

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA SALES DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS E VITAMINA D NA
CARCINOGENESE DO CÓLON**

ALFENAS/MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA SALES DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS E VITAMINA D NA
CARCINOGENESE DO CÓLON**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Pollyanna Francielli de Oliveira

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Oliveira, Carolina Sales de.

Efeitos do tratamento com probióticos e vitamina D na carcinogênese do cólon / Carolina Sales de Oliveira. - Alfenas, MG, 2022.

135 f. : il. -

Orientador(a): Pollyanna Francielli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Adenocarcinoma colorretal. 2. Colecalciferol. 3. Bifidobacterium bifidum. 4. Lactobacillus gasseri. 5. Microbiota intestinal. I. Oliveira, Pollyanna Francielli de, orient. II. Título.

Carolina Sales de Oliveira.

EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS E VITAMINA D NA CARCINOGENESE DO CÓLON

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à saúde

Aprovada em: 26 de maio de 2022

Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira (UNIFAL-MG)
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira
Instituição: Universidade de Araraquara
UNIARA

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hudsara Aparecida de Almeida Paula, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2022, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Aparecida Resende Nogueira, Usuário Externo**, em 26/05/2022, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0727725** e o código CRC **2C406F3A**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais por todo o percurso até aqui e em diante;

À Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), pelo alicerce de minha formação acadêmica;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), pelas oportunidades de aprendizado;

À Profa Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira, pela orientação e inspiração fornecidas para que eu possa percorrer os caminhos da ciência;

Aos colaboradores, sem os quais este trabalho não alcançaria qualidade científica e metodológica;

Ao Laboratório de Genética Humana da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), e seus integrantes atuais ou egressos, pelo acolhimento e companheirismo no dia-a-dia;

A Mariane Minussi Baptistella, Alexia Polo Siqueira e Danilo Gabriel de Oliveira, que me possibilitaram encontrar significância em meu tempo aqui dedicado e valores para toda a vida;

A Flávia Alvine Carvalho, pela excelência profissional e humana que me permitiram superar desafios internos e externos;

E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

“A dúvida é o sal do espírito, sem uma pitada de dúvida, todos os conhecimentos em breve apodreceriam. ”

(CHARTIER, 1939)

OLIVEIRA, C. S. Efeitos do tratamento com probióticos e vitamina D na carcinogênese do cólon. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

As propriedades da vitamina D sobre a modulação da diferenciação e proliferação celular e o papel de probióticos na microbiota intestinal e da resposta imunogênica têm gerado interesse na aplicação de ambos no âmbito da quimioterapêutica e quimioprevenção dos tumores colorretais. O câncer colorretal (CCR) tem diagnóstico tardio e tratamento com baixas taxas de resposta, aliados à quimiorresistência e efeitos adversos. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento isolado e/ou combinado da vitamina D3 e probióticos sobre a carcinogênese colorretal. *In vitro*, células de adenocarcinoma de cólon (HCT-8) foram tratadas por 48 horas com a vitamina D, probióticos (*Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri*) e quimioterápicos clássicos, de maneira isolada e combinada. A seletividade foi avaliada utilizando uma linhagem de queratinócitos normais (HaCat), e o efeito sinérgico ou antagônico das combinações foi avaliado através do método de Chou e Talalay. *In vivo*, ratos Wistar foram tratados com os probióticos e vitamina D isolados e combinados em três diferentes abordagens de tratamento (pré, pós e simultâneo), durante 12 semanas. A indução das lesões pré-neoplásicas foi realizada com o carcinógeno com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em quatro doses de 40 mg/kg peso corpóreo (p.c). Foi realizado o monitoramento toxicológico (consumo de água e ganho de peso), a avaliação da frequência de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA), análise do microbioma fecal, avaliação bioquímica e os mecanismos de ação foram investigados por imunohistoquímica e RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*). Os resultados *in vitro* indicaram efeito seletivo e dose-dependente na redução da viabilidade em HCT-8, além de redução do IC₅₀ nos tratamentos combinados, com confirmação do efeito sinérgico das combinações da vitamina D com 5-fluorouracil e com doxorrubicina. *In vivo*, os resultados demonstraram ação protetora da vitamina D na dose de 250 UI (Unidades Internacionais) no modelo de pré-tratamento e na dose de 2000 UI no pós-tratamento, e em ambas as doses no modelo simultâneo. Os Probióticos demonstraram reduzir significativamente as CA em todas as abordagens estudadas na dose de 10⁷ UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Efeito semelhante foi observado para os tratamentos combinados. A análise da microbiota fecal demonstrou presença de filos diferentes nos grupos expostos a probióticos e vitamina D, evidenciando que os tratamentos possuem efeito modulador da microbiota. O monitoramento do consumo de água e ração indicou ausência de toxicidade e a avaliação da alanina aminotransferase (ALT), aspartato

aminotransferase (AST), creatinina e ureia séricos ratificou a segurança dos tratamentos. Os dados obtidos nos ensaios de RT-PCR e imunohistoquímica para os tratamentos isolados e combinados demonstraram atuação dos probióticos e da vitamina D na sinalização do Fator de transcrição bZIP tipo NFE2 (Nrf2), na atividade de Glutathione S-Transferase (GST) e na regulação inflamatória da Ciclooxigenase (COX2) e do Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), e ainda, em vias de proliferação e modulação transcricional como a via Wnt/ β -catenina e do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). Nas condições experimentais avaliadas, os resultados sugerem que tanto a vitamina D quanto os probióticos apresentam efeito sobre diferentes vias envolvidas na carcinogênese colorretal, o que fornece novas perspectivas para o aperfeiçoamento de terapias já estabelecidas.

Palavras-chave: adenocarcinoma colorretal, colecalciferol, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri*, quimioprevenção, microbiota intestinal.

ABSTRACT

The properties of vitamin D on the modulation of cell differentiation and proliferation and the role of probiotics in the intestinal microbiota and immunogenic response have generated interest in the application of both in the context of chemotherapeutics and chemoprevention of colorectal tumors. Colorectal cancer (CRC) has late diagnosis and treatment with low response rates, coupled with chemoresistance and adverse effects. In this regard, the present study aimed to investigate the effects of isolated and/or combined treatment of vitamin D3 and probiotics on colorectal carcinogenesis. *In vitro*, colon adenocarcinoma cells (HCT-8) were treated for 48 hours with vitamin D, probiotics (*Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus gasseri*) and doxorubicin, alone and in combination. Selectivity was assessed using a normal keratinocyte cell line (HaCat), and the synergistic or antagonistic effect of the combinations was evaluated using the method of Chou and Talalay. *In vivo*, Wistar rats were treated with the probiotics and vitamin D alone and in combination in three different treatment approaches (pre-, post-, and simultaneous) for a period of 12 weeks, and pre-neoplastic lesions were induced with 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 40 mg/kg body weight). Toxicological monitoring (water consumption and weight gain), evaluation of the frequency of aberrant crypt foci (ACF) and aberrant crypts (AC), fecal microbiome analysis, biochemical evaluation, immunohistochemical and RT-PCR assays were performed. The *in vitro* results indicate a selective and dose-dependent effect on viability reduction in both probiotic and vitamin D treatments alone in HCT-8, and reduced IC₅₀ values in combination, with confirmation of the synergistic effect of the combination of vitamin D with 5-fluorouracil and with doxorubicin. The *in vivo* results indicate protective action of vitamin D at a dose of 250 IU in the pre-treatment model, at a dose of 2000 IU (International Units) in the post-treatment, and at both doses in the simultaneous model. Probiotics at a dose of 10⁷ CFU (Colony Forming Units) have significantly reduced FCA in all approaches studied. Similar effect was reached by the combined treatments. The analysis of the fecal microbiota demonstrated predominance of different phyla in the groups exposed to probiotics and vitamin D, evidencing the modulatory effect of the microbiota presented by the treatments. The evaluation of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine and urea ratified the safety of the treatments. The data provided by RT-PCR and immunohistochemistry assays for the isolated or combined treatments point to the action of probiotics and vitamin D on important pathways for

carcinogenesis in its different stages, including NFE2 like bZIP transcription factor 2 (Nrf2) signaling and Glutathione S-transferase (GST) activity, Cyclooxygenase 2 (COX2) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) inflammatory regulation, and also proliferation and transcriptional modulation pathways such as the Wnt/ β -catenin pathway and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). Under the experimental conditions evaluated, the results obtained suggest that both vitamin D and probiotics have an effect on different pathways involved in colorectal carcinogenesis, which provides new perspectives for the improvement of established therapies.

Keywords: colorectal adenocarcinoma, cholecalciferol, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri*, chemoprevention, gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de tratamentos para a avaliação do potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico da vitamina D e/ou mix de probióticos	44
Figura 2 –	Fotomicrografias da porção distal do cólon de ratos Wistar	46
Figura 3 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) de <i>Bifidobacterium bifidum</i>	52
Figura 4 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) de <i>Lactobacillus gasseri</i>	52
Figura 5 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) do mix de probióticos	55
Figura 6 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UI/mL) de vitamina D	57
Figura 7 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de <i>B. bifidum</i> (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)	59
Figura 8 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de <i>L. gasseri</i> (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)	59
Figura 9 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações do mix de probióticos (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)	60
Figura 10 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com diferentes concentrações de DXR (μM)	63
Figura 11 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + DXR (μM)	64
Figura 12 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de 5-FU (μM)	66
Figura 13 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + 5-FU (μM)	67
Figura 14 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de CDDP (μM)	69
Figura 15 –	Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + CDDP (μM)	69
Figura 16 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	78

Figura 17 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	82
Figura 18 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira prévia à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	83
Figura 19 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	84
Figura 20 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira posterior à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	85
Figura 21 –	Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução de carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	86
Figura 22 –	Abundância microbiológica encontrada nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	88
Figura 23 –	Número de taxonomias encontradas nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	89
Figura 24 –	Perfil microbiológico proporcional encontrado nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	90
Figura 25 –	Perfil microbiológico quantitativo encontrado nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	91
Figura 26 –	Parâmetros bioquímicos determinados no soro de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	93
Figura 27 –	Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX2 no tecido colorretal parafinizado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	95
Figura 28 –	Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX2 no tecido colorretal parafinizado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	102

Figura 29 –	Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX2 no tecido colorretal parafinizado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	103
Figura 30 –	Abundância relativa dos transcritos que codificam para NOS2 e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	107
Figura 31 –	Abundância relativa dos transcritos que codificam para NOS2 e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	110
Figura 32 –	Abundância relativa dos transcritos que codificam para NOS2 e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Símbolos e descrição de efeito sinérgico ou antagônico em estudos de combinação analisados com o método de Chou-Talalay	42
Tabela 2 –	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR	49
Tabela 3 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado das espécies de probióticos (UFC/mL) após o tratamento por 48h	56
Tabela 4 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e com vitamina D (UI/mL) após o tratamento por 48h	57
Tabela 5 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado das espécies de probióticos (UFC/mL) e vitamina D (UI/mL) após o tratamento por 48h	61
Tabela 6 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e DXR (uM) após o tratamento por 48h	64
Tabela 7 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e 5-FU (uM) após o tratamento por 48h	67
Tabela 8 –	IC ₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e CDDP (uM) após o tratamento por 48h	70
Tabela 9 –	Índice de combinação (CI) e descrição de efeito (sinérgico ou antagônico) obtidos para os tratamentos combinados de probióticos e vitamina D nas linhagens HaCat e HCT-8	74
Tabela 10 –	Índice de combinação (CI) e descrição de efeito (sinérgico ou antagônico) obtidos para os tratamentos combinados de vitamina D e quimioterápicos nas linhagens HaCat e HCT-8	75
Tabela 11 –	Valores médios e desvio-padrão do peso inicial, final, ganho de peso e consumo de água obtidos em ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos e respectivos grupos controle	77
Tabela 12 –	Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese no ensaio piloto	129
Tabela 13 –	Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos e respectivos grupos controle	130

