



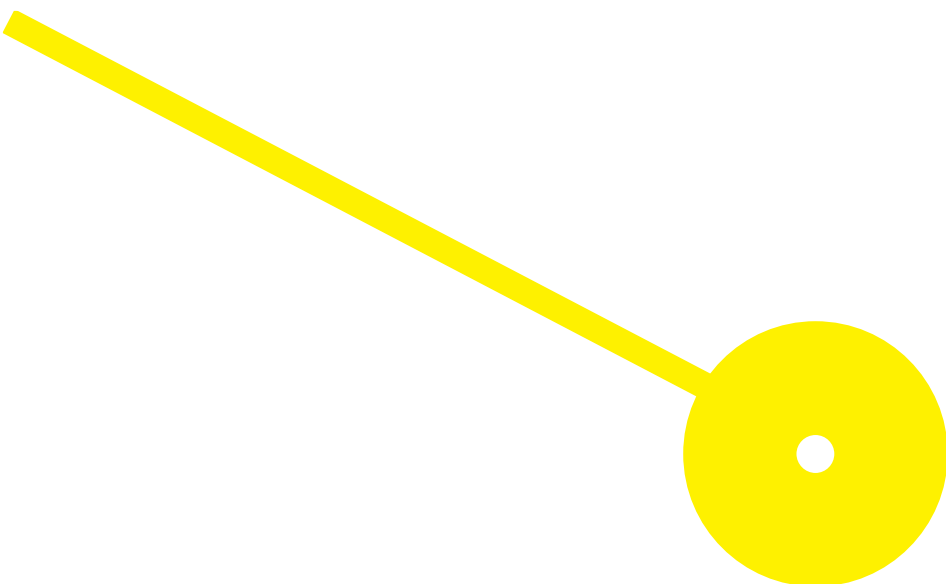
MESTRADO

BIOQUÍMICA EM SAÚDE – BIOQUÍMICA CLÍNICA E METABÓLICA

# Uso de probióticos na proteção contra o cancro colorretal

Rejane Viana dos Santos

09/2023





## **Uso de probióticos na proteção contra o cancro colorretal**

### **Autor**

Rejane Viana dos Santos

### **Equipa de orientação**

Doutora Ana Cláudia Pereira, Prof. Auxiliar (Universidade Fernando Pessoa)  
Doutor Rúben Fernandes, Prof. Catedrático (Universidade Fernando Pessoa)  
Doutora Pilar Baylina, Prof. Adjunto (Instituto Politécnico do Porto)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo da Bioquímica Clínica e Metabólica pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Inicialmente, presto minha imensa gratidão ao grupo de orientação e de suporte laboratorial que se empenharam a fazer este trabalho dar certo. Sem a ajuda de vocês certamente não seria possível.

Agradeço a minha orientadora, professora Ana Cláudia Pereira, que com muita sabedoria me apoiou na condução este trabalho e sempre trouxe um olhar aprofundado para que eu me desafiasse a entregar o melhor dentro de condições que tínhamos. Agradeço ao co-orientador, professor Rúben Fernandes, que é para mim uma grande referência como investigador e docente. E, desde 2021 me acolheu nas equipas de investigação e estimulou a perceber que o aprendizado auto-dirigido cria segurança e conhecimento que ninguém pode tirar de nós. Deixo ainda o meu agradecimento especialíssimo a minha co-orientadora, Professora Pilar Baylina, que é um exemplo de sensibilidade, alegria e estímulo. Gratidão por trazer colaborações enriquecedoras.

Um agradecimento sincero e leal a minha impecável equipa de lab, em especial nomeio a Catarina Rocha, o André Sousa e o Patrick Pais, que dividiram cada um sua sabedoria, empatia, momentos de diálogo, refeições, entretenimento e lazer; e me fizeram sentir que nunca estive sozinha. Vocês trouxeram leveza em cada fase desse processo. Obrigada também pelo empenho de cuidarem tão bem das filhas (células e bactérias) mesmo quando elas se comportavam mal (risos).

Agradeço imenso às colegas Cátia Almeida e Alexandra Aveiro, as quais tenho imensa admiração e foi graças a vocês que tudo isso começou. Vocês foram indispensáveis na continuidade desse trabalho. Agradeço aos colegas Diogo Ferreira, Catarina Teixeira, Vitorino Dias e Sara Sá por toda a troca, apoio e *insights* para este trabalho.

Tenho imenso gosto de agradecer à Universidade Fernando Pessoa, que como instituição acolhedora, foi para mim, literalmente, uma casa de grandes aprendizados e trocas. Agradeço especialmente à professora Fátima Cerqueira, ao Ricardo Silva e ao CERLAB (Centro de Recursos Laboratoriais) da UFP, nas pessoas do Miguel e Patrícia. Sempre que a situação era desafiante vocês me ajudavam a desenrascar e foi graças a colaboração de vocês que chegamos até o final deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos de vida e escuta Esaú, Karol, Ramon, Max, Lua, Patrícia, Flavinha, Nanda, Carla e Esther, que ofereceram apoio em dias bem desafiantes, e trouxeram palavras sábias e de conforto sempre.

Agradeço ao meu companheiro, André Neves, que despende tempo para aprender sobre coisas completamente alheias à sua área para me apoiar, e que acredita no meu potencial me ajudando a acreditar que o céu é o limite.

Por último, mas nem de longe menos importante, meu agradecimento especial aos meus pais (Roque e Cleuza) que fizeram a distância intercontinental parecer centímetros para todo o amor e orações que são capazes de oferecer. Agradeço as minhas irmãs (Rene e Neia), aos meus sobrinhos lindos (Rhavi e Nicolas) que cotidianamente me dão motivos para sorrir, e as primas e primos e toda minha família, que é rede de apoio e cuidado. Obrigada por me fazerem sentir tão amada serem suporte para eu não desistir.

Agradeço ainda a Deus e todas as entidades que estão comigo e me orientam através de uma energia, um sinal ou uma intuição.

*“Eu sozinha ando bem, mas com vocês ando melhor”*

## Resumo

A obesidade é uma doença metabólica crônica definida pelo excesso de gordura e hipertrofia do tecido adiposo, associada a elevados riscos à saúde. Atualmente, é considerada um dos problemas de saúde pública mais prevalentes, com altas taxas de mortalidade. Estudos recentes indicam que mais de 40% dos pacientes com câncer gastrointestinal estão acima do peso, sendo a obesidade o principal fator de risco extrínseco para o cancro colorretal (CCR). A metainflamação sustentada pelo tecido adiposo fornece lipídios circulantes, espécies reativas de oxigênio e metabólitos pró-inflamatórios cruciais no desenvolvimento e agressividade tumoral. Da mesma forma, há uma forte associação entre doenças metabólicas e a microbiota intestinal, que pode atuar como fator de predileção ou proteção para o CCR. Mudanças positivas na microbiota intestinal com o uso de probióticos podem induzir uma resposta protetora. Assim, o objetivo deste estudo é investigar o efeito de um probiótico de uso terapêutico e sua atividade antitumoral em células tumorais intestinais expostas a condições de adiposidade. **Metodologia:** Inicialmente, foram produzidos dois tipos de secretomas: 1) sobrenadante obtido da cultura de um *cocktail* de bactérias probióticas e 2) secretoma de diferenciação da linha celular 3T3-L1, pré-adipócitos de ratinho. Para otimizar a diferenciação, 10  $\mu$  M de Pioglitazona foram usados num dos ramos da diferenciação de pré-adipócitos. Seguidamente, a este secretoma de adiposidade foi ainda adicionado 0%, 10% e 50% de secretoma de macrófagos, obtido da cultura da linha celular RAW de ratinhos, com o objetivo de estudar diferentes graus de inflamação. Estas 6 condições de adiposidade e inflamação foram usadas para realizar ensaios in vitro de viabilidade celular, migração e testes antioxidantes na linha celular Caco2, adenocarcinoma de cólon, usando esses secretomas. Os ensaios foram realizados em triplicado com IC de 95%. **Resultados:** Os resultados mostraram que os dois secretomas aumentaram a viabilidade na linha tumoral Caco2, sem identificação de efeito benéfico na proteção antitumoral neste modelo de doença. No entanto, o probiótico antes da suplementação do secretoma previu um potencial efeito agressor na migração celular, especialmente em contextos que melhor mimetizam a obesidade ( $***p < 0.0001$ ). Além disso, foi observado um efeito de proteção antioxidante na linha tumoral de cólon, especialmente em duas condições a) que mimetizam o tecido adiposo "normal" ( $*p < 0.05$ ) e b) adiposidade com inflamação ( $*p < 0.05$ ). **Discussão:** O uso de probióticos promove alterações fisicoquímicas na microbiota intestinal, seja pelo aumento na produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) ou por componentes antitumorais e antitumorais aumentados, influenciando positivamente a modulação imunológica. A suplementação de probióticos ativa as defesas antioxidantes e está associada ao tumor de cólon, pois a disbiose da microbiota promove a estimulação de inflamação crônica pela produção acentuada de ERO, que induzem danos ao DNA, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Por fim, a Pioglitazona, apesar de ser um medicamento antidiabético que reduz a resistência à insulina, está associada a uma redução modesta de 9% no risco de desenvolver CCR em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) com esse tratamento. **Conclusão:** Este trabalho piloto traz à luz alguns resultados que podem explicar por que é que a modulação da microbiota intestinal usando probióticos é uma estratégia alternativa para promover melhorias na condição e estadio do tumor de cólon. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel da Pioglitazona nesse tipo de tumor e dos metabólitos da obesidade que são atenuados com o uso de probióticos.

**Palavras-chave:** Cancro colorretal; Microbiota intestinal, Probióticos, Obesidade

## Abstract

Obesity is a chronic metabolic disease defined by excess fat and hypertrophy of adipose tissue and is associated with high health risks. Currently, obesity is considered one of the most prevalent public health problems and with high mortality rates. Authors suggest that obesity is an "acquired" disease with complex etiological factors. Recent studies have shown that more than 40% of patients with gastrointestinal cancer are overweight and that obesity is the main extrinsic risk factor for colorectal cancer (CRC). Therefore, the meta-inflammation sustained by adipose tissue provides circulating lipids, reactive oxygen species and pro-inflammatory metabolites crucial in tumor development and aggressiveness. Similarly, there is a strong association between metabolic diseases and the intestinal microbiota, which may function as a factor of predilection or protection for CRC. Positive changes in the intestinal microbiota with the use of probiotics can produce a protective response against. Thus, the objective of this study is to investigate the effect of a probiotic for therapeutic use and its antitumor activity in intestinal tumor cells exposed to adiposity conditions. **Methodology:** Initially two types of secretomes were produced: 1) supernatant from a cocktail of probiotic bacteria, and 2) secretome of differentiation of cell line 3T3-L1, pre-adipocytes of mice. To optimize the differentiation, 10  $\mu\text{M}$  of Pioglitazone were used in one of the branches of the differentiation of pre-adipocytes. To this secretome was then added 0%, 10%, and 50% of macrophage secretome, obtained from the culture of the RAW mouse cell line, aiming to study different degrees of inflammation. These six conditions of adiposity and inflammation were used to conduct in vitro assays. Then, in vitro assays of cell viability, migration and antioxidant tests were performed on Caco2 cell line, colon adenocarcinoma, using these extracts. The assays were performed in triplicate with 95% CI. **Results:** The results showed that the two extracts increased viability in the tumor line Caco2, without identification of beneficial effect in the anti-tumor protection in this disease model. However, the probiotic prior to secretome supplementation predicted a potential aggressor effect of cell migration, especially in contexts that better mimic obesity ( $***p < 0.0001$ ). In addition, an antioxidant protection effect was observed in colon tumor, especially under two conditions a) that mimic "normal" adipose tissue ( $*p < 0.05$ ) and b) adiposity with inflammation ( $*p < 0.05$ ). **Discussion:** The use of probiotics promotes physicochemical changes in the intestinal microbiota, either by increased production of short chain fatty acids (SCFA) or increased antitumor and antimutagenic components, which positively influence immune modulation. Probiotic supplementation activates antioxidant defenses and is one of the factors associated with colon tumor, because microbiota dysbiosis promotes stimulation of chronic inflammation by the marked production of ROS that induce damage to DNA, activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Finally, the Pioglitazone, despite being an antidiabetic drug that reduces insulin resistance, is associated with a modest reduction of 9% in the risk of developing CRC in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) with this treatment. **Conclusion:** This pilot work brings to light some findings that may answer why the modulation of the intestinal microbiota using probiotics is an alternative strategy to lead to improvements in the condition and stage of the colon tumor. Additional studies are needed to clarify the role of Pioglitazone in this type of tumor and the metabolites of obesity that are attenuated using probiotics.

**Keywords:** colorectal cancer; gut microbiome; probiotics; obesity

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Biomarcadores e diagnóstico da obesidade</b> .....	1
<b>1.2. Cancro Gastrointestinal</b> .....	5
<b>1.2.1Cancro Colorretal</b> .....	8
<b>1.3. Obesidade e cancro colorretal</b> .....	10
<b>1.4. A microbiota intestinal</b> .....	12
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	14
<b>2.1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento</b> .....	14
<b>2.1.1Caracterização das estirpes por Sequenciação de Sanger</b> .....	16
<b>2.1.2 Produção de sobrenadante bacteriano</b> .....	17
<b>2.3 Linhas celulares</b> .....	18
<b>2.3.1 Recolha do secretoma de uma co-cultura de adipócitos maduros e RAW 264.7</b> .....	19
<b>2.3.2 Ensaio de citotoxicidade celular</b> .....	21
<b>2.3.3 Ensaio de migração celular</b> .....	23
<b>2.3.4 Ensaio para determinar stresse oxidativo</b> .....	24
<b>2.3.5 Avaliação da expressão de mRNA de fatores inflamatórios por RT-qPCR</b> .....	24
<b>Extração de RNA e medição da purificação</b> .....	24
<b>Amplificação de RNA</b> .....	25
<b>Primers e sondas utilizados</b> .....	25
<b>2.4 Análise estatística</b> .....	26
<b>3. Resultados</b> .....	26
<b>3.1. Crescimento bacteriano</b> .....	26
<b>3.2 Adiposidade aumenta a viabilidade de tumor de cólon <i>in vitro</i></b> .....	29
<b>3.3 Probióticos não reduzem os efeitos da adiposidade</b> .....	30
<b>3.4 Genes inflamatórios responsivos à terapia probiótica</b> .....	31
<b>3.5 Atividade antioxidante e de migração</b> .....	33
<b>4. Discussão</b> .....	35
<b>4.1 Meio de crescimento ideal para bactérias probióticas</b> .....	36
<b>4.2 Bactérias probióticas melhoram a resposta imune</b> .....	38
<b>4.3 Expressão de genes inflamatórios associados ao CCR</b> .....	40

<b>4.4 Probióticos podem proteger contra agressividade do adenocarcinoma de cólon em modelo <i>in vitro</i></b> .....	41
<b>4.5 Pioglitazona reduz migração em Caco2</b> .....	42
<b>5. Conclusão</b> .....	42
<b>Referências bibliográficas</b> .....	44

## Lista de abreviações

ACP	Polipose Coli Adenomatosa
AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta
AGL	Ácidos Gordos Livres
AKT	Serina Treonina Cinase
cDNA	DNA complementar
CG	Cancro gástrico
CCR	Cancro colorretal
CE	Cancro de esófago
CGI	Cancro gastrointestinal
CHC	Cancro hepatocelular
CLED	Agar Cistina Lactose Eletrólito Deficiente
CP	Cancro de Pâncreas
DEX	Dexametasona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMT2	Diabetes Melitus Tipo 2
GOS	Galato-oligossacarídeos
ICBs	Bloqueadores Imuno-oncológicos Check-point
IFN- $\gamma$	Interferão-gama
IGFs	Fator de crescimento semelhante à Insulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INS	Insulina
mA	Miliamperes
MET	Transição Epitélio Mesenquimal
MEM	Meio Essencial Mínimo
MSA	Manitol Salt Agar
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor Nuclear Kappa- $\beta$
PAI 1	Plasminogénio Ativador Inibidor-1
PBS	Tampão Fosfato
PI3K	Inibidores de Fosfatidilinosiol-3-Cinase
Pio	Pioglitazona
PPAR	Recetor do Peroxissoma Proliferador-Ativado
RI	Resistencia à Insulina

ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	quantificação da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TA	Tecido Adiposo
TAB	Tecido Adiposo Branco
T CD8+	Linfócitos T citotóxicos 8
TGB- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral- beta
TLR	Recetores do tipo Toll Like
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
T Reg	Linfócitos T reguladores
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UTI	Infeções do Trato Urinário
WHO	Organização Mundial de Saúde

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Classificação de obesidade por IMC em adultos.....	4
Tabela 2: Característica das bactérias presentes no cocktail probiótico.....	15
Tabela 3: Objetivos dos meios de cultura bacterianos utilizados para crescimento e diferenciação das estirpes presentes no probiótico.....	16
Tabela 4: Conjunto de sequência dos primers para a sequenciação Sanger.....	17
Tabela 5: Condições de amplificação no termociclador.....	17
Tabela 6: Conjunto de sequência dos primers para o RT-qPCR.....	25
Tabela 7: Condições de amplificação no termociclador do RT-qPCR.....	25

## Lista de Figuras

Figura 1: Componentes do tecido adiposo.....	2
Figura 2: Implicações do remodelamento do tecido adiposo.....	3
Figura 3: Características da célula tumoral.....	6
Figura 4: Componente do omento humano.....	8
Figura 5: Gráfico de barras de incidência de CCR por região .....	9
Figura 6: Resumo das principais proteínas secretadas pelo tecido adiposo branco (adipócito de tamanho normal <i>versus</i> adipócitos hipertróficos) .....	11
Figura 7: Procedimento para obtenção do sobrenadante bacteriano ressuspendido em MEM....	18
Figura 8: Procedimento para produção do secretoma de diferenciação de adipócitos da linha celular 3T3-L1.....	20
Figura 9: Ilustração dos seis conteúdos produzidos após diferenciação de adipócitos.....	21
Figura 10: Resultado da coloração de gram em meio de cultura sólido .....	27
Figura 11: Resultado do meio Agar Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED).....	28
Figura 12 Imagem sequenciamento Sanger para o gene Lac1 .....	28
Figura 13: Imagem do sequenciamento Sanger para o gene 16S (bactéria total).....	29
Figura 14: Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT em Caco2 suplementadas com secretoma de diferenciação de 3T3-L1.....	30
Figura 15: Viabilidade celular de linhas Caco2 suplementadas com sobrenadante de bactérias do cocktail probiótico e secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1.....	31
Figura 16: Expressão génica de interleucina receptores de membrana por RT-qPCR.....	32
Figura 17: Resultado do Stresse oxidativo em Linha celular Caco2.....	33
Figura 18: Resultado do ensaio de migração em Linha celular Caco2.....	35
Figura 19: Influência da microbiota intestinal na imunidade.....	39

