **Gut**, 2006; 55:1512-5152.
- 104.Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2010, 298(6):G851-9. doi: 10.1152/ajpgi.00327.2009 PMID: 20224007
- 105.Gotteland M, Cruchet S, Verbeke S. Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Jan 17; 15(1):11± 7. PMID: 11136273
106. Russo F, Linsalata M, Clemente C, Chiloiro M, Orlando A, Marconi E, et al. Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy young volunteers. **Nutr Res.** 2012; 32(12):940-6. doi: 10.1016/j.nutres.2012.09.010 PMID: 23244539
- 107.Del Piano M, Balzarini M, Carmagnola S, Pagliarulo M, Tari R, Nicola S, et al. Assessment of the Capability of a Gelling Complex Made of Tara Gum and the Exopolysaccharides Produced by the Microorganism *Streptococcus thermophilus* ST10 to Prospectively Restore the Gut Physiological Barrier: A Pilot Study. **J Clin Gastroenterol.** 2014; 48:S56-61. doi: 10.1097/MCG.0000000000000254 PMID: 25291130
- 108.Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, 2009; 58,1091–1103.
- 109.Topping,D.L. et al. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol. Rev.**, 2001; 81, 1031-64.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Estudos anteriores relataram o benefício do uso dos probióticos e simbióticos na redução da incidência de lesões pré-neoplásicas e tumores colorretais em modelos animais, além de retardar a progressão do câncer associado às DII. Os mecanismos subjacentes envolvidos contemplam a modificação da composição da microbiota intestinal; alteração da atividade metabólica da microbiota; degradação de compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal; produção de compostos com atividade anti-carcinogênica; imunomodulação; melhora da barreira intestinal; alteração na fisiologia do hospedeiro e inibição da proliferação celular e indução de apoptose nas células tumorais.

No nosso estudo, foi observado que a utilização do simbiótico confere maior proteção comparada ao uso do probiótico isoladamente. Acreditamos que os resultados obtidos sejam justificados pelo poder antioxidante do probiótico VSL#3 e do PBY, que foram capazes de reduzir as concentrações dos produtos da oxidação e estimular a atividade de enzimas antioxidantes. Adicionalmente, houve um aumento na concentração dos AGCC, que possivelmente contribuíram para melhora da permeabilidade intestinal e proliferação das células saudáveis do cólon.

Dessa forma, encorajamos o consumo regular de probióticos associados a alimentos fontes de prebióticos como medida preventiva contra as desordens que acometem o intestino. Destacamos a importância do desenvolvimento de novos estudos, sobretudo com humanos, a fim de esclarecer outros mecanismos que possam estar relacionados ao desenvolvimento e progressão do CCR.