Tabela 14 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	131
Tabela 15 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução de carcinogênese	132
Tabela 16 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução de carcinogênese	133
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos determinados no soro de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihidroxitamina D ₃
25(OH)D	25-Hidroxitamina D
253J	Linhagem celular de câncer urotelial de bexiga
5-FU	5-fluorouracil
A375	Linhagem celular de melanoma humano
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão
A	Antagonismo
AF	Antagonismo Forte
AGS	Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano
AL	Antagonismo Leve
ALT	Alanina aminotransferase
AM	Antagonismo Moderado
AMF	Antagonismo Muito Forte
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
AOM	<i>Azoxymethane</i> (Azoximetano)
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> (Polipose adenomatosa do cólon)
ARE	<i>Antioxidant response element</i> (Elemento de resposta antioxidante)
AST	Aspartato aminotransferase
<i>AXIN2</i>	Axina 2
BAD	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i> (agonista de morte celular associado a BCL2)
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i> (regulador de apoptose, X associado a BCL2)

BCL2	<i>BCL2 apoptosis regulator</i> (regulador de apoptose BCL2)
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i> (survivina)
BJ	Linhagem celular de fibroblasto humano
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> (Proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase)
CA	Criptas aberrantes
Caco-2	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
CAL-27	Linhagem celular de carcinoma oral de células escamosas
<i>CASP3</i>	Caspase 3
<i>CASP8</i>	Caspase 8
<i>CASP9</i>	Caspase 9
<i>CAT</i>	Catalase
CI	<i>Combination index</i> (índice de combinação)
CCR	Câncer colorretal
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1</i> (Caderina 1)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Quinase dependente de ciclinas)
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> (Inibidor de quinase ciclina dependente 1A, p21)
<i>CDKN1B</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i> (Inibidor de quinase ciclina dependente 1B, p27)
CFS	<i>Cell free supernatant</i> (sobrenadante livre de células)
COX2	<i>Cyclooxygenase 2</i> (Ciclooxygenase 2, não-oficial)
<i>CSNK1E</i>	<i>Casein Kinase 1 Epsilon</i> (Caseína quinase 1 epsilon)
<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin Beta 1</i> (Catenina beta 1)
CYP27B1	<i>Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1</i> (Enzima do citocromo P450, família 27, subfamília B, membro 1)
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i> (Proteína ligadora de vitamina D)

DIABLO	<i>Diablo IAP-binding mitochondrial protein</i> (proteína mitocondrial <i>diablo</i> ligante de proteína inibidora de apoptose)
DKK1	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> (Inibidor da via de sinalização WNT <i>dickkopf 1</i>)
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
DLD-1	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal
DSS	Dextran sulfato de sódio
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
DXR	Doxorrubicina
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i> (Fator de transcrição E2F 1)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
FAP	<i>Fibroblast activation protein alpha</i> (Proteína alfa de ativação fibroblástica)
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i> (receptor de morte de superfície celular Fas)
FCA	Focos de criptas aberrantes
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i> (escurfina)
Fzd	Frizzled Receptor (Receptor transmembrana <i>Frizzled</i>)
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i> (Glutaciona peroxidase)
GSH	Glutaciona
GSR	<i>Glutathione-disulfide reductase</i> (Glutaciona-dissulfeto redutase)
GST	<i>Glutathione S-transferase</i> (Glutaciona-S-transferase)

HaCat	Linagem celular de queratinócitos normais humanos
HCA7	Linagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HCT-8	Linagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HCT-116	Linagem celular de carcinoma colorretal humano
HDAC	Histona desacetilase
HGF	Linagem celular de fibroblasto gengival humano
HMOX1	Heme oxigenase 1
HPGD	<i>15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase</i> (Hidroxiprostaglandina dehidrogenase 15)
HT-29	Linagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HUVEC	Linagem celular de endotélio de veia umbilical humano
IBS	<i>Irritable Bowel Syndrome</i> (síndrome do intestino irritável)
IC ₅₀	Concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%
ID2	<i>Inhibitor of DNA binding 2</i> (Inibidor 2 de ligação ao DNA)
IEC-18	Linagem celular de epitélio intestinal de ratos
IL-8	Interleucina 8
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase induzível, não oficial)
i.p.	Intraperitoneal
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaceador transcrito interno)
KDR/293	Linagem celular epitelial normal humana
KEAP1	<i>Kelch like ECH associated protein 1</i> (Proteína 1 associada ao ECH do tipo Kelch)
KRAS	<i>KRAS (Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) proto-oncogene, GTPase</i> (Homólogo do oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten Ki-ras2)
LRP6/5	<i>LDL receptor related protein 6/5</i> (proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade 6 ou 5)

LS174T	Linhagem celular de adenocarcinoma colônico humano
lncRNA	<i>Long non coding RNA</i> (RNA não-codificante longo)
miRNA	MicroRNA
MKN45	Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano
MTT	<i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i> (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)
MUC2	<i>Mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming</i> (Mucina 2)
MYC	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i> (Proto-oncogene MYC, fator de transcrição bHLH)
NCI-H1975	Linhagem celular de adenocarcinomas de pulmão
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i> (Fator nuclear kappa B subunidade 1)
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i> (Óxido nítrico sintase 2, conhecido como iNOS)
NQO1	<i>NAD(P)H quinone dehydrogenase 1</i> (NAD(P)H quinona desidrogenase 1)
Nrf2	<i>NFE2 like bZIP transcription factor 2</i> (Fator de transcrição bZIP tipo NFE2)
OTUs	<i>Operational Taxonomic Units</i> (Unidades taxonômicas operacionais)
P	Perto de Efeito Aditivo
p21	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> (não-oficial)
p27	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i> (não-oficial)
p.c.	Peso corpóreo
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (Antígeno nuclear de proliferação celular)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> (Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa)
Prob	Probióticos
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> (Prostaglandina-endoperoxido sintase 2, conhecida como COX2)

RAW264.7	Linhagem celular de macrófagos de leucemia murina induzida por vírus
<i>RB1</i>	<i>RB transcriptional corepressor 1</i> (Correpressor transcricional RB 1)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> (Espécies reativas de nitrogênio)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RT-112	Linhagem celular de câncer urotelial de bexiga
RXR	<i>Retinoid X receptor</i> (Receptor retinóide X)
S	Sinergismo
s.c.	Subcutâneo
SCC-9	Linhagem celular de carcinoma oral de células escamosas
SCFA	<i>Short chain fatty acid</i> (Ácido graxo de cadeia curta)
SF	Sinergismo Forte
SFB	Soro fetal bovino
SL	Sinergismo Leve
SM	Sinergismo Moderado
SMF	Sinergismo Muito Forte
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> (Superóxido dismutase)
T24	Linhagem celular de câncer urotelial de bexiga
TCF/LEF	<i>T cell factor/Linoid enhancer factor</i> (Família de receptores do fator de célula T/fator realçador linfoide)
TGO	Transaminase oxalacética (conhecida como AST)
TGP	Transaminase pirúvica (conhecida como ALT)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i> (proteína de tumor P53)
<i>TXN1</i>	<i>Thioredoxin 1</i> (Tioredoxina 1)
UFC	Unidades formadoras de colônia

UI	Unidades internacionais
UVB	Radiação ultravioleta tipo B
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (Receptor de vitamina D)
VDREs	<i>Vitamin D response elements</i> (Elementos responsivos a vitamina D)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento vascular endotelial)
Vit D	Vitamina D
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site Family</i> (Família de ligantes <i>Wingless-type</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	CÂNCER COLORRETAL.....	26
2.2	COMPONENTES DA DIETA NA MODULAÇÃO DA CARCINOGENESE COLORRETAL.....	27
2.2.1	Vitamina D	28
2.2.2	Probióticos	32
4	OBJETIVOS	38
4.1	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.2.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	39
5.2.2	Tratamentos	40
5.2.3	Avaliação da proliferação celular	40
5.2.3.1	Avaliação do sinergismo.....	41
5.3	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i>	42
5.3.1	Animais	42
5.3.2	Determinação das doses a serem testadas	42
5.3.3	Tratamento	43
5.3.4	Coleta de amostras	45
5.3.5	Avaliação das lesões pré-neoplásicas	45
5.3.6	Análise da microbiota fecal	46
5.3.7	Avaliação bioquímica	47
5.3.8	Ensaio imunohistoquímico	48
5.3.9	Análise da expressão gênica	48
5.3.10	Análise estatística	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> : AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE..	51
6.1.1	Probióticos	51
6.1.2	Vitamina D	56
6.1.3	Combinação dos probióticos com vitamina D	58
6.1.4	Associação com quimioterápicos	61
6.1.4.1	Combinação da vitamina D com doxorrubicina	62

6.1.4.2	Combinação da vitamina D com 5-fluorouracil	65
6.1.4.3	Combinação da vitamina D com cisplatina	68
6.1.5	Avaliação do sinergismo	71
6.2	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO NA CARCINOGENÊSE COLORRETAL	76
6.2.1	Avaliação da toxicidade	76
6.2.2	Avaliação da carcinogenicidade	77
6.2.3	Tratamento Simultâneo	78
6.2.4	Pré-Tratamento	82
6.2.5	Pós-Tratamento	85
6.3	CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL	87
6.4	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	92
6.5	ESTUDO DOS ALVOS DE QUIMIOPREVENÇÃO	94
6.5.1	Avaliação imuno-histoquímica	94
6.5.1.1	Tratamento Simultâneo	94
6.5.1.2	Pré-tratamento e Pós-tratamento	101
6.5.2	Avaliação da expressão gênica	106
6.5.2.1	Tratamento Simultâneo	106
6.5.2.2	Pré-Tratamento e Pós-tratamento	109
7	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICES	129
	ANEXO	135

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) representou a segunda causa global de morte por câncer no ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021), com crescente morbimortalidade até mesmo na faixa etária menor que 50 anos, provavelmente devido ao aumento da exposição a fatores de risco (DA SILVA *et al.*, 2020; HUSSAN *et al.*, 2020). Apesar dos conhecimentos crescentes sobre a patogênica do CCR, a eficácia clínica dos tratamentos disponíveis mantém-se um grande desafio. Numerosos efeitos colaterais prejudicam o bem-estar dos pacientes e reduzem a adesão aos tratamentos, e a elevada resistência quimioterápica é um obstáculo enfrentado para a aplicação dos principais medicamentos na prática clínica (BENARBA; PANDIELLA, 2018; REJHOVÁ *et al.*, 2018; SUTHAR; AL MUTAR; VENKATESAN, 2020).

Uma vez que pode se apresentar nas formas esporádica, familiar ou hereditária, são importantes no CCR, o histórico familiar e a presença de instabilidade cromossômica e de mutações em genes supressores de tumor, e diversos fatores de risco comportamentais modificáveis (COSTEA *et al.*, 2018; DAS; KALITA; PAL, 2017; RECIO-BOILES; CAGIR, 2021). O consumo de cálcio, fibras, vitamina D e folato, além de frutas e vegetais em geral, tem sido associado ao risco reduzido de incidência de CCR, sendo implicada também a microbiota intestinal como um importante efector na relação entre a dieta e o câncer. Dessa maneira, novas estratégias com foco quimiopreventivo e, até mesmo quimioterapêutico, baseadas na modulação da carcinogênese colônica promovida por componentes da dieta, fitoquímicos ou suplementos, podem constituir terapias adicionais às convencionais, com mecanismos de ação seletivos e eficazes (REJHOVÁ *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a vitamina D e probióticos têm mostrado promissoras propriedades de modulação de vias importantes para a carcinogênese colorretal, como proliferação celular, controle do ciclo celular e inflamação (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-SANCHO; LARRIBA; MUÑOZ, 2020; OHARA; SUZUTANI, 2018; ZAHARUDDIN *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019). Considerando os achados promissores da literatura sobre a correlação vitamina D, probióticos e CCR, o presente trabalho avaliou o potencial citotóxico de ambos sobre a linhagem tumoral de adenocarcinoma colorretal, visando explorar a citotoxicidade e a seletividade afim de e minimizar efeitos adversos, e investigou a aplicação em diferentes abordagens de tratamento em modelo animal de lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER COLORRETAL

Sendo o terceiro câncer mais comum do mundo em homens e o segundo em mulheres, o CCR representa a segunda causa global de morte por câncer nos últimos anos (SUNG *et al.*, 2021). O principal fator que contribui para o aumento de sua incidência é a idade, sendo 70 anos a média para o diagnóstico em países desenvolvidos e 50 anos a idade indicada para início de exames preventivos. Apesar disso, indivíduos abaixo de 50 anos representam mais de 10% dos casos de CCR e crescente morbimortalidade, provavelmente devido ao aumento da exposição a outros fatores de risco (DA SILVA *et al.*, 2020; HUSSAN *et al.*, 2020).