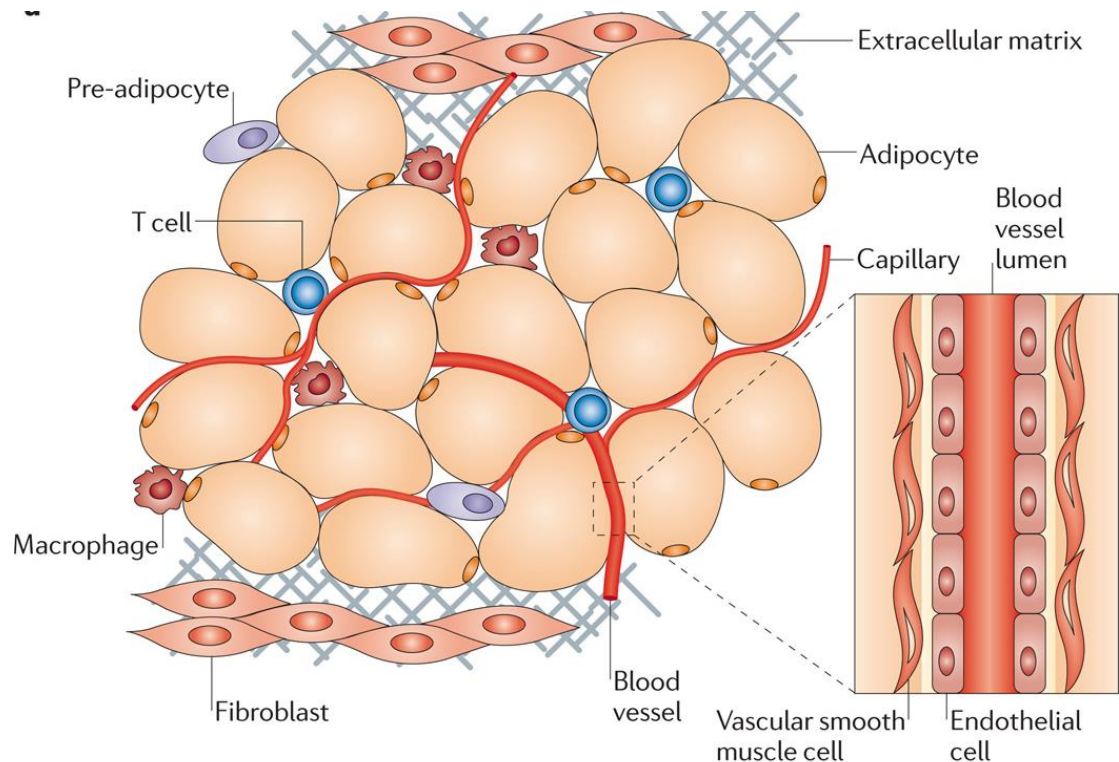
## **1. Introdução**

A obesidade é uma doença metabólica crónica definida pelo excesso de gordura e hipertrofia do tecido adiposo e está associada a elevados riscos de saúde (1). Na atualidade é considerada um dos mais prevalentes problemas de saúde pública e com taxas de mortalidade a disparar (2). Segundo a OMS a obesidade é uma epidemia global e, em 2016, cerca de 650 milhões de adultos (13% da população mundial) apresentavam estado de obesidade e 1,9 bilhão tinha sobrepeso (1). Autores sugerem que a obesidade é uma doença “adquirida” com fatores etiológicos complexos que derivam da interação entre condicionantes genéticos, epigenéticos, hormonais, ambientais, socioeconómicos, psicológicos e estilo de vida (dieta e sedentarismo, principalmente) (3, 4). Estudos recentes demonstraram que mais de 40% dos pacientes com cancro gastrointestinal estão acima do peso e que a obesidade é o principal fator de risco extrínseco para cancro colorrectal (5, 6).

Além da obesidade, a comunicação bilateral entre doenças metabólicas e o microbioma intestinal têm aumentado o interesse na investigação sobre o papel protetor ou indutor da microbiota do hospedeiro ter correlação com diversos tipos de cancro, além disso, a composição de microbiota intestinal pode trazer benefícios profiláticos em pacientes que estão em tratamento (7).

### **1.1. Biomarcadores e diagnóstico da obesidade**

Em termos bioquímicos, a obesidade desenvolve-se a partir de alterações no tecido adiposo (TA), que é um órgão endócrino capaz de armazenar energia em forma de triglicerídeos para manutenção da homeostase energética local e sistémica (Figura 1).



*Figura 1: Componentes do tecido adiposo: Os adipócitos são os principais componentes do tecido adiposo, são células capazes de armazenar energia e modular a atividade endócrina desse órgão. Além dos adipócitos, outras células presentes no TA são: células precursoras (incluindo pré-adipócitos), fibroblastos, células vasculares e células imunes, que juntas constituem a fração vascular estromal do tecido adiposo. Esta fração estromal compreende componentes responsáveis pela sustentação e suprimento energético, nutricional e de origem fundamentais para que os componentes produzidos pelo TA sejam distribuídos, as adipocinas. As adipocinas são hormonas ou fatores de crescimento com funções de agir no organismo sistematicamente. As células vasculares também secretam e são responsivas a proteínas secretadas pelo tecido adiposo. Além das células vasculares, outros componentes ativos do tecido adiposo incluem macrófagos e células T residentes, que têm papéis importantes na determinação do estado imunológico do tecido adiposo. O arranjo da estrutura do TA que não são os adipócitos é chamado então de matriz extracelular e deriva de fibroblastos que funciona para fornecer suporte mecânico, e o excesso de matriz pode levar à disfunção do tecido adiposo. Fatores que são secretados por esses diferentes componentes celulares são críticos para a manutenção da homeostase no tecido adiposo e em todo o corpo. (Adaptado de OUCHI, 2011) (7)*

Indivíduos adultos magros e saudáveis não possuem grandes quantidades de gordura visceral, residindo a maior parte do TA em locais subcutâneos onde desempenha função termorreguladora e onde os triglicerídeos podem ser facilmente mobilizados a partir da flutuação de necessidade (4). Contudo, em indivíduos obesos, o TA passa pelo excesso da capacidade de armazenamento energético além de zonas subcutâneas e, conseqüentemente desenvolve-se o quadro de hiperplasia (aumento do número de adipócitos) e hipertrofia (aumento do tamanho dos adipócitos) como forma de compensação, passando a ser depositados noutras zonas do corpo, como na região visceral (4). A expansão da massa do TA passa por uma remodelação tecidual

caracterizada pela sobreprodução da matriz extracelular, aumento na infiltração de células imunes e uma elevada resposta pró-inflamatória, conforme apresentado na Figura 2 (9).

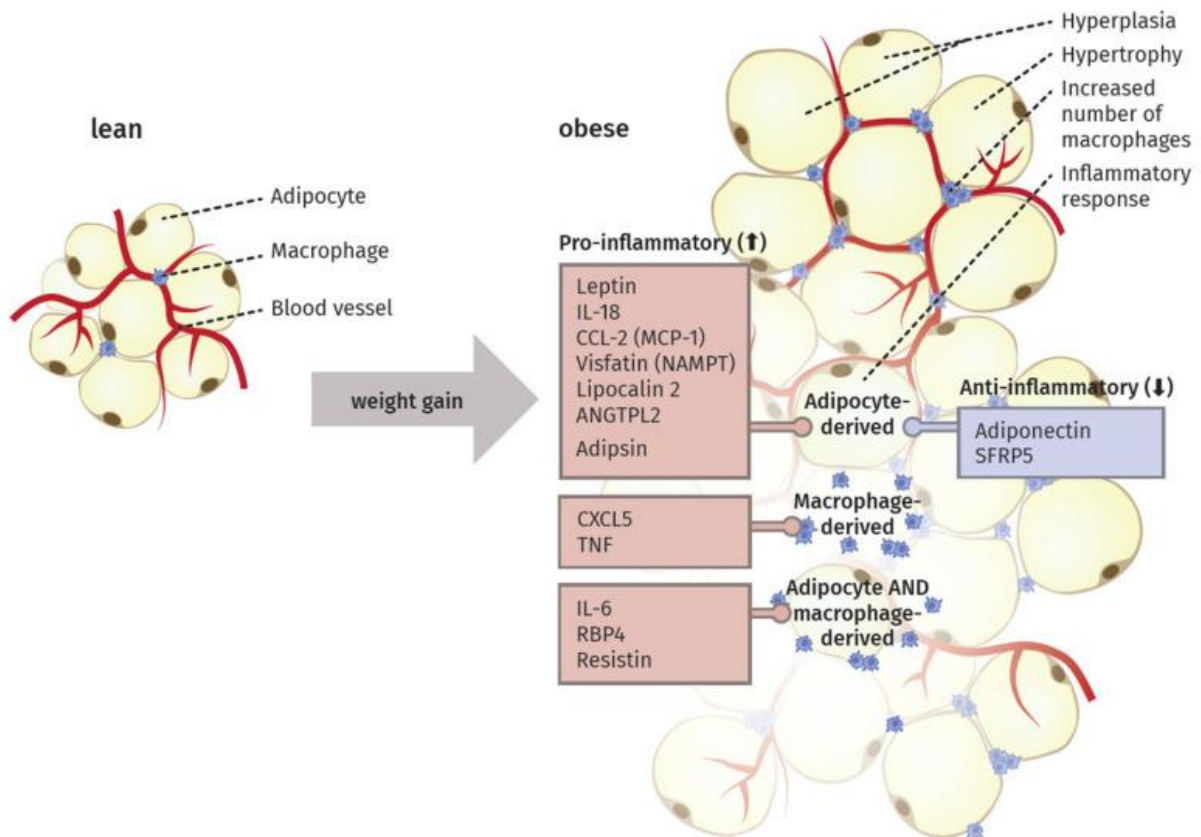


Figura 2: Implicações do remodelamento do tecido adiposo: A hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo podem resultar ainda em apoptose de adipócitos, regulações quimiotáticas e hipóxia de ácidos gordos livres. Esses mecanismos acontecem para promover a migração aumentada de macrófagos para o tecido adiposo. Além disso, as secreções de diferentes adipocitocinas, produzidas pelos adipócitos e macrófagos infiltrados são aumentadas, enquanto os produtos secretores anti-inflamatório são regulados negativamente. Com isso, desenvolve-se um ambiente pró-inflamatório de baixo grau, que surge do tecido adiposo, aumentado e remodelado em indivíduos obesos. (Adaptado de Hornung, 2021) (9)

A sobrecarga e remodelação tecidual aumenta risco de deposição de TA em zonas ectópicas (depósitos viscerais, hepático, músculo-esquelético e em células beta-pancreáticas), aumentando problemas em órgãos sistêmicos. Isso ocorre porque a gordura visceral é metabolicamente ativa e está constantemente a libertar ácidos gordos livres (AGL) na circulação portal (10, 4). Além de AGL, mais de 20 hormonas e adipocinas são libertadas pelo TA, a exemplo do estrogénio, insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), leptina, adiponectina, apelina, visfatina, resistina, chemerin, omentina, nesfatina, vaspina, citocinas inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) quimiocina (motivo C-C)

ligante 2 (CCL2), plasminogênio ativador inibidor-1 (PAI-1), e as famílias interleucinas (por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-27 e IL-31) (6). A elevada liberação de AGL e citocinas inflamatórias pelo TA são características clássicas para categorizar a obesidade como doença, pois contribui para vários parâmetros de síndrome metabólica, inflamação sistêmica, dislipidemia e aterosclerose (11, 4).

A obesidade está associada à resistência insulínica (RI) e com o risco aumentado para desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, síndrome metabólica, apneia, distúrbios musculoesqueléticos, cancro e fertilidade prejudicada (12, 3). A RI é o mecanismo primário derivado do tecido adiposo branco (TAB) remodelado e depositado na região visceral, que é acompanhada pela secreção de insulina prejudicada (4). Em pacientes com DMT2 instalada, o fármaco antidiabético Pioglitazona (Pio) é um dos aprovados e utilizados por ser uma droga insulino-sensibilizante envolvida na mediação do receptor nuclear peroxissoma proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), um regulador de transcrricional da diferenciação adipocitária e armazenamento de lípidos, abundantemente presentes no tecido adiposo (13). Paradoxalmente, a consequência do tratamento com Pio pode resultar em ganho de peso pela formação de novos adipócitos (hiperplasia), apesar de promover melhora do perfil lipídico (dislipidemia), sensibilidade insulínica e controlo glicémico (13).

Em adultos, o diagnóstico de obesidade é feito pelo Índice de Massa Corporal (IMC), (calculado pelo quociente entre o peso corporal em quilogramas (kg) e o quadrado da altura, em metros quadrados (m<sup>2</sup>)), onde são considerados pontos de corte ( Tabela 1). Quando o valor de IMC é igual ou superior a 30kg/m<sup>2</sup> é então diagnosticada a obesidade. Dentro da obesidade existem três graus estabelecidos a partir desse índice, que varia entre grau I ao grau III. Além destes, existe o grau mais recentemente categorizado como superobesidade (IMC >50kg/m<sup>2</sup>) (14).

Tabela 1: Classificação de obesidade por IMC em adultos

CLASSIFICAÇÃO	IMC (kg/ m <sup>2</sup> )	RISCO DE CO-MORBIDADES
Baixo peso	<18.5	Baixo (mas levemente aumentado para outros problemas clínicos)
Peso normal	18.5 – 24.9	médio
Sobrepeso	25 – 29.9	Levemente aumentado

Obesidade	$\geq 30$	
Obesidade grau I	30 – 34.9	Moderado
Obesidade grau II	35 – 39.9	Severo
Obesidade grau III	$\geq 40$	Muito severo

As principais consequências da obesidade envolvem o aumento do risco para doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II (DMT2) e outras complicações metabólicas, como doença hepática gordurosa não alcoólica associado a síndrome metabólica (4). Projeta-se que, até 2025, 300 milhões de pessoas terão DMT2 como consequência da obesidade (15).

A expansão do tecido adiposo também é acompanhada de alterações inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau, caracterizada pela elevada infiltração de macrófagos classe M1 e secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteínas de fase aguda (4). A infiltração de macrófagos M1 ocorre em maior grau no tecido adiposo visceral do que subcutâneo que, ao tornarem-se “macrófagos ativos” mais destes são recrutados, expressando resposta fenotípica pró-inflamatória com libertação de fatores inflamatórios (16, 4).

A expressão de TNF-alfa, IL-6 e PAI-1 são as principais citocinas libertadas pelo tecido adiposo metabolicamente ativo e estão envolvidas na progressão e risco tumoral, uma vez que promove inflamação crónica (4). Além destas citocinas, o tecido adiposo infiltrado de macrófagos metabolicamente ativos prejudica a expressão de adiponectina e IL-10, envolvidas com proteção contra diversos tipos de tumor (17, 6). Assim, estas alterações estão implicadas no favorecimento da estimulação de um microambiente favorável à tumorigénese, progressão e metástase tumoral.

## 1.2. Cancro Gastrointestinal

O cancro está associado com desequilíbrio da homeostase celular e funções prejudicadas. É classificado com base no órgão, no tecido de origem ou nas características moleculares da célula tumoral (18).

No desenvolvimento tumoral, o desequilíbrio homeostático é acompanhado pela proliferação descontrolada de células malignas num hospedeiro (19). Esta proliferação compreende seis habilidades biológicas que visam organizar e racionalizar reservas com a finalidade de manter a

célula tumoral viável. Estes seis mecanismos compreendem: 1) sustentação da sinalização proliferativa, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) resistência à morte celular, 4) capacidade de imortalidade replicativa, 5) indução da angiogénese e 6) ativação da invasão e da metástase (19).

Subjacente às seis capacidades descritas, está a instabilidade do genoma e inflamação. O cancro originalmente decorre de mutações no DNA celular, seguido de sustentação de um recurso complexo que é o recrutamento de outras células não tumorais que contribuem para a sobrevivência, o “microambiente tumoral”. Este recrutamento inclui células imunes, células estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular (MEC), compreendido como promotor ativo da progressão do cancro (20, 19). Em condições normais o sistema imunitário elimina estas células anómalas por um processo ordenado, chamado de morte celular programada ou apoptose. Contudo, estas células anómalas por vezes conseguem contornar o processo apoptótico e multiplicar-se de forma descontrolada, permitindo a evolução para cancro e, conseqüentemente, a tumorigénese avança para outros estágios, aprimorando progressão e agressividade tumoral por inviabilização das vias anti-apoptóticas (21, 22).

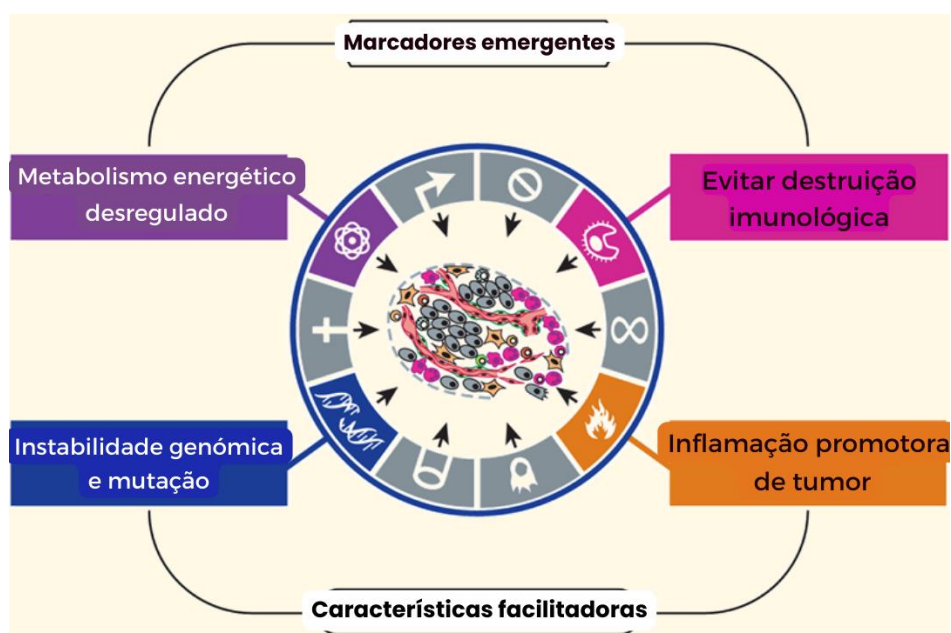


Figura 3: Características da célula tumoral. As células compartilham características comuns que contribuem para sua sobrevivência em detrimento da perda da homeostase tecidual. (Adaptado de Hanahan and Weinberg, Cell, 2011) (19)

O cancro tornou-se uma das principais causas de morte em todo o mundo, causando cerca de 10 milhões de morte em 2020 (5). Os fatores de risco comumente envolvidos com o surgimento do

cancro são a dieta, tabaco, infecções virais e bacterianas, exposição excessiva à radiação solar, exposição à determinados agentes químicos, poluição, hormonas, fatores hereditários e obesidade (23, 21, 20, 5). Atualmente, mais de 40% dos pacientes com cancro estão acima do peso, tornando a obesidade um importante fator de risco, principalmente em cancros de mama, pâncreas e ovário (20). Os fatores podem atuar isoladamente ou em sinergia durante anos (21, 5). Entre os vários tipos, os cancros gastrointestinais (CGI) são considerados também um grande problema de saúde pública, com desafios económicos e médicos devido a sua elevada prevalência e taxa de mortalidade (23). Cancros da região intra-abdominal são resultado de proliferação celular descontrolada, perda de funções das vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas e do comprometimento das principais vias metabólicas, nomeadamente vias que geram transição epitélio-mesenquimal (MET), vias proliferativas despoletadas pelo fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) /proteína quinase B (AKT) e vias de sinalização nuclear factor-kappa (NF- $\kappa$ B) (24).