O CCR pode se apresentar nas formas esporádica, familiar ou hereditária. Nestas duas últimas, são importantes o histórico familiar e a presença de instabilidade cromossômica e de mutações em genes supressores de tumor como *TP53*, importante para o correto funcionamento de *checkpoints* do ciclo celular, e *APC*, relacionado à sinalização WNT e à transcrição de outros genes como o fator de transcrição hélice-volta-hélice e proto-oncogene *MYC* (*MYC*, *MYC proto-oncogene*, *bHLH transcription fator*), como também em oncogenes como *KRAS* e *BRAF*, que regulam as principais vias de sinalização celular de PI3K. Nas síndromes hereditárias se destacam como fatores de risco a polipose adenomatosa familiar (FAP) e a síndrome de Lynch. Já a forma esporádica, que representa 60% do total de casos, é correlacionada a diversos fatores de risco ambientais ou comportamentais, como o consumo excessivo de álcool, alto consumo de carne vermelha e processada, baixa ingestão de fibras, e ainda a presença de doença inflamatória intestinal, tabagismo, obesidade, diabetes, entre outros (COSTEA *et al.*, 2018; DAS; KALITA; PAL, 2017; RECIO-BOILES; CAGIR, 2021; ULRICH *et al.*, 2013).

O acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas, com mutações somáticas ou germinativas, segundo a teoria mais aceita de carcinogênese colônica, é essencial para a transformação do epitélio colorretal normal em uma lesão pré-cancerosa. Através de expansão clonal, as células passam a apresentar diversos *hallmarks* do câncer, permitindo proliferação, invasão e metástase, de maneira que um pólipo colorretal apresentando uma cripta aberrante pode progredir para adenoma, e este por sua vez para adenoma avançado e então, o CCR. A grande maioria se apresenta como carcinoma, e destes, 90% são

adenocarcinomas, que podem ser classificados em estágios I a IV (KUIPERS *et al.*, 2017; RECIO-BOILES; CAGIR, 2021).

A ressecção cirúrgica é a modalidade de tratamento mais indicada para CCR localizado não-metastático, e para estágios mais avançados há abordagens quimioterápicas estabelecidas, como a quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan, oxaliplatina, entre outros, em monoterapia ou regimes de combinação (BENARBA; PANDIELLA, 2018; RECIO-BOILES; CAGIR, 2021), além da modalidade de imunoterapia em constante crescimento, com medicamentos como pembrolizumabe, nivolumabe e ipilimumabe em estudo ou aprovados para CCR metastático (GANESH *et al.*, 2019).

No entanto, os quimioterápicos convencionais apresentam numerosos efeitos colaterais, como neutropenia, estomatite, diarreia, supressão da medula óssea, náusea, alopecia, disestesia, disfunção renal, toxicidade pulmonar, dentre outros, devido à sua ação sobre diversos tipos celulares de alta taxa de divisão. Aliado à resistência quimioterápica, observada por exemplo na taxa de resposta de apenas 10 a 15% na monoterapia com 5-fluorouracil, a eficácia clínica dos tratamentos disponíveis constitui-se um grande desafio, o que contribui para a alta mortalidade atrelada à doença (BENARBA; PANDIELLA, 2018; REJHOVÁ *et al.*, 2018; SUTHAR; AL MUTAR; VENKATESAN, 2020). Mesmo os inovadores imunoterápicos enfrentam a incidência de efeitos adversos, comuns ou específicos às vias de sinalização da resposta imune estimuladas pelo tratamento, como eventos autoimunes, desordens neurológicas ou manifestações adrenais, cardíacas, renais e medulares (WROBEL; AHMED, 2019). Por estes motivos, pesquisadores em todo o mundo têm destacado a importância de se avaliar terapias complementares às convencionais, baseadas na aplicação de novas estratégias quimioterapêuticas e quimiopreventivas com mecanismos de ação seletivos e eficazes (REJHOVÁ *et al.*, 2018).

2.2 COMPONENTES DA DIETA NA MODULAÇÃO DA CARCINOGENESE COLORRETAL

Apesar das intrínsecas interações entre determinantes genéticos, epigenéticos e ambientais, a maior parte dos casos de CCR se correlaciona a fatores de risco modificáveis, atrelados ao estilo de vida, o que torna a intervenção sobre tais fatores uma das principais estratégias de prevenção primária (MEHTA *et al.*, 2010). Componentes

dietéticos, em especial, mostram propriedades intrigantes tanto na quimioprevenção como na progressão da carcinogênese, tendo sido investigados epidemiologicamente e experimentalmente com crescente interesse científico. O consumo de cálcio, fibras, vitamina D e folato, além de frutas e vegetais em geral, tem sido associado a risco reduzido de incidência de CCR, e a ingestão de carne vermelha e carne processada com risco aumentado em variadas populações (BRADBURY; MURPHY; KEY, 2020; FARVID *et al.*, 2021; MEHTA *et al.*, 2020), devido à produção de compostos alquilantes, oxidativos ou inflamatórios decorrentes da cura, defumação ou cocção em altas temperaturas (GURJAO *et al.*, 2021; TURESKY, 2018). Nesta ótica, tem sido correlacionado, ainda, o papel da microbiota intestinal como um importante efector na relação entre a dieta e o câncer (LAMICHHANE *et al.*, 2020). No entanto, ainda não estão determinados os mecanismos de ação ou os alvos moleculares de tais componentes, de maneira que sua elucidação é de grande interesse para aplicação de eficazes estratégias de prevenção (COSTEA *et al.*, 2018; SONG; GARRETT; CHAN, 2015).

2.2.1 Vitamina D

A vitamina D dá nome ao grupo de pró-hormônios lipossolúveis que se constitui de duas principais isoformas, denominadas vitamina D3 (colecalfiferol) e vitamina D2 (ergocalciferol). A vitamina D3 é majoritariamente endógena, sintetizada na pele sob influência da radiação ultravioleta B (UVB) a partir de 7-deidrocolesterol, de maneira que o status de vitamina D no plasma sanguíneo pode ser afetado pelos níveis de melanina, uso de protetor solar, estação do ano e localização geográfica do indivíduo (CHRISTAKOS *et al.*, 2016). Por isso, décadas atrás, a partir da observação de uma maior incidência de cânceres não-cutâneos em locais de altas latitudes e do conhecimento da correlação inversa entre tais latitudes e a exposição solar, surgiram hipóteses de uma possível proteção fornecida pela vitamina D contra o desenvolvimento tumoral (BIKLE, 2014; EL-SHARKAWY; MALKI, 2020; ISEKI *et al.*, 1999).

Tal hipótese foi testada em estudos de caso e em testes clínicos randomizados, que analisaram se a ingestão de vitamina D ou seus níveis séricos representam um fator de proteção ao desenvolvimento de câncer. Foram obtidos resultados mistos para diversos tipos tumorais, com destaque para um atrativo potencial no âmbito do CCR. Desde então, vêm sendo investigados os efeitos da vitamina D sobre a modulação do crescimento e diferenciação de células normais e malignas. Diversos estudos relatam a inibição do

crescimento e indução de diferenciação e apoptose em linhagens celulares de câncer de mama, próstata e intestino, além de inibição de processos de angiogênese, invasão, metástase e inflamação (EL-SHARKAWY; MALKI, 2020; TAGLIABUE; RAIMONDI; GANDINI, 2015).

Foi primeiro conhecida por seu papel essencial na regulação da absorção e transporte de cálcio e fosfato, porém atualmente se conhece a interação da vitamina D com diversos mecanismos fisiológicos e patogênicos (TAGLIABUE; RAIMONDI; GANDINI, 2015). Transportada no sangue até o fígado pela proteína ligadora da vitamina D (DBP, *vitamin D binding protein*), tanto a forma endógena como a exógena passam por hidroxilação e originam a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D). Essa por sua vez é transportada até o rim, cujos túbulos proximais possuem proteínas de superfície que atuam como receptor de DBP, permitindo sua captação e ação da enzima do citocromo P450, família 27, subfamília B, membro 1 (CYP27B1, *Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1*), também conhecida como 1- α -hidroxilase, para originar a 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)₂D3). Esta última é a forma biologicamente ativa, que interage com o receptor de vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*), o qual atua como fator de transcrição sobre co-reguladores e complexos de iniciação transcricional, regulando a expressão de diversos genes alvo e vias correlacionadas (EL-SHARKAWY; MALKI, 2020; TAGLIABUE; RAIMONDI; GANDINI, 2015; TEICHERT; BIKLE, 2010). Os efeitos pleiotrópicos relatados em função da vitamina D em diferentes contextos fisiológicos e patológicos puderam, então, ser explicados a partir da descoberta da expressão de VDR e da enzima CYP27B1, que não se limita a tecidos ósseos e se encontra também em células intestinais, prostáticas, pancreáticas e imunológicas (EL-SHARKAWY; MALKI, 2020).

Meta-análises de estudos do tipo *cohort* (coorte) ou de controle de caso, como os realizados por Ma *et al.* (2011) e Yin *et al.* (2011), encontraram risco relativo reduzido de CCR em grupos associados a alta ingestão de vitamina D ou a elevados níveis séricos de 25(OH)D. McCullough *et al.* (2003) e Freedman *et al.* (2007) observaram redução da incidência e recorrência de CCR associadas a vitamina D e cálcio.

Em contraponto às evidências positivas, um estudo concernente à ingestão de vitamina D e de ômega 3 não encontrou redução na incidência de câncer em mais de 25 mil participantes randomizados nos EUA, que receberam doses diárias de vitamina D3 ou placebo e foram acompanhados por 5,3 anos (MANSON *et al.*, 2019). Da mesma forma, atualização de meta-análise feita por Keum *et al.* (2019) para incluir testes

randomizados com maiores doses de suplementação de vitamina D encontrou redução apenas na mortalidade por câncer, não da incidência total. Os testes clínicos randomizados realizados, em geral, se apresentam falhos na execução, ou com amostragem insuficiente para evidências convincentes de tal correlação (BIKLE, 2014). Ainda, as evidências epidemiológicas não são causais, os testes controlados não-randomizados fornecem evidências fracas, e os mecanismos biológicos de tais efeitos ainda não foram elucidados (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; GORHAM *et al.*, 2005; TEICHERT; BIKLE, 2010; TAGLIABUE; RAIMONDI; GANDINI, 2015).

Estudos em animais, todavia, foram consistentes em demonstrar a associação com prevenção do desenvolvimento e/ou tratamento em variados modelos tumorais (BIKLE, 2014). Newmark *et al.* (2009) demonstraram o desenvolvimento espontâneo de CCR em camundongos com dieta pobre em cálcio e vitamina D, e sua inibição pela suplementação com ambos. Froicu *et al.* (2003) relataram o aumento da severidade inflamatória predisponente a CCR em ratos *knockout* para VDR. Murillo *et al.* (2013) demonstraram que lesões pré-neoplásicas em ratos expostos a agentes carcinogênicos podem ser parcialmente prevenidas pela administração de vitamina D ou seus metabólitos ativos, como também a proliferação de células HT-29, HCT-116 e Caco-2, linhagens tumorais colorretais.

Os mecanismos pelos quais a vitamina D oferece efeito protetivo contra formação tumoral têm sido estudados, contudo não foi possível encontrar uma única via de ação comum aos diversos tipos tumorais. Sabe-se que tal ação é iniciada pela heterodimerização do VDR com o receptor retinóide X (RXR), promovida pela interação da 1,25-dihidroxitetrahidrovitamina D₃. O heterodímero VDR/RXR é capaz de se ligar a sequências genômicas específicas, denominadas elementos responsivos a vitamina D (VDREs, *vitamin D response elements*), gerando locais de alta afinidade para coativadores transcricionais como os da família p160 de coativadores do receptor de esteróide, que atuam como histonas acetiltransferases, resultando em ativação ou repressão da transcrição de tais sequências ou genes próximos (CHRISTAKOS *et al.*, 2016).

Alguns alvos identificados incluem a via Wnt/ β -catenina (FERRER-MAYORGA *et al.*, 2019), a modificação do perfil de metilação do DNA (CASTELLANO-CASTILLO *et al.*, 2019), a regulação da resposta imune inata (CHEN *et al.*, 2014), ou ainda efeitos antiangiogênicos (CHUNG *et al.*, 2009), dentre outros mecanismos de redução da proliferação celular demonstrados em estudos *in vitro* ou *in vivo* com roedores

(CHRISTAKOS *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-SANCHO; LARRIBA; MUÑOZ, 2020). Por exemplo, a modulação de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*) pela 1,25-dihidroxitamina D, como também de seus inibidores p21 e p27, resulta em redução da atividade de CDKs, de maneira a promover a ligação do correpressor transcricional RB1 (*RB transcriptional corepressor 1*) ao fator de transcrição E2F1 (*E2F transcription factor 1*), e subsequente inibição da proliferação (CHRISTAKOS *et al.*, 2016). No caso do antagonismo à via Wnt/ β -catenina, a 1,25-dihidroxitamina D é capaz de elevar a expressão do gene codificante de E-caderina (*CDH1, cadherin 1*), resultando na realocação de β -catenina para fora do núcleo e consequente redução de sua atividade, além da limitação de motilidade celular essencial em processos metastáticos. Ainda, induz também a expressão do inibidor da via de sinalização WNT *dickkopf 1* (*DKK1, dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*), assim reduzindo a transcrição de genes alvo como *MYC*, oncogene regulador da progressão do ciclo celular (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-SANCHO; LARRIBA; MUÑOZ, 2020).

Vias inflamatórias, altamente relevantes na patogênese do câncer, também são moduladas pela 1,25-dihidroxitamina D, como na inibição do fator nuclear kappa B subunidade 1 (NF- κ B, *nuclear factor kappa B subunit 1*), o que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 8 (IL-8) e prejudica a angiogênese e a progressão tumoral colorretal. Outros tipos tumorais demonstram também a redução da enzima prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, também conhecida como COX2), responsável pela biossíntese de prostaglandinas, e aumento de hidroxiprostaglandina dehidrogenase 15 (HPGD, *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*), responsável por sua degradação (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; EL-SHARKAWY; MALKI, 2020). Tendo em vista que a 1,25-dihidroxitamina D modula a expressão de um grande número de genes codificantes de proteínas ou não, como miRNAs e lncRNAs, cada perfil celular apresenta diferentes vias influenciadas pela vitamina D com grande potencial para aplicação terapêutica ou preventiva (BIKLE, 2014).

A atividade abrangente da vitamina D sobre a homeostase intestinal inclui ainda a modulação da microbiota. Evidências clínicas e pré-clínicas, embora ainda limitadas, associam a inibição de VDR à redução de *Lactobacillus* spp. e ao aumento de Proteobacteria (BATTISTINI *et al.*, 2020; WATERHOUSE *et al.*, 2019), e a suplementação com 1,25-dihidroxitamina D ao aumento de gêneros como

Bifidobacterium, *Lachnospira*, *Bacteroides*, *Alistipes* e *Akkermansia*, dos filos Firmicutes e Actinobacteria (BELLERBA *et al.*, 2021), cujas relações com o CCR serão exploradas na próxima seção. Uma vez que bactérias não expressam VDR, infere-se uma ação indireta da vitamina D sobre o microbioma intestinal, primariamente por garantir níveis apropriados de muco e peptídeos antimicrobianos no epitélio intestinal, o que auxilia na manutenção do equilíbrio entre espécies probióticas e patogênicas (BATTISTINI *et al.*, 2020; FAKHOURY *et al.*, 2020).

2.2.2 Probióticos

A microbiota intestinal é uma parte integral dos processos de digestão humana, podendo originar nutrientes a partir de substratos que seriam de outras maneiras indigeríveis. Além disso, possui impacto sobre diversas funções metabólicas, influenciando a resposta imune e constituindo proteção contra organismos patogênicos (SHREINER; KAO; YOUNG, 2015). Estudos demonstram a influência até mesmo sobre os níveis de colesterol no sangue, na síntese de vitaminas e citocinas e nos processos de progressão do câncer, desempenhando papéis importantes na homeostase, tanto na saúde como na doença (DAY *et al.*, 2019; HE; SHI, 2017).

Um estudo metagenômico realizado por Feng *et al.* (2015) sobre o conteúdo fecal revelou que, comparando-se indivíduos com CCR a grupos de indivíduos saudáveis, há prevalência no primeiro de ingestão de carne vermelha sobre a de frutas e vegetais, e sugeriu que se trata de um importante fator de risco visto ser associado com o favorecimento de bactérias intestinais hostis. Isso é apoiado por diversas análises que indicam uma composição da microbiota diferente entre indivíduos com e sem câncer colorretal (CHEN *et al.*, 2012; AHN *et al.*, 2013; DOS REIS *et al.*, 2017). Dessa forma, infere-se que estratégias relacionadas à microbiota intestinal podem ser ferramentas úteis no manejo de CCR, e talvez estendidos à aplicação na prevenção (FENG *et al.*, 2015; DOS REIS *et al.*, 2017).

Múltiplos fatores contribuem para o estabelecimento da microbiota intestinal humana desde a infância à idade adulta, e a associação de sua composição a padrões saudáveis ou patológicos depende de um correto entendimento de suas variações individuais, de sua heterogeneidade ao longo do trato gastrointestinal e suas características (THURSBY; JUGE, 2017). Incluindo bactérias, *archaea* e microrganismos eucariotos, tal ecossistema no lúmen intestinal humano é composto majoritariamente por

bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. O filo Firmicutes conta com mais de 200 gêneros, como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*; o filo Bacteroidetes consiste predominantemente de gêneros como *Bacteroides* e *Prevotella*; o filo Actinobacteria, proporcionalmente menos abundante, é representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium*; e o filo Proteobacteria por espécies dos gêneros *Escherichia* e *Shigella*, dentre outros (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Apesar de ser modulada por diversos fatores, incluindo sobrepeso e obesidade, atividade física e padrão dietético, a composição da microbiota intestinal pode ser diretamente modificada pelo uso de probióticos (SONG; CHAN, 2019). Trata-se de culturas de uma ou mais espécies de microrganismos vivos intencionalmente administrados oralmente em quantidades adequadas, a fim de que possam exercer efeitos no cólon humano. Alguns efeitos diretos são o equilíbrio da população bacteriana no microambiente intestinal, a partir da inserção de filos comensais que competem com os grupos patogênicos ou prejudiciais, e a modulação da resposta imunogênica, conferindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro além da nutrição (HE; SHI, 2017; ZHENG *et al.*, 2019). Por estas razões, tem havido um interesse crescente na aplicação de probióticos como promotores de saúde, sendo atrativos como potencial complemento a tratamentos estabelecidos particularmente por seu baixo custo e por serem associados a poucos ou nenhum efeito adverso (DAY *et al.*, 2019; HENDLER; ZHANG, 2018).

Os probióticos são comercializados na forma de cápsulas ou pó, ou ainda em produtos fermentados, como iogurtes. As espécies mais comuns são as denominadas produtoras de ácido láctico, especialmente as do gênero *Lactobacillus* e do gênero *Bifidobacterium* (SANTOSA; FARNWORTH; JONES, 2006; HENDLER; ZHANG, 2018; DAY *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019). Sua administração em modelos animais é correlacionada à redução do número de lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas no cólon (AGAH *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2012; DEL CARMEN *et al.*, 2017; FOO *et al.*, 2011; IRECTA-NÁJERA *et al.*, 2017; LENOIR *et al.*, 2016; VERMA; SHUKLA, 2014), do número e volume de tumores colorretais (GHANAVATI *et al.*, 2020; TIPTIRI-KOURPETI *et al.*, 2016), e de parâmetros histológicos relacionados a inflamação (GHANAVATI *et al.*, 2020), como também ao aumento de proteínas apoptóticas (TIPTIRI-KOURPETI *et al.*, 2016; WALIA *et al.*, 2018) e de enzimas antioxidantes como glutathiona (GSH), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona-S-transferase (GST) (WALIA *et al.*, 2018). Estudos demonstram ainda que *L.*

gasseri é capaz de aumentar significativamente a proliferação de células macrofágicas RAW264.7 através de um aumento na síntese de DNA da fase S, que foi relacionado com a regulação positiva do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e ciclina A (FOO *et al.*, 2011). Além disso, uma investigação de Fahmy *et al.* (2019) com *B. longum* apontou efeitos modulatórios favoráveis sobre miRNAs oncogênicos e supressores de tumor, além de alterações no perfil de expressão de interleucinas.

Ainda que os benefícios desta suplementação sejam cada vez mais evidentes, os mecanismos pelos quais os probióticos exercem sua função não são ainda elucidados. No entanto, pesquisadores têm observado o envolvimento de metabólitos primários e secundários da fermentação bacteriana na iniciação e promoção do CCR, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, polissacarídeos, lipídeos, alcaloides, fenóis, antibióticos e ácidos-graxos de cadeia curta (SCFA, *short chain fatty acids*), dentre outros (SHUWEN *et al.*, 2019). Assim, estudos clínicos e *in vitro* sugerem como mecanismos potenciais da ação anticarcinogênica de probióticos a modificação da atividade metabólica da microbiota intestinal, através da síntese de substâncias antimicrobianas e alteração de pH, o que reduz o crescimento de bactérias patogênicas, como também a degradação de compostos carcinogênicos presentes no lúmen intestinal através de biotransformação, e a produção de compostos anticarcinogênicos e imunomoduladores (CHAKRABORTI, 2015; DOS REIS *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2018).

Nas linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal Caco-2, HT-29 e HCT-116, já foi reportado efeito de probióticos do gênero *Lactobacillus*, com inibição da atividade proliferativa e redução da capacidade invasiva desses tipos celulares, além de indução de morte celular por apoptose (ESCAMILLA; LANE; MAITIN, 2012; NOURI *et al.*, 2016; SADEGHI-ALIABADI *et al.*, 2014; TIPTIRI-KOURPETI *et al.*, 2016). Em estudos clínicos, foi verificada contribuição ao status antioxidativo dos pacientes em decorrência de suplementação com probióticos, além de redução de marcadores inflamatórios e aumento da presença de SCFAs como os ácidos butírico, propiônico e acético, que possuem efeitos antiproliferativos e sugerem ação direta sobre a prevenção da carcinogênese colorretal (OHARA; SUZUTANI, 2018; ZAHARUDDIN *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019).