Os tumores intra-abdominais são os mais prováveis de desenvolver e proliferar no ambiente omento majus (Figura 4). Omento majus é um órgão endócrino composto principalmente por adipócitos brancos, que se estende do estômago e cobre o intestino e que atuam como “banco energético” para armazenar e libertar energia (24, 6). O ambiente intra-abdominal com elevada presença de células tumorais e adipocitárias induz lipólise em adipócitos e  $\beta$ -oxidação em células tumorais, resultando em rápida proliferação de células tumorais (24). Este conceito de elevada disponibilidade de energia é determinante para perceber um dos mecanismos de sobrevivência da célula tumoral, pois os adipócitos ao redor do tumor suportam o fornecimento de substratos energéticos (ácidos gordos livres) e nutricionais para o crescimento anabólico das células tumorais (26, 24).

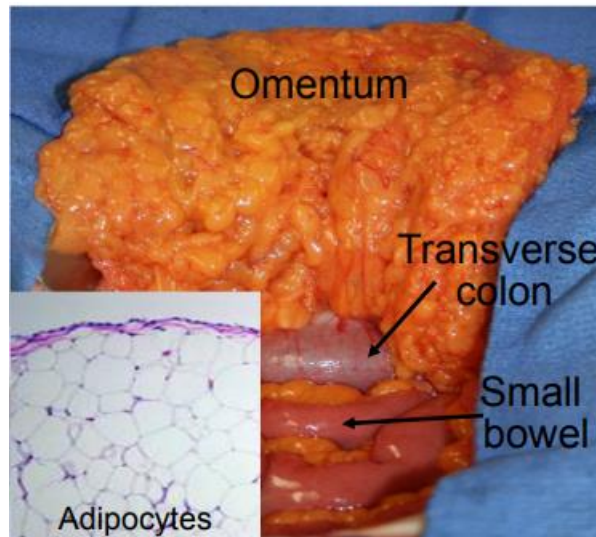


Figura 4: Componente do omento humano. Omento humano normal (estendido para cima) e coloração de hematoxilina e eosina (uma seção do omento humano normal) mostrando que o omento consiste principalmente de adipócitos cobertos por uma camada de células mesoteliais. (Adaptado de Nieman, 2011) (24)

Os sintomas e sinais de CGI podem incluir perda de peso, dor abdominal, disfagia, anorexia, podendo progredir para vários estágios, dependendo principalmente do local onde o tumor está instalado. Assim, os CGI podem ser divididos em cancro gástrico (CG), cancro colorrectal (CCR), cancro de esófago (CE), cancro pancreático (CP), e carcinoma hepatocelular (CHC)) (22). De acordo com a GLOBOCAN (2020), no geral, o cancro colorretal ocupa o terceiro lugar (10%) em termos de incidência, asseguir ao cancro da mama (11,7%) e do pulmão (11,4%), e o segundo (9,4%) em termos de mortalidade, asseguir ao cancro do pulmão (18%) (27). O Cancro colorretal é, assim, o cancro gastrointestinal mais comum e com maior taxa de mortalidade, tornando-se importante o estudo de novas abordagens terapêuticas e preventivas para este tipo de tumor.

### 1.2.1 Cancro Colorretal

Mais de 1.000.000 de novos casos de CCR são diagnosticados anualmente. Em homens, o CCR é o terceiro tipo de cancro mais incidente (10,6%), a seguir ao cancro do pulmão (14,3%) e da próstata (14,1%), e a terceiro (9,3%) em termos de mortalidade, a seguir ao cancro do pulmão (21,5%) e do fígado (10,5%). Em mulheres o CCR é o segundo diagnóstico mais comum (9,4%), a seguir ao cancro da mama (24,5%), e é a terceira causa de morte por cancro (9,5%), a seguir ao cancro da mama (15,5%) e do pulmão (13,7%) (27).

Os países desenvolvidos apresentam taxas de incidência cerca de 4 vezes superiores, comparativamente aos países em desenvolvimento. As maiores taxas de incidência de cancro do

cólon são encontradas nos países europeus, Austrália/Nova Zelândia e América do Norte, sendo Hungria e Noruega os países com maior incidência em homens e mulheres, respectivamente (Figura 5A). As taxas de incidência de cancro retal têm uma distribuição semelhante (Figura 5B). As taxas de incidência de cancro de cólon e retal tendem a ser baixas na maioria das regiões da África e na Ásia Central e do Sul (27).

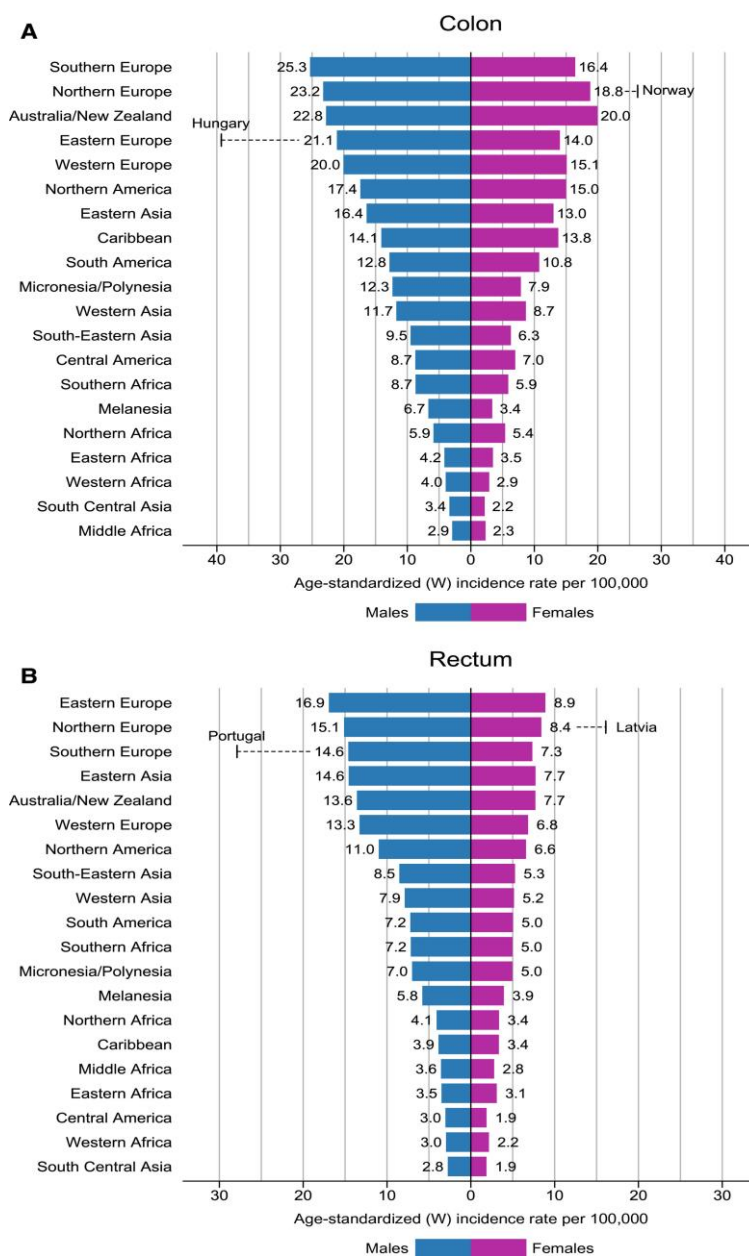


Figura 5: Gráfico de barras de incidência por região. Taxas padronizadas por idade e sexo para cancro (A) Cólon e (B) Reto em 2020. As taxas de cancro do cólon e cancro do reto são apresentadas em ordem decrescente da taxa padronizada por idade mundial (W) entre os homens (para efeitos de eliminar os condicionantes da diversidade etária nas populações a comparar), e as maiores taxas nacionais entre homens e mulheres são sobrepostas. Fonte: GLOBOCAN 2020 (28, 27).

De acordo com as estatísticas globais de cancro, em 2018 houve 1,8 milhões de novos casos de CCR, causando cerca de 860 mil mortes (7).

Do ponto de vista molecular, nas últimas três décadas, os estudos de genética molecular revelaram algumas mutações críticas subjacentes à patogénese das formas esporádicas e hereditárias do CCR, incluindo a inativação mutagénica do supressor tumoral da polipose coli adenomatosa (APC) resultando em sobreativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, proliferação celular desregulada e desenvolvimento de adenoma, ou instabilidade de microssatélites, avaliados com a detecção de mono-catenina e setores de di-nucleotídeos selecionados (29).

A gordura corporal é um fator de risco de CCR, enquanto a atividade física é protetora (apenas em cancro de cólon). O ganho de 10kg de gordura está associada com risco 8% maior de desenvolver CCR, ao passo que a perda ponderal reduz este risco em 27% (30). Além disso, dietas ricas em gordura e carnes vermelhas ou processadas têm sido associadas a um risco aumentado de cancro de cólon, mas não de cancro retal (7).

Apesar do CCR ser uma doença multifatorial influenciada por fatores ambientais e genéticos, dentro dos fatores de risco destacam-se antecedentes familiares positivos, tabagismo, consumo de álcool, estilo de vida, desregulação da microbiota intestinal e dieta (31). Recentes evidências corroboram que a obesidade é um dos principais fatores de risco extrínseco para a patogénese deste tipo de cancro (32, 33, 34, 35, 30, 6).

### **1.3. Obesidade e cancro colorretal**

Existem diferentes mecanismos que relacionam obesidade e cancro. Um dos mais evidenciados é o que relaciona o de excesso de lípidos circulantes e o aumento de espécies reativas de oxigénio, bem como maior secreção de metabolitos pró-inflamatórios do tecido adiposo (17).

A obesidade promove quadro de metainflamação, ou inflamação metabólica, sustentada pelo tecido adiposo, que potencia a libertação de citocinas conhecidas como adipocinas. As adipocinas estão intimamente relacionadas com a progressão de diversos tipos de cancro pois atuam na reprogramação do metabolismo das células cancerígenas, afetando o mecanismo de invasão, metástase e depuração imunológica, podendo potenciar a progressão do tumor (36).

**Proteínas envolvidas na angiogénese e homeostase vascular**

VEGF  
PAI-1

**Citocinas**

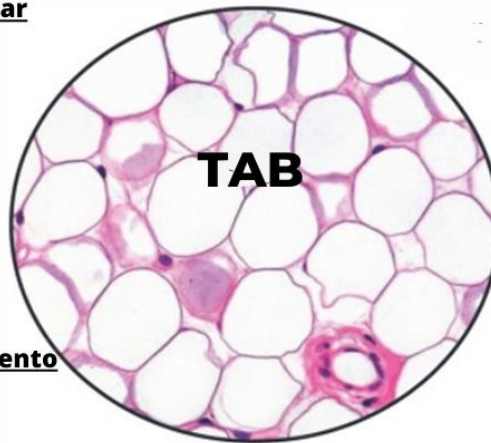
TNF- $\alpha$ ; IL-6  
IL-1 $\beta$ ; IL-8  
IL-18

**Fatores de Crescimento**

TGF- $\beta$

**Reguladores do Metabolismo dos lípidos**

RBP  
Lipocatina



TAB

**Quimiocinas**

MCP-1  
CXCL5

**Reguladores do Metabolismo da glicose**

Resistina  
Omentina  
Visfatina

**Hormonas**

Leptina  
Adiponectina

**Proteínas de Fase aguda**

Haptoglobina  
PCR

**Fatores do Complemento**

Adipsina  
Complemento Factor-B

Figura 6: Resumo das principais proteínas secretadas pelo tecido adiposo branco (tamanho normal e adipócitos hipertróficos). As adipocinas libertadas pelo TA estão associadas ao controlo fisiológico e patológico, dependendo dos tipos de moléculas e volume que são secretados. Por exemplo, o tecido adiposo hipertrófico na obesidade torna-se disfuncional pela libertação de um perfil perturbado de adipocinas com níveis elevados de fatores pró-inflamatórios como leptina, IL-6 e TNF-alfa e adiponectina reduzida, que é protetora contra a tumorigénese. Esta perturbação responde pelos fatores associados ao desenvolvimento e progressão tumoral, através da resistência à insulina, lipólise e ativação de várias vias inflamatórias com libertação de radicais livres de oxigénio (ROS). No contexto da obesidade, a expansão hipertrófica do tecido adiposo induz hipóxia local, ativação inflamatória e angiogénese reativa, com favorecimento a evolução tumoral. (Adaptado de Divella, 2016) (17)

Os mecanismos moleculares que correlacionam peso corporal e CCR precisam ser melhor conhecidos, mas sabe-se que o metabolismo lipídico anormal induzido por obesidade, adipocinas e outras hormonas, inflamação crónica, alterações de microbiota intestinal e homeostase do ácido biliar podem desempenhar papel importante na regulação metabólica da tumorigénese do CCR (6). O cenário de adiposidade aumenta ainda o risco de metástases para outros órgãos intra-abdominais, como hepático (6).

Além da obesidade, outro fator que pode influenciar significativamente o desenvolvimento do cancro colorretal é a disbiose da microbiota intestinal. Indivíduos com cancro colorretal têm uma microbiota intestinal alterado em comparação com indivíduos saudáveis (37). Bactérias do género Firmicutes, Fusobacteria, Lactococcus e Fusobacterium foram encontrados em abundância no tecido de pacientes com CCR em comparação com pessoas saudáveis (38). Ainda não está claro como a microbiota intestinal responde ou impulsiona a tumorigénese mas, quando

combinada à obesidade, promove desregulação metabólica e distúrbios adicionais envolvidos nesse tipo de cancro (37,7).

O tratamento de alguns cancros GI envolve o uso de fármacos imuno-oncológicos, conhecidos como bloqueadores *check-point* imunológicos (ICBs) para tumores sólidos (39). Entre estes, o Avelumab (anti-PD-L1) e o Relatimab (anti-LAG3) são utilizados em cancro gástrico. Já no CCR são usados anticorpos monoclonais onde o alvo são moléculas co-inibitórias para bloquear vias de regulação negativa do sistema imunológico, entre eles: 1) dois inibidores do ponto de controlo imunitário, que tem como alvo o ligando de morte programada 1 (PD-1) no cancro metastático, nomeadamente Keynote 028 e o Xequemate 142, que regula resposta imune quando a sua ativação se torna prejudicial ao hospedeiro, com uma taxa de resposta de 40% e 55%, respetivamente; e 2) Proteína-4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) (41, 40). Contudo, uma percentagem significativa de pacientes não respondem a essas imunoterapias, criando resistências primárias ou secundárias aos bloqueadores imunológicos e em que a taxa de resposta difere dependendo da localização do tumor. Adicionalmente, a abundância de *Bifidobacterium* na microbiota intestinal foi correlacionado com melhor resposta de células T no tratamento com anti-PD-L1 em combinação com alimentação oral destas bactérias, levando à quase abolição do crescimento tumoral por maturação celular dendrítica e atividade T CD8+ antitumor (40).

Assim, uma vez que os microrganismos desempenham papel na resposta imune normal e patológica, a intervenção com modulação da microbiota intestinal e dieta poderão desempenhar importante papel na terapêutica deste tipo de cancro.

#### **1.4. A microbiota intestinal**

Trilhões de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários, definem a microbiota e habitam principalmente em superfícies mucosas do trato respiratório, pele e trato gastrointestinal, com diferentes composições e abundâncias relativas (42, 22). A microbiota está presente nas superfícies de barreira epitelial e tem um relacionamento comensal com o hospedeiro (40)

A composição da microbiota muda ao longo do tempo por condições inerentes ao hospedeiro, genética, tipo de parto, dieta, estilo de vida, localização geográfica e idade, entre outros fatores, que levam a uma variação interindividual (40). De um modo geral, as microbiotas desempenham um papel importante na proteção contra infeções e, em particular a microbiota intestinal que,

adicionalmente, também produz vitaminas e atua como coadjuvante nas células imunes hospedeiras, como as células B de mucosa e células Treg colônicas (22). No entanto, em situações de disbiose, o desequilíbrio do ecossistema da microbiota do intestino afeta a saúde em geral, podendo levar ao surgimento de uma diversidade de doenças, entre elas, o cancro (42, 41, 40).

A microbiota intestinal contribui para a carcinogênese, seja aumentando ou diminuindo os riscos, a partir de 3 categorias: (i) alterando o equilíbrio da proliferação e morte de células hospedeiras, (ii) guiando a função do sistema imunológico e (iii) influenciando o metabolismo de fatores produzidos pelo hospedeiro, alimentos ingeridos e produtos farmacêuticos (42).

A sinergia entre o microbiota e a obesidade tem vindo a ser estudada, uma vez que parecem influenciar-se mutuamente (44, 43). Ao nível do filo, alguns autores sugerem que a obesidade pode estar associada ao aumento da correlação Firmicutes/Bacteroidetes em humanos (43). A correlação positiva entre diversidade limitada da microbiota em pacientes obesos favorece o aumento da absorção calórica, ao mesmo tempo que a obesidade parece ser responsável por alterações na microbiota intestinal, que inclui distúrbios metabólicos, resistência à insulina e inflamação crônica (44). Devido a sua complexidade, a microbiota intestinal passou a ser considerado como um órgão independente adquirido, que condiciona a extração de energia e nutrientes provenientes da dieta e promove a regulação físico-química do microambiente (45).

A microbiota intestinal tem vindo a ganhar relevo como parte fundamental na saúde humana, havendo evidências do seu papel complexo com a fisiologia do intestino, regulação do peso e metabolismo energético, uma vez que a produção de ácidos gordos de cadeia curta parece estar envolvida na regulação do apetite.

### **Papel anti-inflamatório dos probióticos**

Segundo a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos, 2014 (46), os probióticos “são microrganismos vivos que, após a ingestão em quantidades específicas, exercem função para a saúde do hospedeiro”. O prebiótico é “um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde”. Já os simbióticos combinam os dois, sendo definido como “uma mistura compreendendo microrganismos vivos e substrato(s) usado(s) seletivamente por microrganismos hospedeiros que confere benefício à saúde do hospedeiro” (47, 46).

Alterações ocorridas na microbiota intestinal que levam a disbiose promovem muitas funções fisiológicas associadas ao cancro, incluindo proliferação celular, angiogênese e apoptose (22).

Seja pela elevada presença de estirpes bacterianas patogênicas que produzem fatores de virulência (por exemplo toxinas e fatores genéticos) ou pela baixa presença de estirpes probióticas capazes de produzir compostos antitumorais no cólon (a exemplo o butirato e ácidos gordos de cadeia curta) a desregulação da microbiota intestinal está associada com a gênese dessa doença (37).

Interações da microbiota intestinal com o sistema imunológico e mecanismos subjacentes são fatores de proteção para o cancro gastrointestinal, pois nos locais da mucosa onde a microbiota reside, o desenvolvimento inicial das células da linhagem B ocorre sob a influência de sinais extracelulares da microbiota (48). Além disso, o microbiota também participa na diferenciação de células T *naive* em células Treg colônicas, com receptores de células T exclusivos nas suas superfícies (49, 22).

A resposta imune antitumoral produzida pela microbiota intestinal pode funcionar por 3 mecanismos: (1) por indução das respostas das células T, (2) pelo envolvimento de um receptor de reconhecimento padrão com efeito pró-inflamatório em células anormais e (3) pela mediação de metabolitos específicos, que podem ativar receptores de células T (50, 22). Logo, a modulação intestinal com uso de probióticos pode-se correlacionar com efeito protetor para o cancro.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito de um probiótico de uso terapêutico e a sua atividade antitumoral em células de tumor intestinal sob duas condições de adiposidade.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento**

Neste trabalho foi utilizado um *cocktail* de probiótico comercial constituído por 4 estirpes bacterianas, 2 estirpes de bifidobactérias (*B. animalis* subsp. *lactis* CUL34 e *B. bifidum* CUL20) e 2 estirpes de lactobacilos (*L. acidophilus* CUL60 e *L. acidophilus* CUL21). As características e funções de cada uma encontra-se apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Característica das bactérias presentes no cocktail probiótico

Nome	Característica	Função	Referência
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CUL34	É um microrganismo anaeróbio de morfologia bífida  Temperatura ideal entre 37 à 41°C  pH ótimo entre 6,5 e 7	1 - Regula microbiota intestinal (correlação Firmicutes/Bacteroidetes)  2 - Aumenta produção de AGCC, que consequentemente produz efeito anti-inflamatório  3 - Melhora os mecanismos de barreira intestinal	51,52
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60	É um bacilo circular, gram-positivo, imóvel e não-esporulante  Suporta ambiente mais ácido. Está presente no trato urinário.  É termo-resistente (40 a 52°C)	1 - Reduz níveis de leptina  2 - Melhora perfil de glicose (Redução percentual da HbA1C) 3 - Promove diminuição do peso corporal e percentual de gordura  4 - Reduz atividade da lipase, podendo reduzir também liberação de amilase pancreática	53,54,55
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL21	Condições de crescimento semelhantes a <i>L. Acidophilus</i> CUL60	1 - Bactéria ácido-lática fermentadora de lactose.  2 - Estimula resposta imune intestinal e regula os níveis de colesterol no organismo	56
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL20	É uma bactéria ácido-lática  A colonização acontece na primeira infância, sendo mais expressiva de bebês amamentados com leite materno comparativamente às fórmulas infantis	1 - Redução do colesterol, TG, colesterol não-HDL e glicemia  2 - Quebra de oligossacarídeos derivados de mucinas, com aumento da camada de muco na mucosa intestinal, fortalecendo assim, a função de barreira epitelial. 3 - Expressa a enzima Beta-glucosidade	57

### Crescimento bacteriano

Inicialmente, as bactérias do *cocktail* foram inoculadas em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB M011-100G HIMEDIA™) e incubadas a 39°C durante 72 horas.

Seguidamente, foi realizada a suspensão de inóculos do meio líquido em meios sólidos diferenciais, seletivos ou cromogênicos, incluindo o Solid Media Agar MacConkey, Manitol Salt

Agar (MSA), Agar cistina lactose eletrólito deficiente (CLED). Os objetivos de cada meio de cultura estão abaixo descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Objetivos dos meios de cultura bacterianos utilizados para crescimento e diferenciação das estirpes presentes no probiótico.

Meios de cultura	Classificação	Objetivos
Solid Media Agar MacConkey	Seletivo	Promover crescimento de bactérias gram negativas. Indica fermentação por lactose e contém sais biliares.
Manitol Salt Agar (MSA)	Seletivo	Promover crescimento não exclusivo de bactérias gram positivas. Utilizado para isolar <i>Staphylococcus aureus</i> .
Agar cistina lactose eletrólito deficiente (CLED)	Diferencial e cromogénio	Meio diferencial para crescimento de bactérias que degradam lactose (que expressam a enzima $\beta$ -galactosidade).

### 2.1.1 Caracterização das estirpes por Sequenciação de Sanger

Foi realizada a extração de DNA a partir do *cocktail* de probióticos ressuspendido em meio líquido de cultura basal para linhas celulares, o Meio Essencial Mínimo (MEM A4192202 BenchStable™). A extração do DNA foi realizada por processo térmico, tendo sido transferidos 2 $\mu$ L do conteúdo bacteriano em MEM para *ependorfs* de 2mL contendo 50 $\mu$ L de água ultrapura. Para preparação das amostras foi inicialmente realizado o procedimento a seguir:

- As amostras foram então colocadas em banho maria a 100°C durante 10 minutos. Passado esse período, o conteúdo da desnaturação térmica foi submetido a uma centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto, tendo sido recolhido o sobrenadante e o pellet descartado.

A concentração do DNA foi obtida em ng/ $\mu$ L recorrendo ao Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers. A pureza da amostra foi avaliada através dos rácios 260/280 (~1,8 para DNA puro) e 260/230 (entre 1,8 e 2,2 para DNA puro).

### Primers:

A amplificação de regiões específicas (Lac1 – *Lactobacillus ssp*) e regiões conservadas do gene 16S rDNA (16S – Bactéria total), foi realizada por PCR. Os primers utilizados encontram-se sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4: Conjunto de sequência dos primers para a sequenciação Sanger

Espécie-alvo	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (3'-5')	Tamanho(bp)	Ta (°C)
<i>Lactobacillus ssp</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	CATTYCACCGCTACACATG	346	60
Bactéria total	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	169	60

Para amplificação dos fragmentos dos genes Lac1 e 16S foi utilizado o kit MyTaq™ DNA Polymerase (meridian Bioscience, Portugal) seguiu-se o procedimento de acordo com as indicações do fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador MyCycler™ Thermal Cycler System (BioRad). E ocorreu sob as seguintes condições:

Tabela 5: Condições de amplificação no termociclador

Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	1 min
	95	00:05
45	60	00:20
	72	00:30
1	72	5 min
1	4	∞

Posteriormente, foi realizado um gel de agarose 1,5%, para confirmar amplificação contendo um marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). As amostras foram guardadas a -20°C até serem enviadas para sequenciação em laboratório parceiro.

### **2.1.2 Produção de sobrenadante bacteriano**

Para obtenção do sobrenadante bacteriano, o cocktail foi inicialmente colocado a crescer em meio líquido TSB num falcon de 15mL contendo 13mL de meio + 2mL de conteúdo bacteriano e incubada a 39°C durante 48 horas. Optou-se por encher o falcon completamente para reduzir

oferta de oxigênio, e assim aproximar à condição de anaerobiose, uma vez que, apesar das estirpes bacterianas presentes no cocktail serem anaeróbias facultativas, experimentações prévias demonstraram melhor rendimento quando expostas a ambientes de baixa oferta de oxigênio.

Seguidamente, foi então necessário realizar ressuspensão do *cocktail* probiótico em meio MEM (de origem animal e específico para as linhas celulares), com atenção ao facto de preparar a ressuspensão em meio sem adição de antibiótico ou soro.

A ressuspensão ocorreu após ser recolhido 2mL do inóculo crescido em TSB e adicionado a um novo tubo contendo 13mL de meio MEM. Este inóculo foi colocado a crescer nas mesmas condições de incubação durante 24 horas.

Passado esse período, o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante filtrado para obtenção do extrato estéril, o pellet foi descartado. O procedimento está descrito na Figura 7.

## Ressuspensão de probióticos em Meio Basal Caco2

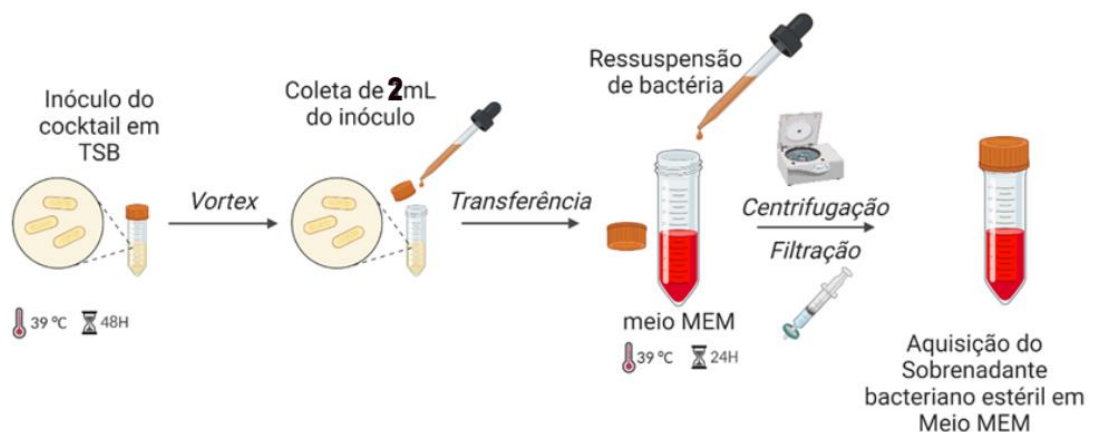


Figura 7: Para obtenção do sobrenadante bacteriano ressuscitado em meio basal para cultura celular (MEM), primeiramente foi necessário colocar as bactérias do cocktail a crescer em meio de cultura próprio para estirpes bacterianas, o Tryptic Soy Broth (TSB) durante 48 horas, a 39°C. Posteriormente o conteúdo foi vortexado e recolhido 2mL para ser resuscitado em meio MEM. Passado esse período, o conteúdo foi então centrifugado a 4.000 rpm durante 10 minutos para separar a parte bacteriana do extrato contendo produtos libertados pelas bactérias. O sobrenadante foi filtrado em filtro estéril de 0,2µm e consecutivamente armazenado em arca de -80°C para ser utilizado em ensaios futuros

### 2.3 Linhas celulares

Três linhas celulares foram utilizadas neste estudo – Caco2 (adenocarcinoma de colón em humanos), 3T3-L1 (pré-adipócitos de ratinhos) e Raw264.7 (macrófagos de ratinhos).

A linha celular Caco2 foi obtida e cultivada em meio MEM contendo 15% de soro fetal bovino (FBS), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL). As células foram sempre mantidas em atmosfera húmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após cultivo de células, seguiu-se com a realização de ensaios de citotoxicidade, migração e antioxidante.

### **2.3.1 Recolha do secretoma de uma co-cultura de adipócitos maduros e RAW 264.7**

A linha celular de pré-adipócitos de ratinhos, 3T3-L1, foi mantida em meio de cultura DMEM com 4,5g/dL de glicose e L-glutamina e suplementado com 10% de soro de bovino recém nascido (NCBS), 1% de penicilina/estreptomicina e 1,5g/L de bicarbonato de sódio a 37°C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A linha celular permaneceu em cultura até atingir confluência  $\geq 75\%$ .

Na presença de um *cocktail* hormonal consistido de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona (DEX) e insulina (INS), os pré-adipócitos 3T3-L1 iniciaram a diferenciação em células adipocitárias adultas, expressando fatores específicos de adipócitos, acumulando gotículas lipídicas ricas em triacilgliceróis e aumentando a secreção de várias adipocinas (58).

Neste trabalho, para o processo de diferenciação foram utilizados 3 meios de diferenciação (Meio de diferenciação I – MD I; Meio de diferenciação II – MD II; Meio de diferenciação III – MD III), e ao fim do último dia foram adicionados macrófagos da linha Raw264.7 que estavam a ser cultivados em DMEM (Figura 8).

Resumidamente, após atingir a confluência (dia 0), foi adicionado o MD I, que continha 0.25 $\mu$ M de IBMX, 2  $\mu$ M de insulina e 1  $\mu$ M de DEX suplementado com 10% de NCBS e 1% do antibiótico. Passados cinco dias (dia 5) em contacto com MDI, este foi substituído para MD II, que continha DMEM suplementado com 10% de FBS e 2  $\mu$ M de insulina. Após mais cinco dias (dia 10), a cultura celular foi lavada duas vezes com solução salina tamponada de fosfato (PBS) e adicionado o MD III (um meio basal sem soro ou suplementação) por cinco dias.

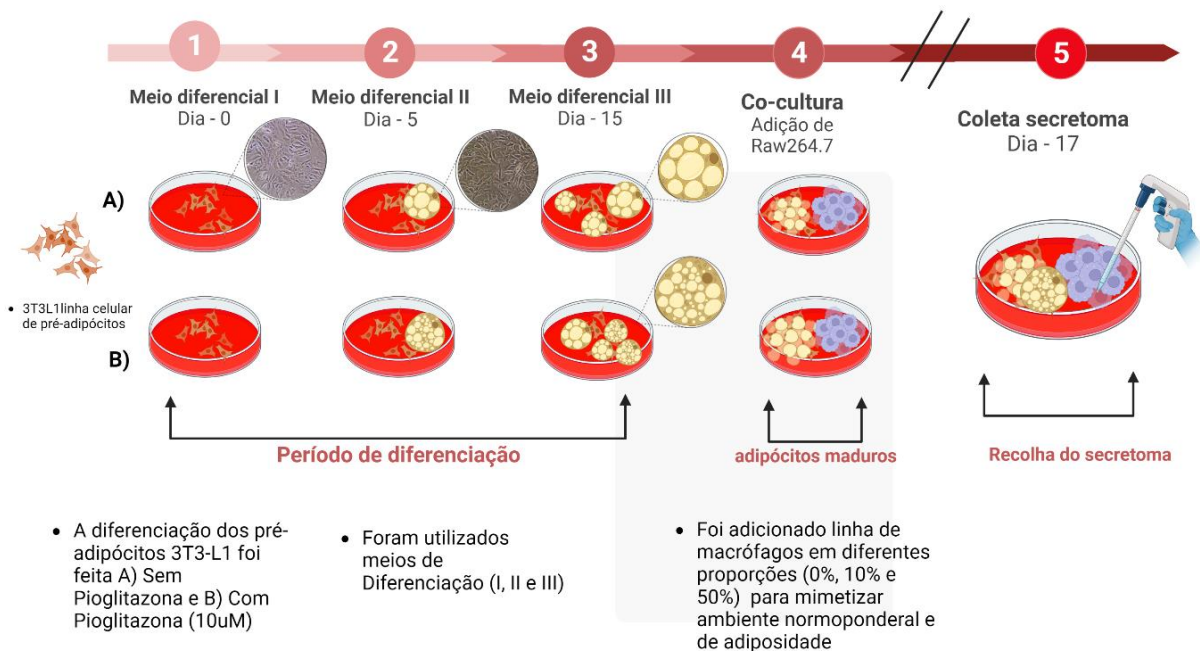


Figura 8: Procedimento para produção do secretoma de diferenciação de adipócitos. Linha celular 3T3-L1 de pré-adipócitos de ratinhos foram diferenciadas com recurso a três meios de diferenciação durante 15 dias. Foram divididas em dois ramos de diferenciação: i) Sem Pioglitazona e ii) Com Pioglitazona (medicação antidiabética agonista de PPAR $\gamma$ ). No fim do processo de diferenciação para adipócitos maduros (dia 15) foi adicionada a linha celular Raw264.7, macrófagos de ratinhos, em diferentes proporções após contagem nas placas (a 0% de macrófagos, 10% de macrófagos e 50% de macrófagos). A co-cultura de macrófagos esteve em contacto com os adipócitos maduros e não foram diferenciadas. Após 2 dias em co-cultura, o sobrenadante (secretoma) foram recolhidos e congelado em arca de  $-20^{\circ}\text{C}$  para ensaios subsequentes

Para otimizar a diferenciação foram utilizados  $10\ \mu\text{M}$  de Pioglitazona no MD I num dos ramos da diferenciação dos pré-adipócitos (Figura 8). A concentração escolhida diz respeito aos resultados encontrados em estudos anteriores do grupo que constataram que a acumulação de gotículas lipídicas a esta concentração de Pioglitazona atua estimulando a diferenciação de adipócitos pequenos, com maior sensibilidade à insulina e favorecendo a apoptose dos adipócitos maiores que libertam ácidos gordos livres (AGL) e secretam fatores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (59).

Findo o processo de diferenciação das 3T3-L1, ao dia 15, foi adicionado novo meio basal e acrescentada a linha celular Raw264.7 (macrófagos de ratinho). Uma vez que a quantidade de adipócitos e a percentagem de macrófagos em indivíduos com e sem obesidade são diferentes, 3 condições foram testadas para mimetização de adiposidade *in vitro*. Numa primeira condição não foram adicionados macrófagos (0% - condição controlo), numa segunda condição adicionou-se 10% de macrófagos (para mimetizar o tecido adiposo observado em condições saudáveis

metabolicamente) e na terceira condição foi adicionado 50% de macrófagos (para mimetizar o tecido adiposo em pessoas obesas com inflamação). Estudos anteriores apontam que um indivíduo obeso apresenta aproximadamente esta proporção de macrófagos (60).

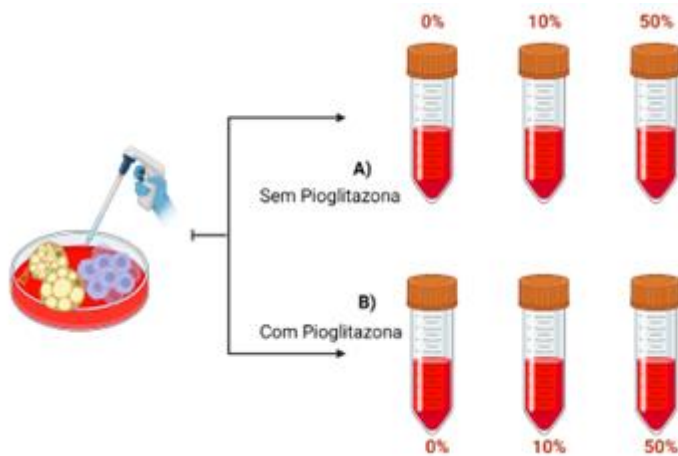


Figura 9: Ilustração dos conteúdos produzidos após diferenciação de adipócitos 3T3-L1. Seis condições de secretoma foram recolhidas. Destas, A) 3 condições em diferentes proporções de macrófagos sem Pioglitazona e B) 3 condições de diferentes proporções de macrófago com uso de Pioglitazona. As percentagens referem-se a: 0% de macrófago (condição controlo), 10% de macrófagos (para mimetizar o tecido adiposo normal) e na terceira condição foi adicionado 50% de macrófagos (para mimetizar condição de adiposidade com inflamação).

A co-cultura foi mantida por mais dois dias, e ao final destes (dia 17), o secretoma que esteve em contacto com as células (contendo moléculas libertadas pelas células em processo de diferenciação e os ácidos gordos livres) foi colhido e armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$  para ensaios posteriores.

### 2.3.2 Ensaio de citotoxicidade celular

#### Contagem de células

As células Caco2, na passagem 13, foram semeadas durante 10 dias em placas de cultura celular. Foram utilizadas para os ensaios após atingirem confluência mínima de 75%.

Para isso, o meio de cultivo foi removido da placa e acrescentou-se delicadamente PBS 0,01 M estéril para lavagem das células. Posteriormente, adicionou-se em cada placa 1 mL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher), sendo então incubada em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante aproximadamente 5 minutos para a desaderência das células. Posteriormente, a solução de Tripsina foi neutralizada com a adição 5 mL de meio MEM (A4192202 BenchStable™) + FBS.