O ácido butírico, principal SCFA produzido pelas espécies probióticas mais comuns, exerce efeito inibitório sobre histona-desacetilase (HDAC) que resulta em redução da proliferação celular e indução de apoptose e necrose, e é relacionado ao aumento dos níveis do inibidor de quinase ciclina dependente 1A (CDKN1A, *cyclin*

dependent kinase inhibitor 1A, ou P21) e redução de MYC e ciclina D1, os quais tem papéis fundamentais na progressão do CCR (FARROKHI *et al.*, 2020). Em conjunto com o ácido propiônico, o ácido butírico também é capaz de elevar a expressão de mucina (MUC2, *mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming*), importante para a manutenção da barreira epitelial intestinal, e regulação de componentes imunomoduladores, como o fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), FOXP3 (*forkhead box P3*), NF- κ B e outros (BHAT; KAPILA, 2017; ESLAMI *et al.*, 2019). Tendo em vista a posição da inflamação como *hallmark* do câncer e da relevância de doenças inflamatórias como fator de risco para CCR (DEKKER *et al.*, 2019), tais propriedades representam grande potencial no uso de probióticos em diversas fases da carcinogênese.

3 JUSTIFICATIVA

A incidência mundial do câncer em geral e em especial do CCR tem mostrado tendências crescentes, o que está claramente correlacionado a fatores como estilo de vida e consumo de produtos alimentícios prejudiciais. Ainda, os agentes quimioterápicos conhecidos e empregados na linha de frente das terapias clássicas acarretam, muitas vezes, efeitos tóxicos que comprometem o bem-estar do paciente, ou encontram resistência por mecanismos ainda pouco compreendidos. Associado ao longo tempo decorrido da iniciação da carcinogênese até o diagnóstico, o que em geral resulta quadros avançados e com prognóstico desfavorável, esses fatos culminam em uma baixa eficácia da intervenção terapêutica.

Dessa forma, ao passo que as alterações genéticas envolvidas na iniciação e progressão do CCR estejam se tornando bem conhecidas, a necessidade de novas estratégias para o tratamento e prevenção se tornam cada vez mais emergentes. Nesse aspecto, destacam-se a aplicação de suplementos clássicos que possam ser aplicados na terapêutica, de forma isolada ou combinada às abordagens convencionais, como também compostos com potencial quimiopreventivo, visto que podem atuar no bloqueio ou na prevenção do desenvolvimento do câncer em suas diferentes etapas do desenvolvimento.

Diversos estudos sugerem uma correlação inversa entre os níveis de vitamina D e o risco de câncer colorretal (MA *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2011; BIKLE, 2014), e, mesmo sem evidências suficientes para afirmar ser esta uma correlação causal, estudos em animais corroboram a associação entre a suplementação com vitamina D e a prevenção ou terapêutica em variados modelos tumorais. De maneira similar, trabalhos recentes demonstram o efeito protetor da suplementação com probióticos sobre a carcinogênese colorretal (FOO *et al.*, 2011; IRECTA-NÁJERA *et al.*, 2017;).

Em ambas as estratégias investigadas, alguns mecanismos moleculares antitumorais são sugeridos pela literatura, porém não foram completamente elucidados, e são raros os estudos de sua combinação ou sua aplicação em diferentes etapas da carcinogênese colorretal. Ainda, o custo da suplementação com probióticos e vitamina D é relativamente baixo e de fácil acesso, o que sustenta um dos pilares da quimioprevenção. Neste sentido, o presente estudo visa a abordagem de novas estratégias terapêuticas e/ou quimiopreventivas envolvendo a vitamina D3 e microrganismos probióticos, buscando expandir a compreensão sobre seus efeitos e sua aplicabilidade. Tais estratégias podem

trazer vantagens diversas no âmbito da saúde, uma vez que já se encontram integrados na prática clínica, de forma a não trazerem efeitos adversos tóxicos para o paciente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do tratamento com vitamina D3 e probióticos na carcinogênese colorretal em tratamentos isolados e combinados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) investigar o efeito *in vitro* do tratamento com vitamina D3 e probióticos sobre a proliferação celular na linhagem de adenocarcinoma colorretal humano (HCT-8):
 - de maneira isolada e combinada;
 - combinada à quimioterapêutica clássica
- b) avaliar a possível seletividade dos tratamentos em linhagem normal de queratinócitos (HaCat);
- c) avaliar a segurança dos tratamentos quanto ao possível efeito carcinogênico e de toxicidade;
- d) avaliar o possível efeito quimiopreventivo dos tratamentos de maneira isolada e combinada em cólon de ratos Wistar utilizando diferentes abordagens de tratamento: pré, pós e tratamento simultâneo;
- e) determinar o microbioma fecal dos animais a fim de correlacionar os efeitos obtidos e os filos de microorganismos presentes em cada tratamento;
- f) quantificar parâmetros bioquímicos a fim de estabelecer correlação com o possível efeito quimiopreventivo e/ou carcinogênico;
- g) estudar os mecanismos moleculares que possam estar correlacionados aos efeitos obtidos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DA VITAMINA D E PROBIÓTICOS

Tendo em vista os objetivos deste trabalho, foram utilizados um modelo celular (*in vitro*) e um modelo animal (*in vivo*), descritos nas seções a seguir. Em ambos, foram aplicadas fórmulas comerciais de vitamina D3 e de probióticos das espécies *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri*, com o intuito de mimetizar as condições de aplicação na prática clínica. A vitamina D foi obtida em cápsulas de 500 Unidades Internacionais (UI), a partir das recomendações mínimas diárias do *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (HOLICK *et al.*, 2011). Os probióticos foram obtidos em cápsulas de 10⁹ Unidades Formadoras de Colônia (UFC), também de acordo com as recomendações mais comuns para a população em geral (GUARNER *et al.*, 2017). O conteúdo das cápsulas foi então solubilizado conforme especificações de cada ensaio, de maneira estéril, a fim de atingir as concentrações descritas a seguir.

5.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

5.2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal ileocecal humano HCT-8 e a linhagem normal de queratinócitos humanos HaCat. Ambas as linhagens foram gentilmente cedidas pela Professora Marisa Ionta, do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), MG.

As células encontravam-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1 x 10⁶ células/mL em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich), 40% de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich).

Para a realização dos experimentos as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,06 g/mL penicilina (Sigma-Aldrich). As linhagens foram cultivadas em monocamada em 5 mL de meio de cultura utilizando-se frascos descartáveis de 25 cm² de área (Corning) a 36,5°C em estufa de CO₂

(Sanyo). Para a realização dos ensaios, as células foram utilizadas a partir do 4º sub-cultivo com 70% de confluência celular.

5.2.2 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados de maneira isolada e combinada por 48 horas e adicionados ao meio de cultivo em concentrações de $2,44 \times 10^5$ a $3,13 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) para os probióticos e de 0,61 a 78,125 Unidades Internacionais (UI) para vitamina D. As faixas de concentração foram definidas com base em dados da literatura (NOURI *et al.*, 2016; TIPTIRI-KOURPETI *et al.*, 2016) e em experimentos preliminares de citotoxicidade em concentrações maiores do que as convencionais.

Adicionalmente, foi realizada a combinação da vitamina D, nas mesmas condições e concentrações acima descritas, com clássicos quimioterápicos entre eles a doxorrubicina (12,0 a 0,09 μM), o 5-fluorouracil (16,0 a 0,13 μM) e a cisplatina (16,0 a 0,13 μM). As faixas de concentração utilizadas foram definidas com base em dados da literatura (ABDELGHANY *et al.*, 2021; PILLOZZI *et al.*, 2018; PIOTROWSKA *et al.*, 2019).

5.2.3 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Para os experimentos, foram semeadas 1×10^4 células de cada uma das linhagens (HCT-8 e HaCat) em 100 μL de meio DMEM suplementado com 10% SFB, em placas de 96 poços de fundo plano. Após 24 horas, foram adicionados os diferentes tratamentos conforme anteriormente descritos e mantidos por 48 horas em estufa de CO_2 . Após o período de tratamento, o meio foi removido e 100 μL de MTT foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C , protegida da luz direta. Após esse período, o MTT foi retirado do poço e adicionado 100 μL de DMSO para a solubilização dos cristais. A absorbância foi medida em leitor multiplacas (Zenyth 200rt) em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular. Para tanto, as células do controle negativo (sem tratamento) foram utilizadas como o correspondente a 100% de sobrevivência. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida

pelo teste de Tukey, utilizando-se o *software* GraphPad Prism® versão 8.2.2. Com o *software* CalcuSyn® (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA) versão 2.0 foi realizada análise de regressão não-linear, resultando em uma equação usada para calcular a concentração necessária para produzir 50% de redução de viabilidade celular (IC₅₀) e testar a hipótese de efeito sinérgico das combinações.

5.2.3.1 Avaliação do sinergismo

A potencialidade das combinações de tratamentos investigadas neste trabalho pôde ser avaliada pelo método do índice de combinação (CI, do inglês *combination index*), baseado na equação do efeito médio (no caso, o IC₅₀) desenvolvida por Ting-Chao Chou a partir da lei de ação das massas e outros parâmetros, também conhecido como o método de Chou-Talalay (PEDREIRO, 2018).

Foi utilizado o software CalcuSyn®, onde se obteve o CI através da Equação 1, abaixo apresentada, que permite descrever a ocorrência de sinergismo, efeito aditivo e antagonismo para cada ponto de combinação. A partir desse cálculo, valores de CI = 1 indicam efeito aditivo, ou seja, que o efeito do tratamento combinado é igual à soma dos efeitos obtidos isoladamente. Assim, valores de CI < 1 indicam efeito sinérgico, em que a associação dos tratamentos alcança efeitos maiores do que a soma de suas aplicações isoladas, enquanto valores de CI > 1 indicam o oposto, denominado antagonismo (BAHRI *et al.*, 2019).

Equação 1

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$$

Fonte: CHOU; TALALAY (1984)

Legenda: CI: índice de combinação; (D)1: dose da molécula 1; (Dx)1: dose da molécula 1 que inibe fração “x” de células; (D)2: dose da molécula 2; (Dx)2: dose da molécula 2 que inibe fração “x” de células.

Os resultados podem ser descritos e interpretados de acordo com a Tabela 1, cujos intervalos foram refinados a partir dos dados descritos primariamente pela equação.

Tabela 1 – Símbolos e descrição de efeito sinérgico ou antagônico em estudos de combinação analisados com o método de Chou-Talalay.

Valor de CI	Descrição	Sigla	Cor
<0,1	Sinergismo muito forte	SMF	Amarelo
0,1 a 0,3	Sinergismo forte	SF	
0,3 a 0,7	Sinergismo	S	
0,7 a 0,85	Sinergismo moderado	SM	
0,85 a 0,9	Sinergismo leve	SL	
0,9 a 1,10	Perto de efeito aditivo	P	
1,10 a 1,20	Antagonismo leve	AL	Verde
1,20 a 1,45	Antagonismo moderado	AM	
1,45 a 3,3	Antagonismo	A	
3,3 a 10	Antagonismo forte	AF	
>10	Antagonismo muito forte	AMF	

Fonte: adaptado de CHOU (2008)

Legenda: CI: índice de combinação.

5.3 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

5.3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, espécie *Ratus norvegicus*, machos, com média de 200g peso corpóreo (p.c.). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, e permaneceram em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. O protocolo de tratamento realizado neste trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (0008/2020, Anexo A). Cada grupo de tratamento consistiu de oito animais. O peso corpóreo dos animais foi medido no primeiro e no último dia do período experimental, e o consumo de água diariamente.

5.3.2 Determinação das doses a serem testadas

As diferentes doses de vitamina D3 e dos probióticos foram determinadas a partir de ensaios pilotos utilizando o mesmo modelo experimental, bem como a partir de dados da literatura que abordam experimentos semelhantes já realizados (FOO *et al.*, 2011;

IRECTA-NÁJERA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2015; LIBOREDO *et al.*, 2013; REFAAT *et al.*, 2015; SHARAF *et al.*, 2018; WALIA *et al.*, 2018).