As células foram ressuspensas gentilmente e 10 µL da suspensão total foi usada para contagem e verificação da viabilidade celular. Para isso, adicionou-se a este volume mais 10 µL de azul de bromofenol (Synth) e a mistura foi depositada gentilmente sob uma Câmara de Neubauer para contagem. A ressuspensão celular foi contada com uso de contador manual e seguidamente foram aplicadas fórmulas para calcular o volume da concentração final de interesse para os ensaios.

$$N^{\circ} \text{ de células (mL)} = N^{\circ} \text{ total de células contadas} / N^{\circ} \text{ de quadrantes contados} \times \text{diluição} \times 1 \times 10^4$$

Após a contagem das células, o volume final da concentração de interesse Caco2 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foi transferido para placa de 96 poços e colocadas em cultura até atingir 80% de confluência, num volume final de 100µL durante 24 horas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### Estudo da influência dos diferentes meios (I, II e III) na linha celular Caco2

Passadas as 24 horas em que as células de adenocarcinoma de cólon foram semeadas e aderidas ao fundo do poço, o meio de cultura MEM foi recolhido e suplementado 100µL dos diferentes tratamentos e mantidos por mais 24h de incubação para realização do ensaio de citotoxicidade. Foram testadas 3 condições, em que:

#### **I – Sobrenadantes de bactérias probióticas**

Durante 24 horas as células ficaram expostas ao tratamento com 100mL do sobrenadante do *cocktail* de probióticos que foi produzido e ressuspendido em meio MEM (procedimento descrito na Figura 7).

#### **II – Secretomas de diferenciação e 3T3L1**

Neste tratamento, as células Caco2 foram novamente contadas e utilizadas na concentração de interesse ( $1 \times 10^5$  células/mL). O volume final foi transferido para placa de 96 e passadas 24 horas de exposição ao meio de cultura MEM, as células foram suplementadas com o produto de diferenciação de adipócitos da linha celular 3T3-L1, o secretoma, num volume de 100µL. Utilizou-se os seis diferentes tratamentos, conforme ilustrado na Figura 8, em que um segmento de diferenciação foi nomeado sem Pioglitazona (SP) e outro segmento com Pioglitazona (CP). Os

secretomas contém ainda diferentes percentagens de macrófagos nos dois segmentos (0%, 10% e 50% conforme descrito na Figura 9).

### **III – Secretomas de diferenciação de 3T3–L1 seguido do sobrenadante probiótico**

O terceiro tratamento envolveu o ensaio de viabilidade celular com suplementação dos dois produtos mencionados anteriormente: a) sobrenadante do *cocktail* de probióticos ressuspendido em meio MEM e b) secretoma de adipócitos 3T3–L1 diferenciados.

O ensaio consistiu na suplementação dos dois tratamentos anteriormente descritos, em que: 1) primeiro foi adicionado o sobrenadante do *cocktail* probiótico durante 24 horas nas células da linha Caco2, seguido da recolha deste tratamento e consecutiva suplementação com o tratamento 2) que foi adicionado o secretoma da diferenciação de adipócitos (nas seis condições ilustradas na Figura 9) durante mais 24 horas nas mesmas células.

Após 24 horas de aplicação dos diferentes tratamentos (I, II e III), os sobrenadantes foram recolhidos e adicionados 100µL de solução MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio], que corresponde a 10% da solução em meio MEM.

O ensaio de citotoxicidade utiliza um reagente colorimétrico (Promega, Madison, EUA) e foi seguido conforme instruções do fabricante, sendo incubado a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante uma hora. Findo esse período, o reagente MTT foi recolhido e adicionado 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A solução com DMSO foi recolhida das células Caco2 e transferida para outra placa de 96 poços para leitura da absorbância entre 550 e 650nm, no leitor de microplacas com filtros Thermo Lab System Multiskan Ascent 354™.

Os resultados foram realizados em triplicados (n = 3) e normalizados para o controlo considerado 100%.

#### **2.3.3 Ensaio de migração celular**

O ensaio de lesão foi utilizado para quantificar os parâmetros de migração da célula, como velocidade e forma. Para isso as células Caco2 (5 x 10<sup>5</sup> células/poço) foram semeadas ao longo de duas semanas em meio MEM + 15% DE FBS. Foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o ensaio de lesão, as células foram contadas seguindo a fórmula previamente descrita para um volume final de 1mL/poço, adicionadas em placa de 6 poços e semeadas durante 24 horas até atingir confluência de aproximadamente 80%. Após esse período foi retirado o meio de crescimento e realizado um rasgo mecânico vertical. O local do rasgo foi lavado com tampão PBS

a 1%. Seguidamente, foram adicionados os tratamentos de interesse, nas condições II e III descritas para o ensaio de citotoxicidade: primeiro a) uso isoladamente do secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1 após 24 horas e b) o sobrenadante do *cocktail* bacteriano ressuspenso em meio de cultura MEM seguido do secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1 após mais 24 horas. Foram realizados registros fotográficos na hora 0, após 24h de adição de cada tratamento para observação da área de reintegração do fecho.

A taxa de migração foi calculada conforme reintegração do fecho, através da medição da largura do dano com uso de software Image J (U.S. National of Health, Bethesda, USA).

#### **2.3.4 Ensaio para determinar stresse oxidativo**

O ensaio de detecção da relação GSH/GSSG foi realizado com uso do kit de ensaio BioVision (Biovision Incorporated na abcam company), utilizando a detecção da relação GSH/GSSG em células de cancro de colorretal para determinar o stresse oxidativo. O protocolo foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, as células Caco2 ( $5 \times 10^4$  células/mL) foram semeadas em placa de 96 poços e colocadas a crescer até atingirem confluência com volume final de 100 $\mu$ L/poço.

Após o período de tratamento, as análises de GSH e GSH total foram feitas por diluição de lisados de células inteiras, bem como de diluições seriadas de padrões de GSH e GSSG. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 45 minutos numa reação fluorimétrica de uma etapa com um tampão de ensaio e fluoróforos apropriados. O ensaio utiliza um corante que reage com a glutatona, seja na forma oxidada ou reduzida, numa reação catalisada pela enzima glutatona S-transferase. A intensidade da fluorescência foi medida usando um leitor Excitação/Emissão (EX/EM) de 490/520nm após clivagem. GSH e GSH total foram determinados usando a curva padrão, já GSSG foi determinado através da fórmula = (GSH total – GSH) /2.

#### **2.3.5 Avaliação da expressão de mRNA de fatores inflamatórios por RT-qPCR**

##### **Extração de RNA e medição da purificação**

O RNA total foi extraído a partir de homogeneizados da linha celular Caco2 ( $5 \times 10^5$  células/mL) cultivadas em placas de 6 poços até atingirem confluência. Para isso, o reagente TRIZOL foi utilizado para lise celular, seguido de limpeza e tratamento com o clorofórmio e precipitado em isopropanol.

O sedimento (*pellet*) de RNA foi então lavado com etanol 75% e dissolvido sequencialmente em DEPC tratado com H<sub>2</sub>O. A pureza/qualidade do RNA foi medida no espectrofotômetro de microplacas nanodrop. A relação OD 260/280 foi medida para verificar a integridade do RNA, ou seja, existência ou não de contaminação por DNA, e a relação OD 260/230 utilizada para verificar a contaminação por proteínas.

### **Amplificação de RNA**

Um total de 250ng/μL de RNA foi inicialmente transcrito reversamente a DNA complementar (cDNA) com um kit cDNA de alta capacidade. O kit de PCR multiplex Master Mix –Meridian em tempo real foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

### **Primers e sondas utilizados**

Foram utilizados *primers* de ensaio para avaliar a expressão de marcadores inflamatórios após os tratamentos em que as células Caco2 foram expostas (Tabela 6).

Tabela 6: Conjunto de sequência dos primers para o RT-qPCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
IL1-β	ACCTAGCTGTCAACGTGTGG	TCAAAGCAATGTGCTGGTGC
IL-6	TGTGTGAAAGCAGCAAAGAGG	TTTTCACCAGGCAAGTCTCC
IL-10	TGAAAACAAGAGCAAGGCCG	ATAGAGTCGCCACCCTGATG
TLR2	AAGATAATGAACACCAAGACC	TCTCAGATTTACCCAAAA

O PCR foi realizado em equipamento Quant Gene 9600™, nas condições de termociclador presentes na Tabela 7.

Tabela 7: Condições de amplificação no termociclador do RT-qPCR

Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	02:00
40	95	00:05
	60	00:20
1	4	∞

O gene controlo de expressão 18S foi escolhido para normalização dos resultados. Os dados log-normalizados e classificados foram então utilizados no Minitab usando o teste ANOVA de 2 amostras.

## **2.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada comparando os resultados do grupo controlo com os dos diferentes grupos, com análise unidirecional de variância (ANOVA) por comparações múltiplas e teste de Dunnet, utilizando o software Graphpad Prism 8.0.1 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foi selecionado, e um nível de significância de  $p < 0,05$  será aplicado a todas as análises estatísticas.

## **3. Resultados**

A primeira etapa do trabalho foi colocar em cultura o *cocktail* probiótico, tendo sido utilizados diferentes meios sólidos seletivos, diferenciais e cromogénicos com o objetivo caracterizar as estirpes presentes na cultura. Foi realizada sequenciação de de genes bacterianos 16S e Lac1, amplificados a partir do DNA extraído na cultura líquida ressuspensa em MEM que deu origem ao sobrenadante.

### **3.1. Crescimento bacteriano**

Dentre os meios sólidos avaliados, as bactérias do *cocktail* probiótico cresceram apenas em meio MSA (meio seletivo gram-positivo) em comparação com o Agar MacConkey (meio seletivo gram-negativo). A coloração foi alterada de rosa para amarelo em MSA, já a cor castanho escuro em MacConkey foi preservada (Figura 10), indicando o não crescimento de estirpes bacterianas gram-negativa.

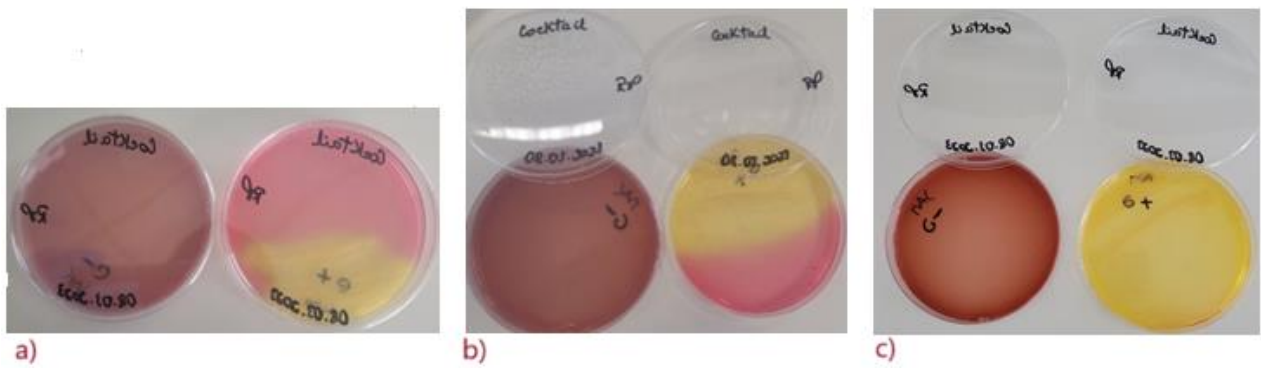


Figura 10: Coloração de gram: o meio Agar Mackonkey (castanho escuro nas três imagens) não foi observado crescimento bacteriano. Já no meio de cultura Salt Agar houve crescimento de bactérias do cocktail com alteração da coloração do meio (de rosa para amarelo) a) plaqueamento após 8 horas; b) plaqueamento após 24 horas e c) plaqueamento após 48 horas.

Para o meio CLED houve mudança de cor azul (indicador de pH azul de bromotimol) para amarelo, que supõe a degradação da lactose do meio, suspeitando-se do crescimento de estirpe bacteriana que expressa  $\beta$ -galactosidade na sua composição. Com este resultado, hipotetizamos a presença de *L. acidophilus*, pois a  $\beta$ -galactosidade é uma enzima expressa nesta estirpe (Figura 11). à luz destes testes preliminares, seguiu-se com a sequenciação da suspensão para confirmar subsequente presença de *L. acidophilus* e descartar presença de outros agentes/estirpes na amostra testada.

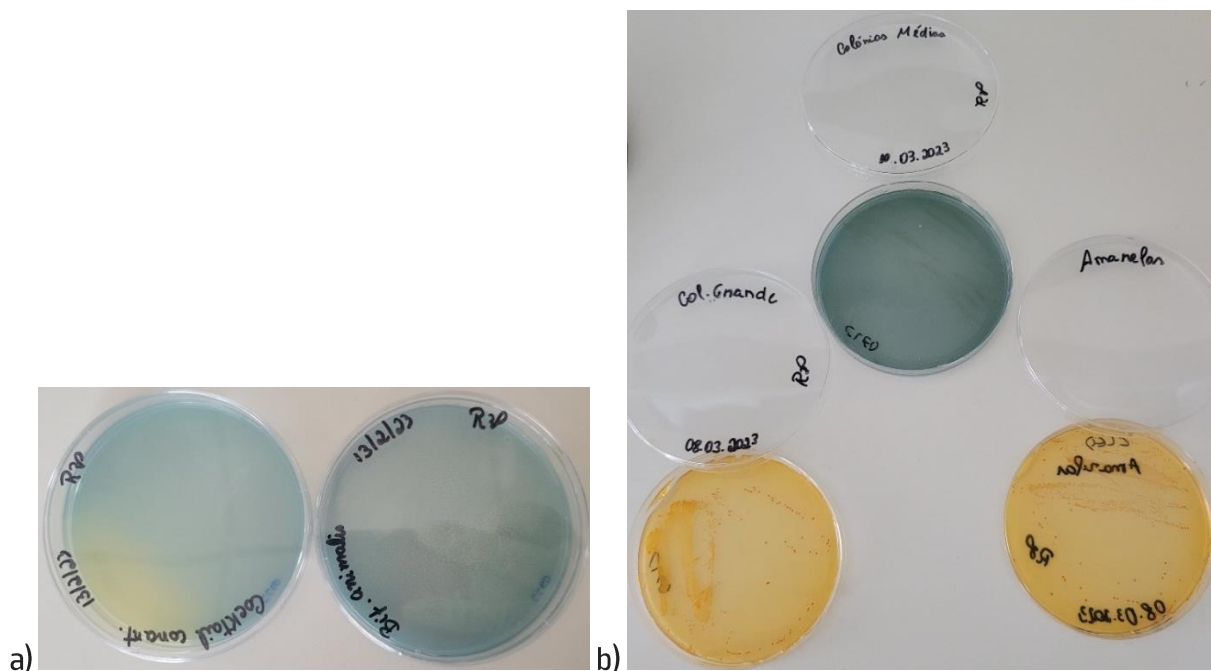


Figura 11: Meio Agar Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED): o meio possibilitou crescimento de *Lactobacillus acidophilus* presentes no cocktail. Este é um meio de cultura de cor original azul ou verde (figura 11a), que passa a amarelo quando há crescimento de estirpes bacterianas responsáveis pela degradação de lactose (figura 11b).

Já em meios líquidos, a inoculação de bactérias foi realizada inicialmente em TSB, seguido de resuspensão em meio MEM. A análise por sequenciação SANGER do meio líquido escolhido foi realizada em meio MEM.

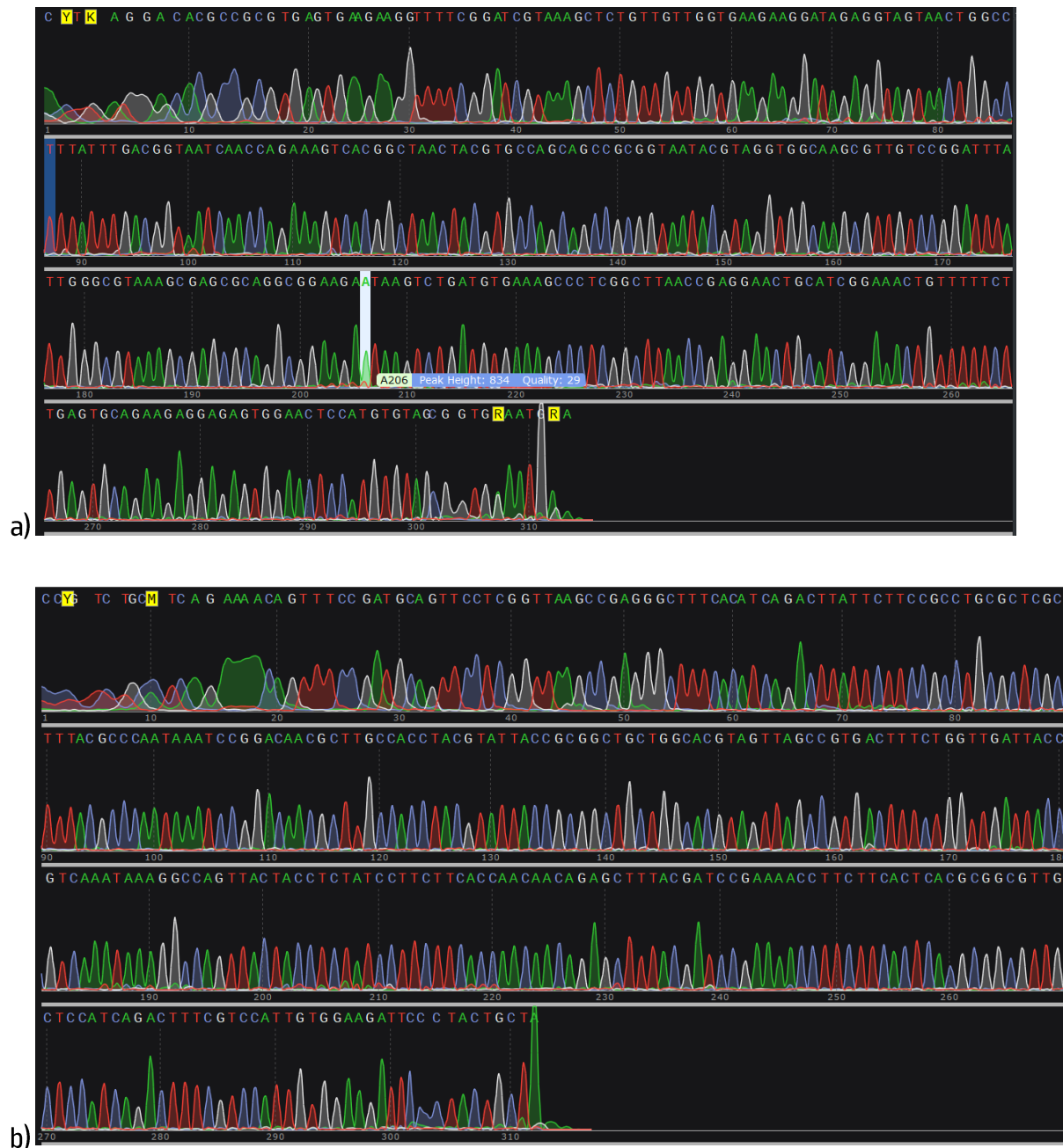


Figura 12 Imagem sequenciamento Sanger para o gene *Lac1* (zonas específicas e conservadas), em a) sentido foward [5´-3´] e b) sentido reverse [3´-5´].