O teste inicial para a determinação das doses utilizou 2 animais por grupo e tomou como base as recomendações diárias para a população em geral e para população de risco para deficiência (MAEDA *et al.*, 2014). Foram realizados ensaios pilotos (Apêndice A) nas três diferentes abordagens (pré, pós e tratamento simultâneo), nas mesmas condições experimentais do modelo final, com a vitamina D3 diluída em óleo vegetal a 10% e administrada em 3 doses (2000, 1000 e 500 UI) e com os probióticos diluídos em água destilada, também em 3 doses (1×10^9 , 1×10^8 e 1×10^7 UFC) para a verificação da dose que apresentaria melhor efeito protetor, ou seja, que seria capaz de reduzir os danos causados pela indução de lesões colorretais com carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH). O solvente oleoso foi utilizado uma vez que, por ser lipofílica, a absorção da vitamina D é dependente da presença de lipídeos no intestino, e portanto sua biodisponibilidade é aumentada em veículos oleosos (GLOWKA; STASIAK; LULEK, 2019). Em seguida, as doses que se mostraram mais efetivas isoladamente foram combinadas (Vitamina D + Mix de probióticos) utilizando as diferentes abordagens: tratamento simultâneo as doses de 250 e 2000 UI de vitamina D foram combinadas à dose de 10^7 UFC de probióticos; no pré-tratamento, a dose de 250 UI de vitamina D foi combinada a 10^7 UFC de probióticos; e no pós-tratamento, a dose de 2000 UI de vitamina D foi combinada a 10^7 UFC de probióticos.

5.3.3 Tratamento

O carcinógeno genotóxico 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 160 mg/kg de peso corpóreo (p.c.), Sigma-Aldrich) (AGNER *et al.*, 2005) foi dissolvido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 1 mM) e utilizado como indutor lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos Wistar. A aplicação do DMH foi realizada por injeção subcutânea (s.c), no dorso dos animais, em quatro doses de 40 mg/kg p.c., em uma dose final de 160 mg/kg p.c., sendo administrado sempre no segundo dia da semana (Figura 1). O período de tratamento para avaliação do efeito na carcinogênese colônica teve duração total de 12 (doze) semanas, incluindo 4 semanas após a última administração de DMH que, de acordo com Rodrigues *et al.*, (2002) é um período suficiente para a observação da formação dos focos de criptas aberrantes (FCA). A administração de vitamina D3 e/ou probióticos nas diferentes doses foi realizada via gavagem no volume

ação quimiopreventiva: tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento (Figura 1). Respectivamente, cada abordagem incluiu G7, G11 e G15) controle solvente associado (DMH, 160 mg/kg p.c., 0,3 mL, s.c., e óleo vegetal 10% em água, 1,0 mL, gavagem), G8, G12 e G16) Vitamina D + DMH; G9, G13 e G17) Probiótico + DMH, G10, G14 e G18) Vitamina D + Probiótico + DMH. Todos os grupos consistiram de 8 animais.

5.3.4 Coleta de amostras

No primeiro dia da 13ª semana, os animais foram anestesiados com 1,0 mL de Tiopentax® (tiopental sódico, 40 mg/kg p.c., intraperitoneal (i.p.); Cristália) e foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para posterior avaliação bioquímica. Em seguida, quando necessário, foi realizada a administração de 0,5 mL de Tiopentax® (140 mg/kg p.c.; i.p.) para a eutanásia.

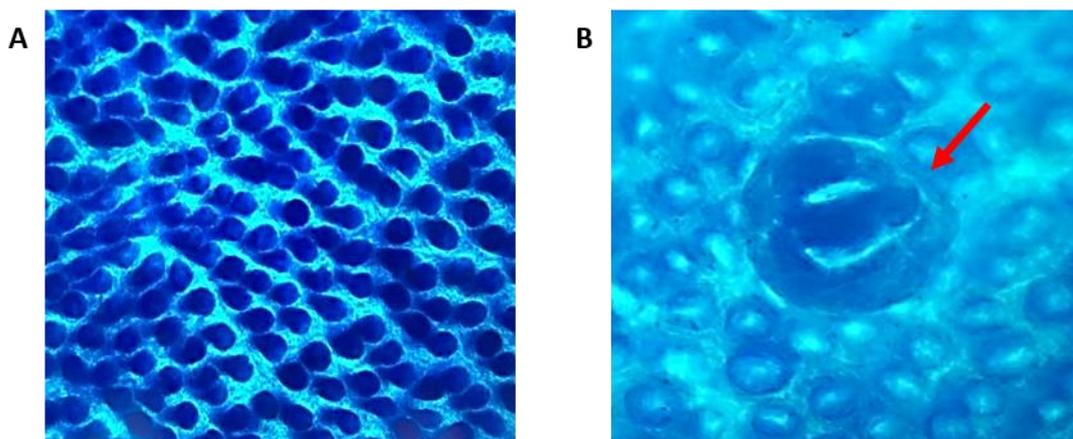
Após laparotomia, o fígado foi coletado e armazenado em meio de Merchant (0,14M NaCl, 1,47mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 10mM Na₂EDTA, pH 7,4) a -80°C, conforme Azqueta *et al.* (2019), para propostas futuras de análise da genotoxicidade e atividade antioxidante. Em seguida, uma porção de fezes de cada animal foi coletada assepticamente, em tubo estéril para avaliação da composição da microbiota fecal. Na região do cólon distal, duas pequenas porções foram coletadas, uma para análise da expressão gênica (armazenada em trizol a -80°C) e outra para imunohistoquímica (armazenada em formalina tamponada e, após 24 horas, em álcool 70%). Por fim, os cólons foram excisados, abertos longitudinalmente, lavados com salina 0,9% para remoção das fezes, presos em placas de isopor por meio de alfinetes e fixados com solução de formaldeído (10%) durante 24 h e posteriormente, mantidos em álcool 70% até a completa análise do material.

5.3.5 Avaliação das lesões pré-neoplásicas

Os procedimentos para a análise histológica do cólon foram realizados de acordo com o descrito por Oliveira *et al.* (2021). Os cólons fixados foram corados com solução de azul de metileno (0,02%) por 10 minutos (Figura 2A) e colocados sobre uma lâmina de microscopia com a parte interna da mucosa voltada para cima para a visualização dos FCA, em microscopia óptica com amplificação de 40x. Foi realizada a contagem de 50

campos sequenciais em cada segmento do cólon distal, sendo os FCA caracterizados pela espessa camada epitelial que se cora mais intensamente com azul de metileno, abertura luminal alongada, tortuosa e maior em relação às criptas normais circunvizinhas (Figura 2B) (BIRD, 1987). Foram contabilizados o número de FCA e as criptas aberrantes (CA). A multiplicidade de criptas foi expressa pela razão de criptas aberrantes por foco (CA/FCA).

Figura 2 – Fotomicrografias da porção distal do cólon de ratos Wistar



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: Imagens microscópicas da porção distal do cólon de ratos Wistar, corado com azul de metileno, mostrando (A) padrão histológico normal (aumento de 10x) e (B) um foco com duas criptas aberrantes (seta vermelha, aumento de 40x).

5.3.6 Análise da microbiota fecal

O DNA total foi extraído de amostras fecais dos grupos controle negativo (sem tratamento), controle solvente (óleo vegetal 10%), controle positivo (DMH 160 mg/kg p.c.), Vitamina D (2000 UI) + DMH e Probióticos (10^7 UFC) + DMH, estes últimos em tratamento simultâneo, usando o kit de extração QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os pelets de fezes foram ressuspensos em solução salina estéril e, para evitar qualquer efeito inibitório, o tampão InhibitEX foi adicionado antes da extração do DNA. O DNA total, obtido usando a coluna de rotação QIAamp, foi quantificado pelo Fluorômetro Invitrogen Qubit (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA). 100ng de DNA total foi usado para analisar os genes do RNA ribossômico (rRNA 16S) usando a Plataforma Illumina HiSeq. Além disso, *16SrRNA*, *18SrRNA* e genes ITS (*Internal transcribed spacer*) de nove regiões distintas (*16SV4*, *16SV3*, *16SV3-V4*, *16SV4-V5*, *18S V4*, *18S V9*, *ITS1*, *ITS2* e *Arc V4*) foram amplificados utilizando

iniciadores específicos (por exemplo, par *16SV4*: 515F-806R, *18SV4*: 528F-706R, *18SV9*: 1380F-1510R). As reações de PCR foram executadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA). Produtos de PCR entre 400 e 450 bp foram misturados em razões de equidensidade e purificados com um Kit de Extração de Gel Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemanha). Bibliotecas de sequenciamento foram definidas usando o kit NEBNext® Pré-kit Ultra™ DNA Library para Illumina, de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade da biblioteca foi verificada no Qubit Fluorômetro (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA) e no Sistema Agilent Bioanalyzer 2100. O amplicon foi sequenciado em Plataforma emparelhada Illumina para gerar leituras brutas emparelhadas de 250 bp (PE bruto) que foram montadas e pré-tratadas para obter *Tags* Limpos a partir da exclusão de sequências quiméricas. As sequências metagenômicas foram analisadas no software Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>). As OTUs (*Operational Taxonomic Units*) foram reunidas com base nas sequências que apresentavam similaridade $\geq 97\%$. Para classificá-los em um grupo taxonômico, o banco de dados GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) foi usado com base no uso de algoritmos de classificação pelo classificador RDP (versão 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>). O alinhamento de sequências múltiplas foi realizado pelo software MUSCLE (versão 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) para determinar a relação filogenética entre OTUs, juntamente com suas espécies dominantes, em diferentes amostras da microbiota fecal.

5.3.7 Avaliação bioquímica

As amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca após anestesia conforme anteriormente descrito, em tubo livre de anticoagulante. Foram coletados no mínimo 4,0 mL de sangue, que foram em seguida centrifugados a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos para a obtenção do soro onde os níveis séricos de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) foram avaliados pelos kits de reagentes bioquímicos Ureia UV Liquiform (ref. 104), Creatinina K (ref. 96), Transaminase oxalacética (ref. 52), Transaminase pirúvica (ref. 53), respectivamente, adquiridos da Labtest Diagnóstico SA, sendo as dosagens realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os procedimentos de medição foram feitos por meio do analisador automático bioquímico RA-XT (Technicon).

5.3.8 Ensaio imunohistoquímico

O tecido colorretal coletado foi fixado em formalina e, em seguida, incluído em parafina, e então foram realizados cortes histológicos de 3-4 μm de espessura. Os cortes foram desparafinizados no dia anterior à realização da técnica em temperatura de 60°C por 1 hora, associada a três banhos de xilol (15 minutos cada), seguidas de dois banhos em álcool etílico (100 e 70%, 15 minutos cada). Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica através da imersão das lâminas em tampão citrato, em panela de pressão, por 3 min.

A fim de se reduzir a marcação inespecífica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 15 min. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com a incubação por 10 min em solução de leite desnatado a 5%. Esta solução foi preparada em TBST (*Tris-Buffered Saline Tween 20*) em pH 7,6.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas *overnight* em câmara úmida na geladeira com os seguintes anticorpos primários anti-NRF2 (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab137550; policlonal): diluição 1:200, anti- β -catenina (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab32572; monoclonal): diluição 1:1000, anti-PCNA (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab29; monoclonal): diluição 1:2000 e anti-COX2 (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab15191; policlonal): diluição 1:1000.

No dia seguinte, realizou-se a incubação dos cortes com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabras conjugado com peroxidase Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP (Agilent, Santa Clara, CA, USA) por 1 hora. Após esse período, os cortes foram corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; 0,5%) por 5 minutos, e contracorados por 15 segundos com hematoxilina filtrada (100%).

A determinação semi-quantitativa da expressão proteica foi avaliada utilizando o software ImageJ Fiji® (versão 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD), conforme descrito por Crowe e Yue (2019).

5.3.9 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica de alvos envolvidos na tumorigênese colônica foi realizada pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR, *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction*). Foram avaliados um marcador de

estresse oxidativo (*NOS2*) e um para enzima de atividade antioxidante endógena (*GST*), além do gene constitutivo (β -actina). Na Tabela 2 é possível encontrar um resumo das informações sobre os *primers* utilizados e respectivos genes alvo.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR.

Gene	Mecanismo	Oligonucleotídeo iniciador	Tamanho (pb)
<i>ACTB</i>	Constitutivo (β -actina)	S: AGCCATGTACGTAGCCATCC	115
		AS: ACCCTCATAGATGGGCACAG	
<i>NOS2</i>	Enzima envolvida em vias inflamatórias, responsável pela síntese de óxido nítrico ¹	S: ACCATGGAGCATCCCAAGTA	60
		AS: CAGCGCATACCACTTCAGC	
<i>GST</i>	Enzima envolvida na detoxificação celular de compostos eletrofílicos ²	S: GGAGGAGGTGGTTACCATAGA AS: GGTGAGGTCTCCATCTTCAAAC	97

Fonte: Do autor (2022), ¹ KIM; PARK (2010); ² TONELLI; CHIO; TUVESON (2018)

Legenda: pb: pares de bases, S: *sense* (forward primer); AS: *antisense* (reverse primer); pb: pares de base; *ACTB*: β -actin; *NOS2*: nitric oxide synthase 2, *GST*: Glutathione S-transferase.

A porção distal do tecido colorretal foi armazenada em solução de trizol a -80°C , e submetida ao procedimento de extração de RNA total. A quantificação do RNA total foi avaliada por leitura espectrofotométrica utilizando o NanoDrop® ND1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*). Em seguida, foi realizada a incubação do RNA total com DNase, por 15 min em termociclador a 37°C , a fim de se eliminar possível contaminação com DNA genômico. Feito isso, o RNA total foi, então, submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *Randon primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (*Applied Biosystems, São Paulo, Brasil*), conforme as instruções do fabricante. Todos os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e então, 85°C por 5 min para promover a inativação da enzima.

A expressão dos genes alvo foi investigada utilizando o sistema *Power Sybr®Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, 191 Brasil*) no *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil*). Todas as reações foram efetuadas obtendo-se um volume final de 25 μl e os genes foram amplificados seguindo as seguintes condições experimentais: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturaç

a 95°C por 10 segundos, seguido pelo anelamento a 60°C e extensão por 1 min (40 ciclos). A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi feita utilizando a expressão do gene constitutivo *ACTB* (β -actin). O método $\Delta\Delta$ Ct com correção da eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene. Uma amostra controle foi usada como calibradora (PFAFFL, 2001).

Os valores médios de eficiência para cada gene foram mensurados através do perfil de amplificação de cada amostra, através do auxílio do programa LinRegPCR, conforme as recomendações de Ramakers *et al.* (2003).

5.3.10 Análise estatística

Os dados dos ensaios *in vivo* foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way* ANOVA) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*p-value*”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 8.2.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

6.1.1 Probióticos

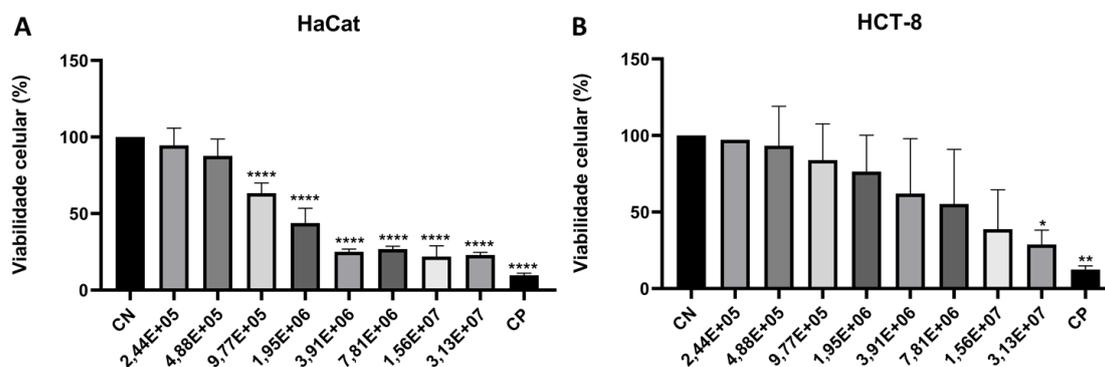
Utilizando formas disponíveis comercialmente de probióticos das espécies *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri*, foi realizado um *screening* em ampla faixa de concentrações para avaliar o potencial citotóxico dos tratamentos. Visto que não se trata de cultura direta, foi necessário adaptar a solubilização do conteúdo obtido em cápsulas, comumente recomendadas para a população geral em torno de 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (GUARNER *et al.*, 2017), de maneira viável no meio de cultura utilizado para as linhagens celulares, o que resultou em testes na faixa de $2,44 \times 10^5$ a $3,13 \times 10^7$ UFC/mL.

As Figura 3 e 4 apresentam, respectivamente, os resultados da atividade antiproliferativa das espécies *B. bifidum* e *L. gasseri*, avaliadas em modelo de tratamento isolado nas linhagens de queratinócitos (HaCat, normal) e adenocarcinoma colorretal (HCT-8).

De modo geral, foi possível observar uma redução dose-dependente da viabilidade celular em todos os tratamentos e em ambas as linhagens avaliadas. Para os probióticos da espécie *B. bifidum*, um efeito citotóxico significativo sobre a linhagem normal HaCat foi observado a partir de $9,77 \times 10^5$ UFC/mL, enquanto na linhagem tumoral HCT-8, a redução na viabilidade celular é observada apenas em $3,13 \times 10^7$ UFC/mL, indicando maior sensibilidade ao tratamento por parte das células não-transformadas do que pelas células tumorais. Faghfoori *et al.* (2021) demonstraram que a viabilidade celular das linhagens HT-29 e Caco-2, ambas de câncer de cólon humano, também foi reduzida após tratamento com sobrenadante livre de células (CFS, *cell free supernatant*) proveniente de cultura de *Bifidobacterium* spp. em concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, com inibição de 40 a 60% da proliferação celular. Efeito semelhante foi observado por Bahmani, Azarpira e Moazamian (2019) sobre células SW742 de câncer de cólon humano, também com sobrenadante de *Bifidobacterium* spp. No entanto, o modelo utilizado neste estudo indica que *B. bifidum*, individualmente, pode não ser interessante para aplicação no contexto

colorretal, levando em conta seu maior efeito citotóxico em células normais se comparado às células tumorais aqui avaliadas.

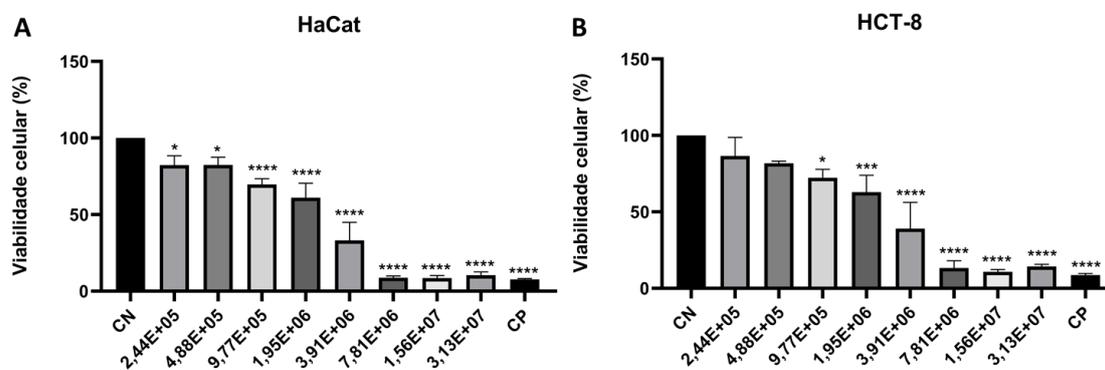
Figura 3 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) de *Bifidobacterium bifidum*.



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia.

Figura 4 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) de *Lactobacillus gasseri*



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia.

Para a espécie *L. gasseri*, constatou-se efeito de redução da viabilidade celular da linhagem HaCat a partir de $2,44 \times 10^5$ UFC/mL, e na linhagem HCT-8 a partir de $9,77 \times 10^5$ UFC/mL, indicando efeito semelhante do tratamento em ambas as linhagens devido às grandezas próximas de tais concentrações. Foi demonstrado por Tiptiri-Kourpeti *et al.* (2016) após administração de probióticos do gênero *Lactobacillus* à linhagem de câncer

de cólon humano HT-29 por 48 h, em que 10^8 e 10^9 UFC/mL foram capazes de inibir a proliferação celular em 80 a 90%. Estudos que utilizam o sobrenadante, meio de cultura ou componentes de espécies probióticas também demonstram efeito antiproliferativo sobre linhagens celulares de câncer de cólon. Dentre estes, o efeito de 400 µg/ml do exopolissacarídeo de *Lactobacillus* spp. sobre a linhagem HT-29 após tratamento por 48h, que levou a redução de 20 a 25% na viabilidade celular (TUKENMEZ *et al.*, 2019). Ainda, a redução dose-dependente da viabilidade celular resultante de tratamento por 24h com 200 a 700 µL/mL de CFS de *Lactobacillus* spp. sobre a linhagem HT-29 (CHEN *et al.*, 2017) e 20 a 80% de CFS sobre Caco-2 (ISAZADEH *et al.*, 2021; YUE *et al.*, 2020) também já foi descrita.

No entanto, os resultados aqui apresentados permitem inferir a ausência de efeito seletivo dos tratamentos com ambas as espécies, uma vez que a linhagem não-transformada se mostra tão sensível ao tratamento com *L. gasseri* quanto a linhagem tumoral, e sensível a menores concentrações de *B. bifidum* do que a linhagem tumoral. Resultado compatível ao acima descrito foi observado por Parisa *et al.* (2020), uma vez que a aplicação de espécies isoladas ou coquetéis de estirpes do gênero *Lactobacillus* ou do gênero *Bifidobacterium*, separadamente, por 24 h, acarretou em redução da proliferação celular equivalente na linhagem LS174T de adenocarcinoma colônico humano e na linhagem não-transformada IEC-18 de epitélio intestinal de ratos.

Diferente dos resultados obtidos nos experimentos aqui descritos, os achados da literatura provém de diversas outras metodologias de tratamento, onde o sobrenadante, meio de cultura ou componentes de espécies probióticas são diretamente testadas nas culturas celulares (CHOI *et al.*, 2006; FOO *et al.*, 2011; MOTEVASELI *et al.*, 2013; NOURI *et al.*, 2016; SADEGHI-ALIABADI *et al.*, 2014). A ideia deste trabalho, por sua vez, foi utilizar a mesma forma de consumo humano para investigar seu efeito. Além disso, poucos trabalhos com probióticos na literatura avaliam seu efeito levando em conta estudos de seletividade, em que a comparação da atividade entre uma linhagem normal *versus* transformada é realizada.