A análise do sequenciamento SANGER demonstrou a presença da estirpe bacteriana de *Lactobacillus* na amostra em zonas conservadas e específicas, foi constatado 100% de correspondência com *Lactobacillus acidophilus* (Figura 12). Contudo, não foi constatada presença do género bífidos na detecção da bactéria total com uso do gene 16S; o resultado apresentou semelhança em algumas zonas conservadas, mas a qualidade de determinados bp com baixa resolução impediram a confirmação de bifidobactérias (Figura 13).



Figura 13: Imagem do sequenciamento Sanger para o gene 16S (bactéria total), em que: a) forward [sentido 5´-3´] e b) reverse [sentido 3´-5´]. No resultado observa-se acentuada sobreposição de pares de bases numa mesma posição.

### 3.2 Adiposidade aumenta a viabilidade de tumor de cólon *in vitro*

Para perceber o efeito das condições de adiposidade mimetizadas *in vitro* pela diferenciação de adipócitos 3T3-L1, foram testadas as 6 condições de secretoma produzidas, com Pioglitazona ou sem Pioglitazona, e nas diferentes proporções de Raw, na linha celular Caco2. O objetivo foi estudar o efeito isoladamente dos produtos secretados por adipócitos na viabilidade de Caco2, sem a interferência do sobrenadante do *cocktail* de bactérias probióticas.

Os resultados, apresentados na Figura 14, demonstraram que em todas as condições houve aumento da viabilidade da linha tumoral Caco2 quando expostas as condições que mimetizam adiposidade. Entre elas, duas condições, nomeadamente sem Pioglitazona e com 10 e 50% de

Raw, apresentaram significância estatística a  $p < 0.001$  com aumento de 75% e 73%, respectivamente. As condições sem Pioglitazona e com 10% Raw e com Pioglitazona a 10% e 50% de Raw apresentaram significância estatística semelhantes a  $p < 0.01$ , onde aumentaram em 66%, 61% e 59% respectivamente. Já a condição com Pioglitazona e sem Raw apresentou significância de  $p < 0.05$  com aumento de 50% da viabilidade.

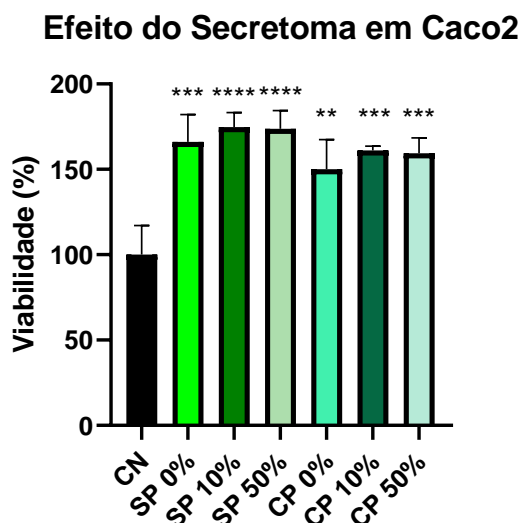


Figura 14: Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT em Caco2 suplementadas com secretoma de diferenciação de 3T3-L1. SP: Sem Pioglitazona; CP: com Pioglitazona. As diferentes proporções de macrófagos estão representadas pelas respectivas percentagens (0% de macrófago (condição controle), 10% de macrófagos (para mimetizar o tecido adiposo normal) e na terceira condição foi adicionado 50% de macrófagos).

Estes resultados demonstram que a adiposidade sozinha é capaz de aumentar a viabilidade de adenocarcinoma de cólon. Contudo, as condições com Pioglitazona parecem atenuar discretamente esse efeito.

### 3.3 Probióticos não reduzem os efeitos da adiposidade

Para avaliar de que forma o probiótico poderia interferir na progressão tumoral, foi utilizada a estratégia de primeiro expor às células ao sobrenadante de probiótico e, seguidamente, suplementar as mesmas células com secretoma da diferenciação de adipócitos.

Ao avaliar os resultados (Figura 15) constatou-se que a viabilidade das células de Caco2 foi aumentada, independentemente do uso de probióticos. A significância estatística, com  $p < 0.0001$ , foi observada em todas as condições testadas, seja sem Pioglitazona e com Pioglitazona. Em que se observa um aumento de viabilidade celular de 85%, 62% e 117% nas primeiras 3 condições de adiposidade sem Pio, e 94%, 74% e 76% nas condições com Pio, respectivamente.

## Efeito do tratamento probiótico seguido do secretoma em Caco2

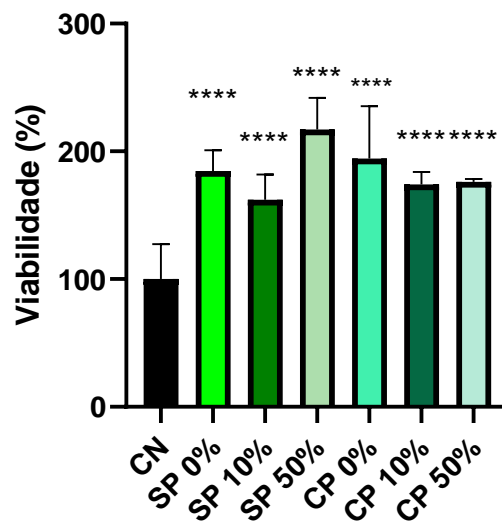


Figura 15: Viabilidade celular de linhas Caco2 suplementadas com sobrenadante de bactérias do cocktail probiótico e secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1 em condições com Pioglitazona (CP) e sem Pioglitazona (SP), com proporção de macrófagos Raw264.7 a 0%, 10% e 50%. Foi testada primeiramente a suplementação com o sobrenadante probiótico durante 24 horas seguido da suplementação com os secretomas da diferenciação de adipócitos por mais 24 horas \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Considerando estes resultados, seguimos os demais ensaios para perceber se o mesmo efeito da viabilidade se repetia na capacidade de invasão e antioxidante nesta linha celular.

### 3.4 Genes inflamatórios responsivos à terapia probiótica

Seguidamente, e tendo em vista os resultados obtidos para a viabilidade celular das células tumorais, foram avaliadas as expressões gênicas de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios para avaliar de que modo a suplementação prévia com probióticos poderia interferir na resposta inflamatória das células tumorais de cólon expostas à condições mimetizantes de obesidade.

Os resultados por PCR em tempo real (RT-PCR) para expressão de genes de resposta inflamatória fortemente correlacionados o tumor colorretal (Figura 16) mostrou que as condições que mimetizam maior adiposidade tanto aumentaram a resposta pró-inflamatória (pelo aumento de IL-6), como podem ser mais responsivas a terapia probiótica, exibindo resposta anti-inflamatória (pelo aumento de IL-10).

Para a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , embora não se tenha observada significância estatística, conseguiu-se observar uma tendência de diminuição de expressão gênica do 0% de Raw para

10% de Raw, seguido de um aumento da expressão para 50% de Raw, quer na condição com e sem Pioglitazona. Relativamente à citocina pró-inflamatória IL-6, a evidência clara, com significância estatística  $p < 0,0001$ , foi observada na condição com Pioglitazona com 50% de Raw, com um aumento na expressão génica de 566% face ao respetivo controlo.

Finalmente, para a citocina anti-inflamatória IL-10, na condição sem Pioglitazona, observou-se uma tendência de diminuição de expressão génica com o aumento da percentagem de Raw. Esta diminuição foi também observada na condição com Pioglitazona de 0% de Raw para 10% de Raw. No entanto, a 50% de Raw, esta tendência reverteu, observando-se um aumento de expressão génica. E, ao mesmo tempo, a expressão de IL-10 apresentou tendência de aumento na diferenciação sem Pioglitazona e sem Raw, e no segmento com Pioglitazona e 50% de Raw, observando aumento de 71% e 46%, respetivamente. Ambos os resultados não apresentaram significância estatística.

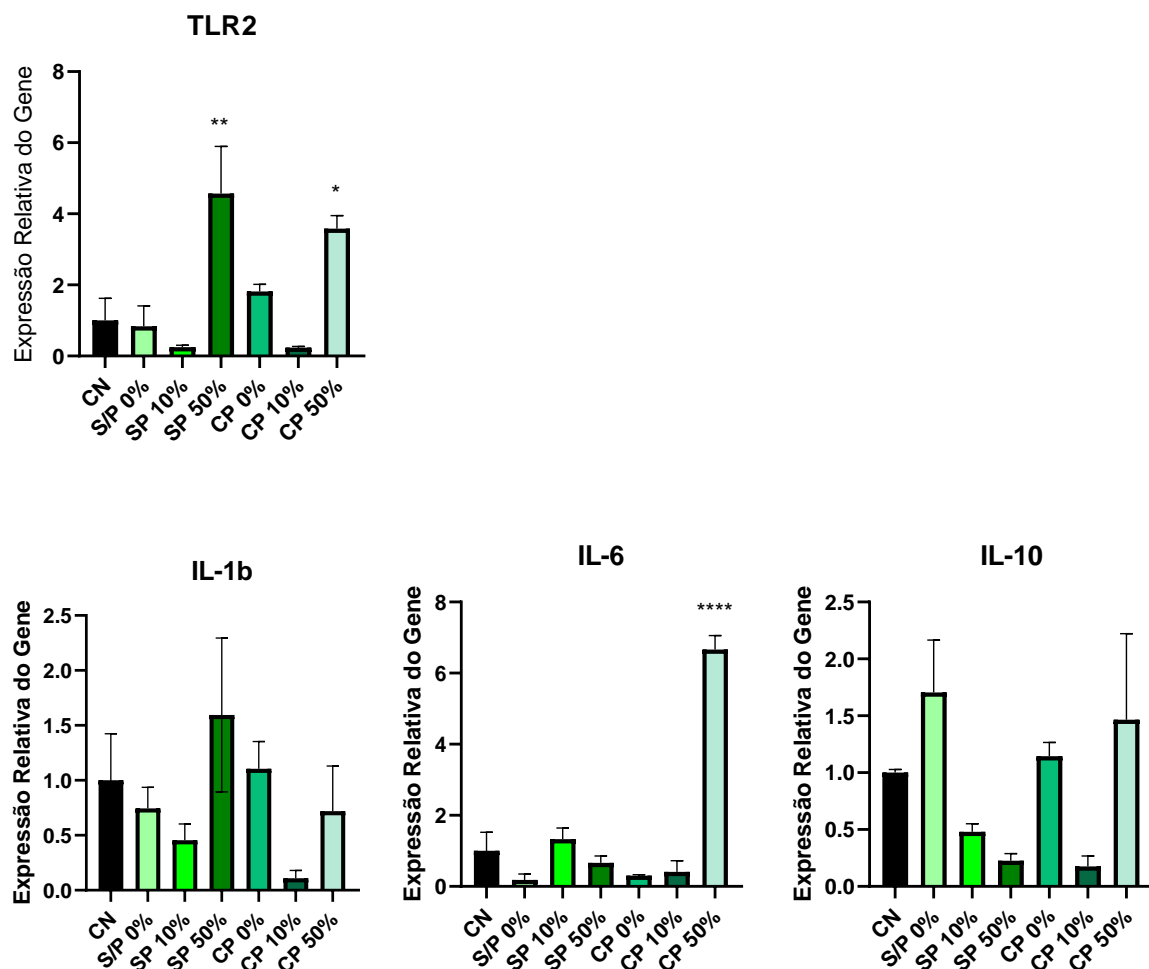


Figura 16: Expressão génica de interleucinas e receptores de membrana por RT-qPCR em células Caco2 suplementadas com sobrenadante de bactérias do cocktail probiótico, seguido de secretoma da diferenciação de

adipócitos 3T3L1 em condições com Pioglitazona (CP) e sem Pioglitazona (SP), com proporção de macrófagos Raw264.7 a 0%, 10% e 50%. Foram avaliadas as interleucinas IL-1b, IL-6 e IL-10. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Constatou-se ainda que a expressão de TLR2 (Toll like Recetor 2), foi estatisticamente significativo apenas em condições que mimetizam adiposidade (diferenciação com e sem Pioglitazona a 50% de macrófagos).

A utilização do sobrenadante de probióticos interfere na expressão génica das citocinas envolvidas com a cascata inflamatória, principalmente em condições que mimetizam adiposidade *in vitro*, ou seja, para a diferenciação com 50% de macrófagos. Em particular, para o TLR 2, a expressão génica sem Pioglitazona aumentou 357% e com Pioglitazona 258%, respetivamente, quando comparados ao controlo.

### 3.5 Atividade antioxidante e de migração

Para avaliar o efeito do probiótico na resposta antioxidante nas células de adenocarcinoma de cólon, foi avaliado o rácio entre a glutatona reduzida e oxidada. Concordando com os demais ensaios realizados, a avaliação deste ensaio seguiu inicialmente com a suplementação em células Caco2 com sobrenadante probiótico, seguido da exposição ao secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3-L1 com diferentes concentrações de macrófagos.

Os resultados obtidos (Figura 17) demonstraram que a suplementação com o probiótico, para qualquer condição estudada, aumentou a atividade antioxidante, com um aumento da glutatona reduzida ou diminuição da glutatona oxidada, comparativamente ao controlo.

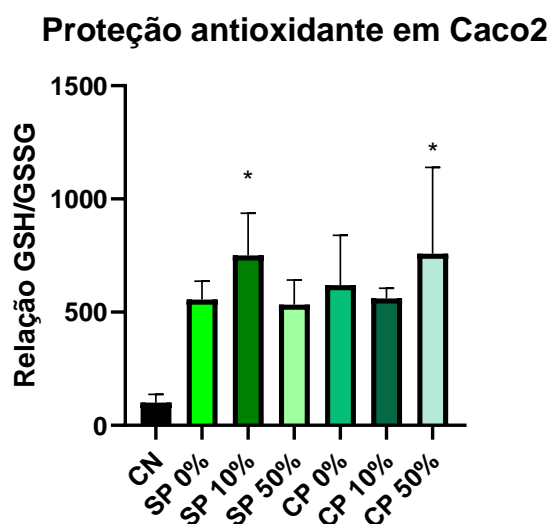


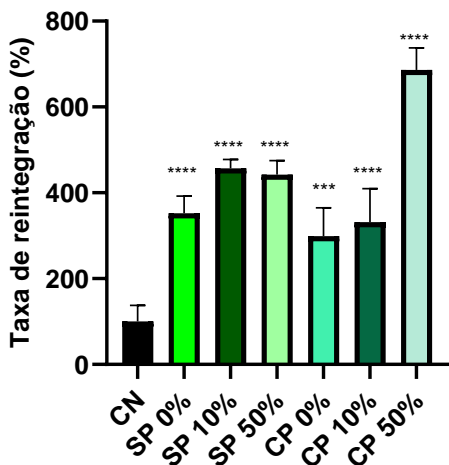
Figura 17: Stresse oxidativo em Linha celular Caco2. Os resultados são representados pela relação entre GSH/GSSG expressa nas células Caco2 suplementadas com sobrenadante de bactérias do cocktail probiótico, seguido de

secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1 em condições com Pioglitazona (CP) e sem Pioglitazona (SP), com proporção de macrófagos Raw264.7 a 0%, 10% e 50%. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

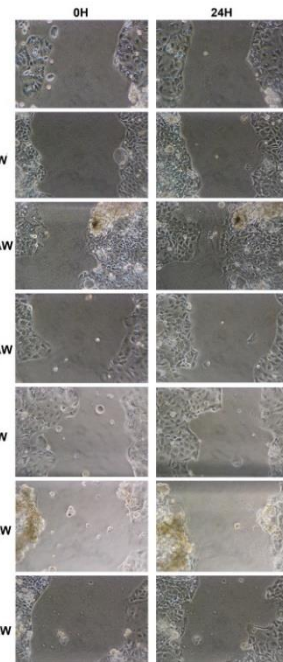
Em particular, para as condições sem Pioglitazona e com 10% de Raw, e com Pioglitazona e com 50% de Raw apresentaram significância estatística semelhante a  $p < 0.05$ , com aumento de 750% e 758%, respetivamente, em comparação ao controlo. Houve aumento nas demais condições estudadas, contudo sem significância estatística observada.

Este comportamento protetor presente no ensaio antioxidante repetiu-se no ensaio de lesão, que tinha o objetivo de avaliar a capacidade de migração das células de adenocarcinoma de cólon. De modo geral, quanto maior a capacidade de migração celular, maior é a chance de metástase após suplementação com os tratamentos.

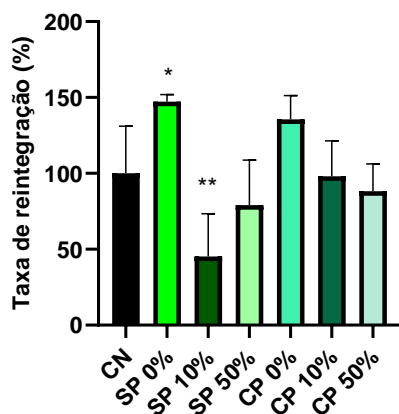
**Migração em Caco2**  
(suplementação com secretoma de 3T3-L1)



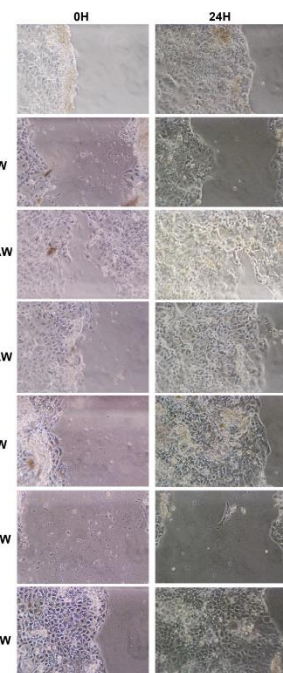
A)



**Migração em Caco2**  
(suplementação com probiótico seguido do secretoma)



B)



*Figura 18: Migração em Linha celular Caco2. Os resultados expressam a taxa de migração nas células Caco2 após realização de um rasgo mecânico, seguido da adição dos tratamentos em questão, onde A) Representação gráfica e fotográfica em que Caco2 foram suplementadas exclusivamente com o secretoma das 6 condições de adiposidade produzidas na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e B) Representação gráfica e fotográfica em que Caco2 foram suplementadas primeiro com sobrenadante de bactérias do cocktail probiótico ressuscitado em MEM, seguido de secretoma da diferenciação de adipócitos 3T3L1 em condições com Pioglitazona (CP) e sem Pioglitazona (SP), com proporção de macrófagos Raw264.7 a 0%, 10% e 50%. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .*

Com o resultado do teste de migração celular (Figura 18 – A) constatou-se que inicialmente as células tumorais Caco2 apresentaram aumento na capacidade de reintegração do fecho quando expostas às condições de adiposidade. Neste, todas as condições, apresentaram significância estatística, especialmente todas as três condições sem Pioglitazona e duas condições com Pioglitazona a 10% e 50% de Raw apresentaram significância estatística a  $p < 0,0001$  com aumento de 252%, 357%, 342%, 232% e 586%, respectivamente. Já última condição com Pioglitazona a 0% de Raw apresentou significância estatística semelhantes a  $p < 0,001$ , onde aumentou em 199% a taxa de reintegração do fecho.

Já no cenário em que os probióticos foram adicionados antepadamente à suplementação do secretoma da adiposidade (Figura 18 – B), o resultado demonstrou atenuação na capacidade de migração das células de adenocarcinoma de cólon. O uso de probiótico não diminui a taxa de reintegração do fecho, contudo, reduziu o efeito produzido pela adiposidade na progressão tumoral neste modelo celular. Em especial, chamou atenção para as condições sem Pioglitazona e com 10% de Raw, que reduziu a área de reintegração do fecho, apresentando significância estatística de  $p < 0,01$ , com diminuição de 55%; e para a condição sem Pioglitazona a 0% de Raw, que foi a que apresentou maior taxa de reintegração do fecho comparativamente ao controle e demais condições testadas, com estatística  $p < 0,05$  e aumento de 47%. Apesar das demais condições não apresentarem significância estatística, concordamos que a área de reintegração do fecho é inferior às condições apenas suplementadas com secretoma de adiposidade.

#### **4. Discussão**

Como mencionado anteriormente, o cancro colorretal (CCR) possui múltiplas origens, com destaque para os fatores de risco hereditário, idade, doenças inflamatórias, obesidade, dieta e disbiose intestinal (61,7). Dentre estes fatores, a regulação da microbiota intestinal pode prevenir o mau prognóstico do CCR (42, 31, 22).

O uso de probióticos tem vindo a ganhar relevo, pois pode promover efeito anti-tumoral em pacientes saudáveis e efeito protetor em pacientes com a doença já instalada (62). Segundo

autores, a utilização de probióticos promove alterações físico-químicas na microbiota intestinal, seja pelo aumento na produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) ou aumento de componentes antitumorais e antimutagénicos, que influenciam positivamente na modulação imunológica do trato gastrointestinal e na redução da inflamação da mucosa intestinal e sistémica (65, 64, 63).

Com estes resultados foi possível observar que a suplementação com sobrenadante de probióticos atenuou a progressão e agressividade do tumor de intestino, principalmente nas condições em que o contexto de adiposidade/obesidade foi posteriormente adicionado (Figura 18). Estes resultados apoiam o que está descrito na literatura, que indica que lípidos hospedeiros e citocinas libertados pelo tecido adiposo estarem associadas com o desenvolvimento de diversos tipos de cancro, inclusivamente o CCR (67, 66, 6, 4, 3).

E, apesar de não ser possível observar redução na viabilidade da linha celular Caco2 suplementadas com probióticos, não ignoramos a relação inversa existente entre o consumo de probióticos e seus benefícios em cancro de cólon. Hipotetizamos que a) pelo facto da cultura celular não mimetizar a complexidade do cancro do cólon, pode ter havido interferências e b) pode ser necessário mais tempo de tratamento e avaliações futuras do efeito da co-cultura de diferentes estirpes que constituem o probiótico.

#### **4.1 Meio de crescimento ideal para bactérias probióticas**

Nesse estudo, houve dificuldade em promover condições consideradas ideais pela literatura para possibilitar o crescimento das bactérias probióticas em laboratório, como o sistema de incubação com uso da jarra de anaerobiose ou o sistema de bolsa GasPak por exemplo. As bactérias presentes no *cocktail* probiótico utilizado são anaeróbias facultativas e, apesar de haver capacidade para se desenvolverem, quer na presença ou ausência de oxigênio, apresentaram melhor crescimento em condições com baixa oferta de oxigênio. Dentro dos recursos disponíveis para execução deste trabalho, não conseguimos garantir condição livre de oxigênio, mas realizamos a mimetização do ambiente anaeróbio recorrendo a técnica física em que a repicagem da bactéria foi realizada no interior da atmosfera líquida do meio utilizado (TSB e MEM) e os frascos bem apertados e selados com parafilme.

O facto das bactérias probióticas apresentarem melhores condições de crescimento em ambientes com baixa oferta de oxigênio corrobora com o efeito dos probióticos *in vivo* no complexo ecossistema gastrointestinal. Os probióticos estão num ambiente fechado com baixa

oferta de oxigênio e envolvidos com a redução do pH do lúmen intestinal através da produção de ácidos orgânicos (ácidos acético, butírico, propiônico e láctico) que contribuem para manutenção de ambiente anaeróbio e para inibir o crescimento de agentes patogênicos (67).

A conservação e viabilidade das culturas probióticas intestinais são um desafio para os estudos laboratoriais e indústria alimentar, uma vez que as condições de sobrevivência das estirpes não são estáveis nem adversas como ocorre no trato gastrointestinal. As condições que afetam a viabilidade das culturas bacterianas livres incluem temperatura, oxidação e nível de oxigênio (68).

Há escassez de dados na literatura referentemente a qual o meio de cultura ideal para os probióticos, contudo, a incorporação de micronutrientes e sais minerais, como fruto-oligossacarídeo (FOS) e inulina, que são hidratos de carbono alimentares não-digeríveis e servirão como substratos das bactérias, parecem potencializar o crescimento e viabilidade dos probióticos (69). A indústria de alimentos costuma empregar o uso majoritariamente de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em alimentos funcionais e, em menor escala o *Enterococcus faecium*; estas estirpes estão mais abundantemente presentes no trato gastrointestinal do humano saudável e são fáceis de isolar das regiões do TGI íleo terminal e cólon (70).

Ainda assim, e de acordo com a literatura, é possível cultivar estas estirpes em condições aeróbias mediante tempo suficiente de incubação. Por causa da limitação de informações que confirmassem se as bactérias cresceram nos meios e condições referidas nesse estudo, foi essencial fazer uma caracterização por sequenciação e nossos resultados confirmaram que os lactobacilos parecem se adaptar melhor que bifidobactérias à metodologia proposta e foram conseguidos nos dois métodos testados – meio sólido com mudança de cor pela expressão da enzima que degrada lactose e no meio líquido ressuspendido em MEM confirmado por sequenciamento – conforme apresentado no resultado 3.1.

A  $\beta$ -galactosidade é uma enzima que tem a finalidade de hidrolisar a lactose, um dissacarídeo, a partir da clivagem da ligação  $\alpha$ 1-6, promovendo libertação de duas moléculas: glicose e galactose (71). A enzima é proveniente de diversas fontes, entre elas é expressa por bactérias probióticas e além da degradação de lactose, permitem ainda a síntese de galato-oligossacarídeos (GOS) funcionalmente ativos na microbiota intestinal (71).

## **4.2 Bactérias probióticas melhoram a resposta imune**

Estirpes bacterianas que atuam na degradação de moléculas lipídicas poderiam interromper os condicionantes do microambiente tumoral, podendo caracterizar-se então como alternativa coadjuvante no tratamento ou prevenção do cancro.

A composição saudável da microbiota intestinal desempenha um importante papel na imunidade inata e adaptativa gastrointestinal. E, em contexto oncológico, funciona como mecanismo de proteção à agressividade do tumor e atividade anti-tumoral (22). Em situações de desequilíbrio da microbiota, como em contexto de acentuada adiposidade, desenvolver-se-á a disbiose intestinal, que prejudica a bioatividade intestinal e aumenta a abundância de espécies indutoras (bactérias patogénicas) que podem causar doenças inflamatórias intestinais e cancro (72).

Por outro lado, determinadas estirpes de bactérias probióticas são capazes de produzir butirato e lactato, que são dois metabolitos derivados da produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) importantes para a proteção metabólica contra o cancro (73).

O AGCCs são ácidos fermentados produzidos por bactérias gram-positivas da microbiota intestinal e são considerados metabolitos microbioanos-derivados capazes de melhorar imunidade de barreira intestinal, produção de moléculas de adesão, prevenindo contra invasores e reduzindo a inflamação intestinal do hospedeiro (74). Os efeitos positivos que foram observados dos AGCC devem-se pela ativação de recetores acoplados à proteína G (GPCR), a exemplo do GPR109a ou pela supressão de histonas/ histonas desacetilases (HDACs) que influenciam na expressão genética e regulação de células imunes (22). AGCC são reguladores essenciais do recrutamento, ativação e diferenciação de células imunes, como células dendríticas (CD), neutrófilos, macrófagos e linfócitos; além de regular a expressão de i) citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IL-6 e ii) citocinas anti-inflamatórias, a exemplo da ligação entre AGCC e o GPR109a associado a CD, que resulta no aumento da expressão de IL-10 e redução de IL-6 (75). A consequência é o aumento de células T-reg que inibem a expansão de células Th17, indicando papel vital em vias anti-inflamatórias, como na apoptose, especialmente em cancro colorretal induzido por inflamação (76, 75, 22).

Foi encontrado neste estudo a associação ainda entre o recetores intestinais, exemplo do TLR, e a resposta imune anti-inflamatória. O aumento na regulação de TLRs pode proteger as células intestinais contra a ativação do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B e o JAK/STAT3, sendo ambos críticos para proliferação e malignidade do tumor (77).

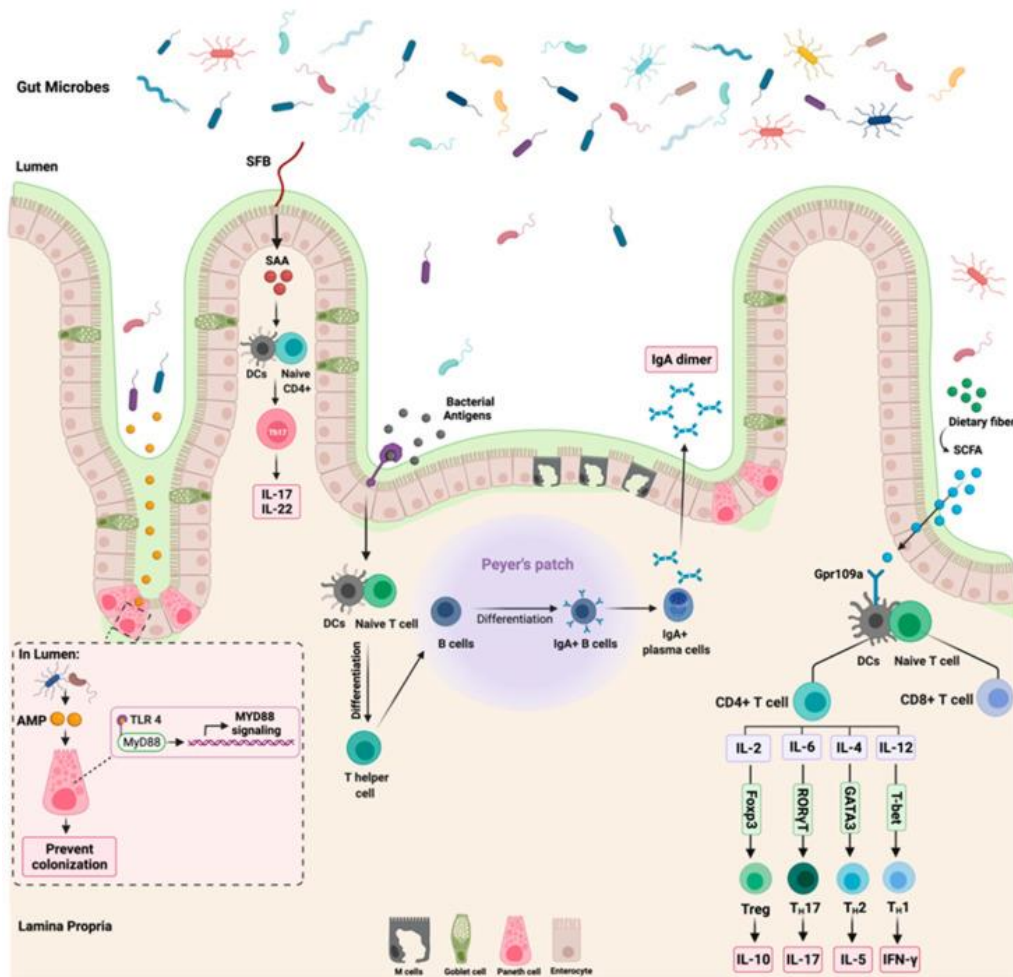


Figura 19: Influência da microbiota intestinal na imunidade. A seção esquerda da figura ilustra a influência de bactérias filamentosas segmentadas (SFB) e peptídeos antimicrobianos (AMP) no sistema imunológico do hospedeiro através da ativação da sinalização Th17 e MyD88, respectivamente. A seção da direita da figura destaca o papel das fibras alimentares na produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) na expressão das células T. Já o papel de antígenos microbianos na produção de dímeros IgA é mostrada na seção média da figura. (Adaptado de Al-Ishaq, 2022) (22)

O grande conjunto de receptores da família TRLs desempenha importante papel na resposta de barreira física e imunidade inata. Após exposição a infecção ou produtos inflamatórios, os TLRs reconhecem os produtos bacterianos sintetizados e ativam proteína adaptadora citoplasmática MyD88, que ativado é essencial na proteção nas células epiteliais e desempenham papel na regulação anti-inflamatória (78). Além do MyD88, os TLRs são também responsáveis pela secreção de imunoglobulina A (IgA), pois após detecção de antígenos bacterianos, levam a diferenciação de células T e conseqüentemente, produção de dímeros de IgA que diferenciam entre bactérias patogênicas ou comensais, capaz de atuar como moderador da resposta imunológica pró ou anti-inflamatória (22).

Dentre os TLRs de interesse, o TLR2 é um tipo de recetor de membrana ativado por peptídeoglicanas de bactérias Gram-positivas, a exemplo de bactérias probióticas utilizadas neste estudo, desempenhando importantes funções protetoras. Adicionalmente, o TLR10 está envolvido com o mecanismo de proteção da tumorigénese, por atuar como fator de transcrição com efeito em vias de sinalização anti-inflamatórias.

Além disso, outra função imunomoduladora produzido por bactérias decorre a partir da secreção de metabolitos responsáveis por efeitos sistémicos em cicatrização. Já foi descrito o papel da utilização de micróbios intestinais saudáveis funcionando como vacinas vivas capazes de prevenir a progressão do cancro. Essas bactérias saudáveis, quando tomadas em quantidade suficiente beneficiam o hospedeiro e desencadeiam respostas imuno-adjuvantes de combate ao cancro colorretal, através da ativação de citocinas e genes apoptóticos (79, 80).

#### **4.3 Expressão de genes inflamatórios associados ao CCR**

Os dados apontaram que a adiposidade é um fator de risco para tumor de cólon mesmo *in vitro*. A expressão de genes associados a inflamação e hipóxia foram mais presentes em condições com adição de 50% de macrófagos, conforme apresentado nos resultados.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel central na resposta imune, podendo ser ativada por várias sinalizações, entre eles, a maturação por caspase-1 e desempenhar papel na revelação ou progressão tumoral (81, 82). O seu aumento de expressão pode indicar a ativação dos macrófagos e a presença de uma resposta inflamatória (82).

A IL-6 é uma citocina multifuncional envolvida em várias respostas imunes e inflamatórias. Quando a expressão está aumentada pode indicar um sinal de inflamação, stresse celular, infecção ou lesão tecidual. A elevada expressão de IL-6 individualmente foi relacionada com maiores taxas de metástase linfonodal e grau de diferenciação em pacientes com CCR (83).

A IL-6 tem forma de atuação ambígua no intestino, podendo atuar como citocina anti-inflamatória. Esta interleucina é produzida pelo contacto das bactérias probióticas não patogénicas com as células epiteliais do intestino após internalização e interação com APCs, macrófagos e fagócitos. O aumento da produção de IL-6 provoca aumento da expressão de células B ativas produtoras de IgA na lâmina própria do intestino (79).

Neste estudo, a expressão de genes lipogénicos foi elevada no tecido tumoral colorretal sob influência de adiposidade em comparação com o controlo de normalidade. Em condições *in vivo*, a IL-6 está envolvida ainda com a diminuição na secreção de adiponectina (hormônio produzido

por adipócitos brancos não hipertróficos e tem a função anti-inflamatória) e aumento da inflamação.

Estudos observaram uma correlação negativa entre os níveis de adiponectina circulante e o risco de desenvolver certos tipos de câncer, como colorretal, mama, pancreático, fígado e próstata (84).

Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que regula e limita a resposta imune e inflamatória. O aumento da expressão de IL-10 pode indicar uma tentativa de controlar e mitigar a resposta inflamatória e promover a resolução do processo inflamatório.

#### **4.4 Probióticos podem proteger contra agressividade do adenocarcinoma de cólon em modelo *in vitro***

Os resultados com utilização de probiótico apresentaram atividade de proteção antioxidante tanto nas células de tumor colorretal expostas ao contexto adiposo em condições de normalidade, quanto em naqueles de elevada adiposidade e inflamação (Figura 17).

Os probióticos têm a capacidade de modular a o sistema imunológico localmente no intestino, ou de forma sistêmica, além de ter outros benefícios terapêuticos, como melhorar tolerância à lactose, reduzir inflamação e ter propriedades antioxidantes (79).

O desequilíbrio entre a produção de moléculas pró-oxidativas (espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN)) e a eficácia das defesas antioxidantes é um dos fatores associados ao CCR (73). O stresse oxidativo produzido pela microbiota intestinal disbiótica promove estimulação de inflamação crônica pela produção acentuada de ROS que induzem danos ao DNA, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, por exemplo (82, 73).

A glutathione é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular que desempenha papel crítico na defesa contra stress oxidativo e nitrosativo em células de mamíferos. Níveis reduzidos de glutathione foram identificados em estágios iniciais de apoptose e a identificação desses valores por ensaios simples *in vitro* permitem detectar alterações na glutathione total em apoptose e em outras amostras (85).

A inflamação caracteriza fator importante de risco para tumores, principalmente sólidos (82). Quando a inflamação é produzida mesmo localmente, leva a desdobramentos em órgãos sistêmicos e aumentam a malignidade do tumor. Já os metabólitos secretados por probióticos atuam seja na cicatrização de feridas, combate ao estress/infeção primária e o início da

recuperação de tecidos distantes diferentemente das condições de disbiose intestinal, em que a translocação de bactérias patogénicas leva ao aumento de moléculas prócarcinogénicas, como espécies reativas de oxigénio (EROS), genotoxina bacteriana (colibactina) e sulfeto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) (80).

#### **4.5 Pioglitazona reduz migração em Caco2**

Os nossos estudos apresentaram tendência heterogénea nas condições com o uso do agonista de PPAR $\gamma$  utilizado da otimização da adipogénese, e recentes estudos têm sustentado o facto de que esse tipo de fármaco antidiabético, do grupo das tiazolidinedionas, estar associado com a redução modesta de 9% no risco de desenvolvimento de CCR em pacientes com DM2 tratados com Pioglitazona (86).

Apesar da Pioglitazona estar direcionada para reduzir resistência insulínica, seu uso pode ainda aumentar o acúmulo de gotículas lipídicas em adipócitos maduros e também ativar vias de supressão tumoral por apoptose, como a via mTOR, por exemplo (87). Estudo de Ninonimia, *et al* (2014) avaliou o efeito da Pioglitazona em cinco linhas celulares tumorais (Capan-1, Aspc-1, BxPC-3, PANC-1 e MIApaCa-2) e o resultado confirmou efeito inibitório na proliferação das 5 linhas examinadas quando a concentração de Pioglitazona foi superior a 10 $\mu$ M (88, 89).

Autores sugerem que o altos níveis de expressão de PPAR $\gamma$  foram identificados em células de tumor pancreático humano como fator de risco, e o tratamento com tiazolidinediona atuou inibindo a proliferação celular e induzindo a diferenciação celular, num processo de cessação da proliferação celular pelo acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular (90).

### **5. Conclusão**

Pelo que foi observado neste trabalho, a modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos apresentou resultados promissores no modelo *in vitro* de doença adenocarcinoma de cólon. Ainda que preliminares, estes resultados representam um ponto de partida em como o uso de probióticos poderá modelar a proteção a fatores de risco para cancros gastrointestinais, como cancro colorretal. A terapia probiótica poderá funcionar como uma estratégia alternativa para levar a melhorias da condição meta-inflamatória e metabólica presente em pacientes com obesidade e/ou diabéticos em uso de terapia com Pioglitazona, por exemplo.

O tecido adiposo está envolvido de forma complexa com o tumor e com o presente estudo foi possível inferir que o uso de um probiótico de forma preventiva poderá atenuar a progressão e agressividade do adenocarcinoma de cólon.

De modo geral, existe uma rota atraente da investigação para a prevenção do cancro ou uma terapêutica de tratamento para o cancro, intervindo na modulação da microbiota intestinal. Contudo, são necessários estudos complementares para investigar e compreender os mecanismos subjacentes entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico no contexto de cancro.

### **Perspectivas futuras**

- Otimizar produção de extrato de probióticos para ser utilizado em linhas celulares;
- Acrescentar substrato bacteriano no meio de cultura utilizado para inoculação de probióticos (como FOS, GOS, inulina, por exemplo);
- Testar o efeito do probiótico em outras linhas celulares e modelos de doença;
- Dosear metabolitos expressos nas condições de diferenciação adipocitária com e sem Pioglitazona;
- Testar co-cultura de macrófagos com adipócitos humanos.

## Referências bibliográficas

1. World Health Organization. (2021). Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em 15 de Junho de 2023.
2. Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15, 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
3. Safaei, M., Sundararajan, E. A., Driss, M., Boulila, W., & Shapi'i, A. (2021). A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Computers in biology and medicine*, 136, 104754. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104754>
4. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
5. Kamal N, Ilowefah MA, Hilles AR, Anua NA, Awin T, Alshwyeh HA, Aldosary SK, Jambocus NGS, Alosaimi AA, Rahman A, Mahmood S, Mediani A. (2022). Genesis and Mechanism of Some Cancer Types and an Overview on the Role of Diet and Nutrition in Cancer Prevention. *Molecules*. 27(6):1794. <https://doi.org/10.3390/molecules27061794>
6. Ye, P.; Xi, Y.; Huang, Z.; Xu, P. (2020). Linking Obesity with Colorectal Cancer: Epidemiology and Mechanistic Insights. *Cancers*. 12, 1408. <https://doi.org/10.3390/cancers12061408>
7. Singh, S., Sharma, P., Sarma, D. K., Kumawat, M., Tiwari, R., Verma, V., Nagpal, R., & Kumar, M. (2023). Implication of Obesity and Gut Microbiome Dysbiosis in the Etiology of Colorectal Cancer. *Cancers*, 15(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/cancers15061913>
8. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology*, 11(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>
9. Hornung, F., Rogal, J., Loskill, P., Löffler, B., & Deinhardt-Emmer, S. (2021). The Inflammatory Profile of Obesity and the Role on Pulmonary Bacterial and Viral Infections. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3456. <https://doi.org/10.3390/ijms22073456>
10. Endalifer, M. L., & Diress, G. (2020). Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. *Journal of obesity*, 2020, 6134362. <https://doi.org/10.1155/2020/6134362>
11. Björntorp P. (1990). "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(4), 493–496.
12. Björklund, P., & Fändriks, L. (2019). The pros and cons of gastric bypass surgery – The role of the Roux-limb. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 40–41, 101638. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2019.101638>
13. Palavicini, J. P., Chavez-Velazquez, A., Fourcaudot, M., Tripathy, D., Pan, M., Norton, L., DeFronzo, R. A., & Shannon, C. E. (2021). The Insulin-Sensitizer Pioglitazone Remodels Adipose Tissue Phospholipids in Humans. *Frontiers in physiology*, 12, 784391. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.784391>
14. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Superobesos: quais as melhores técnicas e cuidados necessários para cirurgia bariátrica. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/superobesos-quais-as-melhores-tecnicas-e-cuidados-necessarios-para-cirurgia-bariatrica/>. Acesso em 09 de maio de 2023.
15. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet (London, England)*, 387(10027), 1513–1530. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)
16. Canello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., Guerre-Millo, M., & Clément, K. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, 55(6), 1554–1561. <https://doi.org/10.2337/db06-0133>
17. Divella, R., De Luca, R., Abbate, I., Naglieri, E., & Daniele, A. (2016). Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *Journal of Cancer*, 7(15), 2346–2359. <https://doi.org/10.7150/jca.16884>

18. Krieghoff-Henning, E., Folkerts, J., Penzkofer, A., & Weg-Remers, S. (2017). Cancer – an overview. Krebs – ein Überblick. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 40(2), 48–54.
19. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
20. Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current biology: CB*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
21. National Cancer Institute. USA. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Acesso em maio 2023).
22. Al-Ishaq, R. K., Koklesova, L., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2022). Immunomodulation by Gut Microbiome on Gastrointestinal Cancers: Focusing on Colorectal Cancer. *Cancers*, 14(9), 2140. <https://doi.org/10.3390/cancers14092140>
23. World Health Organization Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Acesso em maio 2023).
24. Qiao, L., & Wong, B. C. (2009). Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 12(3), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.02.002>
25. Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., Romero, I. L., Carey, M. S., Mills, G. B., Hotamisligil, G. S., Yamada, S. D., Peter, M. E., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*, 17(11), 1498–1503. <https://doi.org/10.1038/nm.2492>
26. Shi, R., Xiang, W., Kang, X., Zhang, L., Wang, J., Miao, H., He, F. (2019). Alteration of Adaptive Immunity in a Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Model. *Journal of Cancer*, 10(2), 367–377. <https://doi.org/10.7150/jca.27947>
27. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
28. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 8PH 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
29. Schatoff, E. M., Leach, B. I., & Dow, L. E. (2017). Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports*, 13(2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s11888-017-0354-9>
30. Garcia, H., & Song, M. (2019). Early-life obesity and adulthood colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Revista Panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 43, e3. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.3>
31. Sánchez-Alcoholado, L., Ramos-Molina, B., Otero, A., Laborda-Illanes, A., Ordóñez, R., Medina, J. A., Gómez-Millán, J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2020). The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers*, 12(6), 1406. <https://doi.org/10.3390/cancers12061406>
32. O'Sullivan, D. E., Sutherland, R. L., Town, S., Chow, K., Fan, J., Forbes, N., Heitman, S. J., Hilsden, R. J., & Brenner, D. R. (2022). Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 20(6), 1229–1240.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.01.037>
33. Dong, Y., Zhou, J., Zhu, Y., Luo, L., He, T., Hu, H., Liu, H., Zhang, Y., Luo, D., Xu, S., Xu, L., Liu, J., Zhang, J., & Teng, Z. (2017). Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Bioscience reports*, 37(6), BSR20170945. <https://doi.org/10.1042/BSR20170945>
34. Lee, J., Meyerhardt, J. A., Giovannucci, E., & Jeon, J. Y. (2015). Association between body mass index and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PloS one*, 10(3), e0120706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120706>

35. Schlesinger, S., Lieb, W., Koch, M., Fedirko, V., Dahm, C. C., Pischon, T., Nöthlings, U., Boeing, H., & Aleksandrova, K. (2015). Body weight gain and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(7), 607–619. <https://doi.org/10.1111/obr.12286>
36. Ray, I., Meira, L. B., Michael, A., & Ellis, P. E. (2022). Adipocytokines and disease progression in endometrial cancer: a systematic review. *Cancer metastasis reviews*, 41(1), 211–242. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10002-6>.
37. Zackular, J. P., Baxter, N. T., Iverson, K. D., Sadler, W. D., Petrosino, J. F., Chen, G. Y., & Schloss, P. D. (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio*, 4(6), e00692-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>
38. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. (2015). Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol*. 6:20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00020>
39. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? (2016). *BMC*. 14:73. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>
40. Pham, F., Moinard-Butot, F., Coutzac, C., & Chaput, N. (2021). Cancer and immunotherapy: a role for microbiota composition. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 155, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.06.051>
41. Golshani, G., & Zhang, Y. (2020). Advances in immunotherapy for colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 13, 1756284820917527. <https://doi.org/10.1177/1756284820917527>
42. Garrett W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science* (New York, N.Y.), 348(6230), 80–86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>
43. Serena, C., Ceperuelo-Mallafré, V., Keiran, N., Queipo-Ortuño, M. I., Bernal, R., Gomez-Huelgas, R., Urpi-Sarda, M., Sabater, M., Pérez-Brocal, V., Andrés-Lacueva, C., Moya, A., Tinahones, F. J., Fernández-Real, J. M., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2018). Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *The ISME journal*, 12(7), 1642–1657. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0068-2>
44. Cătoi, A. F., Vodnar, D. C., Corina, A., Nikolic, D., Citarrella, R., Pérez-Martínez, P., & Rizzo, M. (2019). Gut Microbiota, Obesity and Bariatric Surgery: Current Knowledge and Future Perspectives. *Current pharmaceutical design*, 25(18), 2038–2050. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708190437>
45. Woting, A., & Blaut, M. (2016). The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*, 8(4), 202. <https://doi.org/10.3390/nu8040202>
46. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11(8), 506–14
47. Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R. et al. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17, 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
48. Wesemann, D. R., Portuguese, A. J., Meyers, R. M., Gallagher, M. P., Cluff-Jones, K., Magee, J. M., Panchakshari, R. A., Rodig, S. J., Kepler, T. B., & Alt, F. W. (2013). Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature*, 501(7465), 112–115. <https://doi.org/10.1038/nature12496>
49. Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C. W., Santacruz, N., Peterson, D. A., Stappenbeck, T. S., & Hsieh, C. S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478(7368), 250–254. <https://doi.org/10.1038/nature10434>
50. Zitvogel, L., Ma, Y., Raoult, D., Kroemer, G., & Gajewski, T. F. (2018). The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science* (New York, N.Y.), 359(6382), 1366–1370. <https://doi.org/10.1126/science.aar6918>

51. Mao, K., Gao, J., Wang, X., Li, X., Geng, S., Zhang, T., Sadiq, F. A., & Sang, Y. (2022). Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 Has Effect Against Obesity by Regulating Gut Microbiota in Two Phases in Human Microbiota-Associated Rats. *Frontiers in nutrition*, 8, 811619. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.811619>
52. Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G. C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., & Collins, J. K. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *The American journal of clinical nutrition*, 85(2), 488–496. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.488>
53. Sergeev, I. N., Aljutaily, T., Walton, G., & Huarte, E. (2020). Effects of Synbiotic Supplement on Human Gut Microbiota, Body Composition and Weight Loss in Obesity. *Nutrients*, 12(1), 222. <https://doi.org/10.3390/nu12010222>
54. Zarrati, M., Salehi, E., Nourijelyani, K., Mofid, V., Zadeh, M. J., Najafi, F., Ghaflati, Z., Bidad, K., Chamari, M., Karimi, M., & Shidfar, F. (2014). Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet. *Journal of the American College of Nutrition*, 33(6), 417–425. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.874937>
55. Xie, N., Cui, Y., Yin, Y. N., Zhao, X., Yang, J. W., Wang, Z. G., Fu, N., Tang, Y., Wang, X. H., Liu, X. W., Wang, C. L., & Lu, F. G. (2011). Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 53. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-53>
56. Sacarro, D. M. Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado. [Acervo de teses de doutoramento da Universidade de São Paulo, 2008] Acessado em Dezembro de 2022 e disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-01102008-161512/publico/Daniela.pdf>
57. Turrone, F., Duranti, S., Milani, C., Lugli, G. A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). Bifidobacterium bifidum: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms*, 7(11), 544. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>
58. Xiao, L., Wang, J., Li, J., Chen, X., Xu, P., Sun, S., He, D., Cong, Y., & Zhai, Y. (2015). ROR $\alpha$  inhibits adipocyte-conditioned medium-induced colorectal cancer cell proliferation and migration and chick embryo chorioallantoic membrane angiopoiesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 308(5), C385–C396. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2014>
59. Teixeira, C., Sousa, A. P., Santos, I., Rocha, A. C., Alencastre, I., Pereira, A. C., Martins-Mendes, D., Barata, P., Baylina, P., & Fernandes, R. (2022). Enhanced 3T3-L1 Differentiation into Adipocytes by Pioglitazone Pharmacological Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR- $\gamma$ ). *Biology*, 11(6), 806. <https://doi.org/10.3390/biology11060806>
60. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
61. Corrêa RS, Pinto JRFE, Santos LV, Góis MC, Silva RP, Silva HM. Rectal cancer survival in a Brazilian Cancer Reference Unit. *J. Coloproctology*. 2015; 36(4). <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2016.04.015>
62. Machado FF, Lazzaretti RK, Poziomyck AK. Uso de prebióticos, probióticos e simbióticos nos pré e pós-operatórios do câncer colorretal: uma revisão. *Rev Bras cancer*. 2014;60(4):363–70.
63. Markowiak-Kopeć, P., & Ślizewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12(4), 1107. <https://doi.org/10.3390/nu12041107>
64. Drago L. (2019). Probiotics and Colon Cancer. *Microorganisms*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030066>
65. Rodrigues, JR, et al. (2019). Effect of probiotics in the treatment of colorectal cancer. *Arch Health Invest* 8(8):394–399. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v8i8.3212>

66. Chaplin, Alice, Ramon Maria Rodriguez, Juan José Segura-Sampedro, Aina Ochogavía-Seguí, Dora Romaguera, and Gwendolyn Barceló-Coblijn. (2022). "Insights behind the Relationship between Colorectal Cancer and Obesity: Is Visceral Adipose Tissue the Missing Link?" *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 21: 13128. <https://doi.org/10.3390/ijms232113128>
67. do Carmo, M. S., Santos, C. I. D., Araujo, M. C., Girón, J. A., Fernandes, E. S., & Monteiro-Neto, V., (2018). Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food & function*, 9(10), 5074–5095. <https://doi.org/10.1039/c8fo00376a>
68. Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
69. Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 109(January), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>
70. Saad, S. M. I. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42 (1) · Mar 2006 · <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>
71. Carević, M., Vukašinić-Sekulić, M., Ćorović, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Veličković, D., & Bezbradica, D. (2018). Evaluation of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. *Journal of bioscience and bioengineering*, 126(6), 697–704. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.003>
72. Chaplin, A., Rodriguez, R. M., Segura-Sampedro, J. J., Ochogavía-Seguí, A., Romaguera, D., & Barceló-Coblijn, G. (2022). Insights behind the Relationship between Colorectal Cancer and Obesity: Is Visceral Adipose Tissue the Missing Link?. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13128. <https://doi.org/10.3390/ijms232113128>
73. Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schälter, F., Lucas, S., Azizov, V., Dürholz, K., Steffen, F., Omata, Y., Rings, A., Bertog, M., Rizzo, A., Iljazovic, A., Basic, M., Kleyer, A., Culemann, S., Krönke, G., Luo, Y., Überla, K., Gaipf, U. S., ... Zaiss, M. M. (2020). Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nature communications*, 11(1), 1995.
74. Cheng, Y., Ling, Z., & Li, L. (2020). The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology*, 11, 615056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>
75. Chambers, E. S., Preston, T., Frost, G., & Morrison, D. J. (2018). Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Current nutrition reports*, 7(4), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0248-8>
76. Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, 40(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
77. Al Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., Déjardin, F., Sparwasser, T., Bérard, M., Cerf-Bensussan, N., & Eberl, G. (2019). A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity*, 50(5), 1276–1288.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.014>
78. Gargalionis, A. N., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2021). Targeting STAT3 Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Biomedicine*, 9(8), 1016. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9081016>
79. Frantz, A. L., Rogier, E. W., Weber, C. R., Shen, L., Cohen, D. A., Fenton, L. A., Bruno, M. E., & Kaetzel, C. S. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal immunology*, 5(5), 501–512. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.23>

80. Singh, S., Singh, M., & Gaur, S. (2022). Probiotics as multifaceted oral vaccines against colon cancer: A review. *Frontiers in immunology*, *13*, 1002674. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1002674>
81. Lazar, V., Ditu, L. M., Pircalabioru, G. G., Gheorghe, I., Curutiu, C., Holban, A. M., Picu, A., Petcu, L., & Chifiriuc, M. C. (2018). Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in immunology*, *9*, 1830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01830>
82. Rébé, Cédric, and François Ghiringhelli. (2020). "Interleukin-1 $\beta$  and Cancer" *Cancers* *12*, no. 7: 1791. <https://doi.org/10.3390/cancers12071791>
83. Chen, B., Luo, M. X., Zhou, X., Lv, Y., & Su, G. Q. (2016). Correlation Between Interleukin-1 $\beta$ -511 C/T Polymorphism and Gastric Cancer in Chinese Populations: A Meta-Analysis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, *22*, 1742–1750. <https://doi.org/10.12659/msm.895771>
84. Zheng, J., Wang, X., Yu, J., Zhan, Z., & Guo, Z. (2022). IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-12p70 levels in patients with colorectal cancer and their predictive value in anti-vascular therapy. *Frontiers in oncology*, *12*, 997665. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.997665>
85. Nagaraju, G. P., Aliya, S., & Alese, O. B. (2015). Role of adiponectin in obesity related gastrointestinal carcinogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*, *26*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.06.007>
86. Wang, Kevin, Jonathan Hirschenson, Amanda Moore, and Ryan J. Mailloux. (2022). "Conditions Conducive to the Glutathionylation of Complex I Subunit NDUFS1 Augment ROS Production following the Oxidation of Ubiquinone Linked Substrates, Glycerol-3-Phosphate and Proline" *Antioxidants* *11*, no. 10: 2043. <https://doi.org/10.3390/antiox11102043>
87. Liu, Y., Jin, P. P., Sun, X. C., & Hu, T. T. (2018). Thiazolidinediones and risk of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus: A meta-analysis. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, *24*(2), 75–81. [https://doi.org/10.4103/sjg.SJG\\_295\\_17](https://doi.org/10.4103/sjg.SJG_295_17)
88. Belfiore, A., Genua, M., & Malaguarnera, R. (2009). PPAR- $\gamma$  agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. *PPAR research*, *2009*, 830501. <https://doi.org/10.1155/2009/830501>
89. Ninomiya, I., Yamazaki, K., Oyama, K., Hayashi, H., Tajima, H., Kitagawa, H., Fushida, S., Fujimura, T., & Ohta, T. (2014). Pioglitazone inhibits the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Oncology letters*, *8*(6), 2709–2714. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2553>
90. Elnemr, A., Ohta, T., Iwata, K., Ninomia, I., Fushida, S., Nishimura, G., Kitagawa, H., Kayahara, M., Yamamoto, M., Terada, T., & Miwa, K. (2000). PPAR $\gamma$  ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *International journal of oncology*, *17*(6), 1157–1164. <https://doi.org/10.3892/ijo.17.6.1157>