No tocante às vias pelas quais os probióticos causam citotoxicidade, muitos estudos indicam a modulação de vias apoptóticas como mecanismo de ação, baseado no aumento da expressão de genes como o da proteína mitocondrial ligante de proteína inibidora de apoptose (*DIABLO*, *diablo IAP-binding mitochondrial protein*), da caspase-3, -8 e -9 (*CASP3*, *CASP8* e *CASP9*, respectivamente), do agonista de morte celular associado a *BCL2* (*BAD*, *BCL2 associated agonist of cell death*), do regulador de

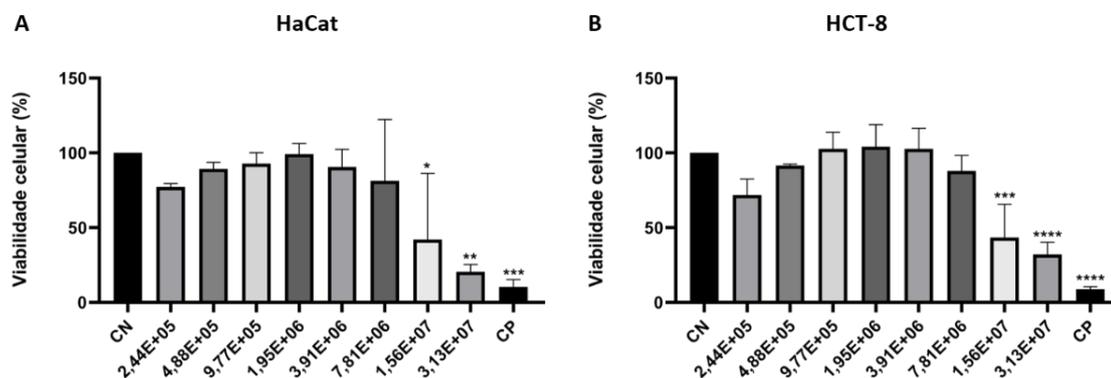
apoptose X associado a BCL2 (*BAX, BCL2 associated X, apoptosis regulator*) e do receptor de morte de superfície celular Fas (*FAS, Fas cell surface death receptor*), como também na redução do regulador de apoptose BCL2 (*BCL2*) e da survivina (*BIRC5, baculoviral IAP repeat containing 5*) nas linhagens HT-29 e Caco-2 após tratamento com sobrenadantes de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (FAGHFOORI *et al.*, 2021; ISAZADEH *et al.*, 2021; TUKENMEZ *et al.*, 2019). O tratamento com culturas de *B. bifidum*, particularmente, foi demonstrado por Faghfoori *et al.* (2021) como capaz de induzir apoptose em aproximadamente 53% da população celular de HT-29 e 79% de Caco-2, ao passo que a porcentagem de apoptose na linhagem epitelial normal humana KDR/293 teve seu máximo em cerca de 26% segundo o mesmo estudo. Em tratamentos com componentes isolados de *Lactobacillus* spp, a indução de apoptose foi relatada por Tukenmez *et al.* (2019) entre 33 e 41% sobre HT-29 após 48 h de tratamento.

Considerando que, na maioria das vezes, a prescrição probiótica é baseada em uma combinação de espécies, foi realizado também ensaio de proliferação celular para avaliar o efeito do *mix* de probióticos de ambas as espécies *B. bifidum* e *L. gasseri*. Para isso foram somadas as concentrações dos tratamentos isolados, resultando na faixa de $2,44 \times 10^5$ a $3,13 \times 10^7$ UFC/mL de cada espécie em cada ponto da faixa experimental.

A hipótese para realização da combinação era se, quando combinadas as espécies, a seletividade não observada isoladamente poderia ser instigada e/ou se o efeito citotóxico seria mais pronunciado. Foi observada redução estatisticamente significativa na viabilidade celular nas duas maiores concentrações testadas ($1,56 \times 10^7$ e $3,13 \times 10^7$ UFC/mL) para ambas linhagens avaliadas (Figura 5), indicando redução do efeito citotóxico se comparado ao tratamento com as espécies isoladas.

O IC₅₀ calculado para os tratamentos isolados e combinados é apresentado na Tabela 3. Nota-se que, no tratamento com *B. bifidum* isoladamente, o valor de IC₅₀ se manteve semelhante tanto para a linhagem HCT-8 como para a linhagem normal de queratinócitos Hacat, enquanto no tratamento com *L. gasseri* o valor de IC₅₀ é maior na linhagem HCT-8 do que na linhagem HaCat. Isso confirma a ausência de seletividade inferida a partir dos dados de viabilidade celular (Figuras 4 e 5), uma vez que se mostra necessária maior concentração de *L. gasseri* para reduzir a viabilidade de HCT-8 em 50% do que o necessário para o mesmo efeito em HaCat, como também se entende um efeito citotóxico equivalente de *B. bifidum* em ambos os tipos celulares.

Figura 5 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UFC/mL) do mix de probióticos



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia, Mix de probióticos: *B. bifidum* combinado a *L. gasseri*.

Já no tratamento com o *mix* de probióticos (*B. bifidum* combinado ao *L. gasseri*), houve uma diferença da concentração requerida para reduzir a proliferação em 50%: uma maior concentração do mix de probióticos é necessária para produzir citotoxicidade na linhagem normal testada, em comparação à linhagem tumoral HCT-8 (Tabela 3), apontando para a seletividade de seu efeito. Similarmente, Parisa *et al.* (2020) relataram, a partir de tratamento com coquetel incluindo tanto estirpes do gênero *Lactobacillus* como do gênero *Bifidobacterium*, maior efeito na redução da viabilidade celular sobre a linhagem tumoral LS174T do que sobre a linhagem normal IEC-18. Esses dados, embora representem uma diferença sutil, confirmam a hipótese deste trabalho e justificam o uso popular das espécies combinadas, além de representar uma vantagem no âmbito da terapia tumoral, tendo em vista a seletividade indicada. Nas estratégias terapêuticas estabelecidas na clínica, a falta de seletividade dos compostos quimioterápicos é um obstáculo conhecido porém ainda desafiador, pois resulta na incidência de efeitos adversos muitas vezes graves ao afetar tecidos saudáveis não-tumorais do paciente (BENARBA; PANDIELLA, 2018).

Entretanto, os valores de IC_{50} relativos ao mix de probióticos são maiores que os encontrados para as espécies isoladas de *B. bifidum* e *L. gasseri* (Tabela 3), o que indica que o uso das espécies em conjunto neste modelo requer maiores concentrações para reduzir em 50% a viabilidade de ambas as linhagens do que o necessário para o mesmo efeito pelas espécies isoladas. De maneira análoga, Parisa *et al.* (2020) observaram efeito

de redução da viabilidade celular da linhagem LS174T de adenocarcinoma colônico humano resultante de um coquetel de *Lactobacillus* spp. combinadas a *Bifidobacterium* spp., porém sem diferença significativa em relação ao efeito dos tratamentos com as espécies separadamente.

Tabela 3 – IC₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado das espécies de probióticos (UFC/mL) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC ₅₀ (UFC/mL)		
	<i>B. bifidum</i>	<i>L. gasseri</i>	Mix
HaCat	4,02 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁵	2,26 x 10 ⁹
HCT-8	3,70 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶	2,77 x 10 ⁷

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: IC₅₀: concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UFC: Unidades Formadoras de Colônia, Mix: *B. bifidum* combinado a *L. gasseri*

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* Calcsyn®.

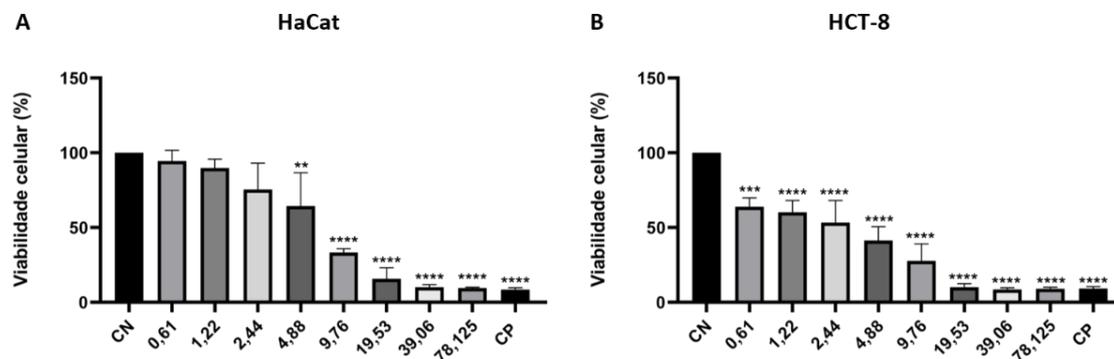
O uso de cápsulas disponíveis comercialmente para avaliação no sistema teste *in vitro*, um sistema mais sensível a variações e a falta de exatidão das concentrações de tratamentos a nível micrométrico, demonstra-se um desafio à análise estatística (IACONELLI *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, o sistema *in vitro* não é representativo dos efeitos complexos em um organismo multicelular (BRACKEN, 2009), sem possibilidade de mimetizar a ingestão, a colonização do sistema digestório pelos microorganismos probióticos e, portanto, sua ação sistêmica. Deste modo, os resultados aqui obtidos serviram como provocações para investigações mais aprofundadas, por exemplo, para o modelo *in vivo*, considerado mais adequado para estudos de fenômenos integrados.

6.1.2 Vitamina D

Conforme conduzido com os probióticos, os experimentos para avaliação da atividade citotóxica foram realizados com a vitamina D a partir de formas acessíveis comercialmente. Considerando as recomendações mínimas diárias (HOLICK *et al.*, 2011), a vitamina D foi obtida em cápsulas de 500 Unidades Internacionais (UI), onde foram avaliadas 8 concentrações dentro das possibilidades de solubilização do conteúdo, permitindo então uma faixa tratamento que variou entre 0,61 a 78,125 UI. A Figura 6 apresenta os resultados obtidos de cada concentração sobre a viabilidade celular em

ambas as linhagens estudadas. O IC₅₀ também foi calculado e segue apresentado na Tabela 4.

Figura 6 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações (UI/mL) de vitamina D



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) HaCat (A) e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%). UI: unidades internacionais.

Tabela 4 – IC₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado com vitamina D (UI/mL) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC ₅₀ (UI/mL)
	Vitamina D
HaCat	8,25
HCT-8	2,75

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: IC₅₀: concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UI: Unidades Internacionais

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* CalcuSyn®.

Pôde ser observado um efeito significativo e dose-dependente da vitamina D sobre a viabilidade celular da linhagem de células normais (HaCat) apenas a partir da concentração de 4,88 UI, enquanto na linhagem tumoral HCT-8 um efeito citotóxico significativo já é observado desde a menor concentração avaliada (0,61 UI) (Figura 6). Também de maneira dose-dependente, estudos relatam redução da proliferação celular das linhagens de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 e Caco-2 após tratamento com 1 α ,25(OH)₂D₃ em concentrações de 0,1 a 1 μ M (MURILLO *et al.*, 2010; WIERZBICKA *et al.*, 2015) e em concentrações de 3,125 a 100 μ M em HCT-116 (SHRUTHI *et al.*, 2017; VARGHESE *et al.*, 2020).

Destaca-se o valor de IC_{50} consideravelmente menor na linhagem tumoral quando comparado à linhagem de células normais (Tabela 4), o que constitui um grande diferencial dos tratamentos pois é indicativo da seletividade da ação da vitamina D. Estudo semelhante, comparou o efeito de vitamina D em linhagens AGS e MKN45, de adenocarcinoma gástrico humano, com células não-transformadas da linhagem HGF de fibroblasto gengival humano. Foi demonstrado, assim como no presente estudo, um valor de IC_{50} maior para a linhagem normal do que para ambas as linhagens tumorais (ALIZADEH-NAVAEI *et al.*, 2019).

A seletividade tem sido uma característica frequentemente pesquisada em laboratórios do mundo todo em contraposição as estratégias quimioterapêuticas clássicas, que enfrentam a alta incidência de efeitos colaterais devido à falta de seletividade, uma vez que muitos dos mecanismos de ação dos antitumorais conhecidos são de atuação ampla, em tecidos de alta proliferação, acarretando efeitos indesejáveis nas células saudáveis do indivíduo. Efeitos tóxicos sobre mucosas intestinais e células do sangue, por exemplo, tem consequências graves sobre o bem-estar do paciente, levando muitas vezes à não aderência ao tratamento (BENARBA; PANDIELLA, 2018). Os efeitos do tratamento com o 5-FU, por exemplo, não se diferenciam entre células de câncer colorretal HCT-116, HT-29 e DLD-1 de células endoteliais HUVEC, cardiomiócitos humanos ou fibroblastos BJ. O IC_{50} relatado na literatura para as células não-transformadas se mostra em aproximadamente 3,8, 4,8 e 8,6 μM , respectivamente, enquanto é de 13,7 μM para a linhagem HCT-116, 106,8 μM para a linhagem HT-29 e de 33,17 μM para DLD-1 (FOCACCETTI *et al.*, 2015; TIGU *et al.*, 2020).

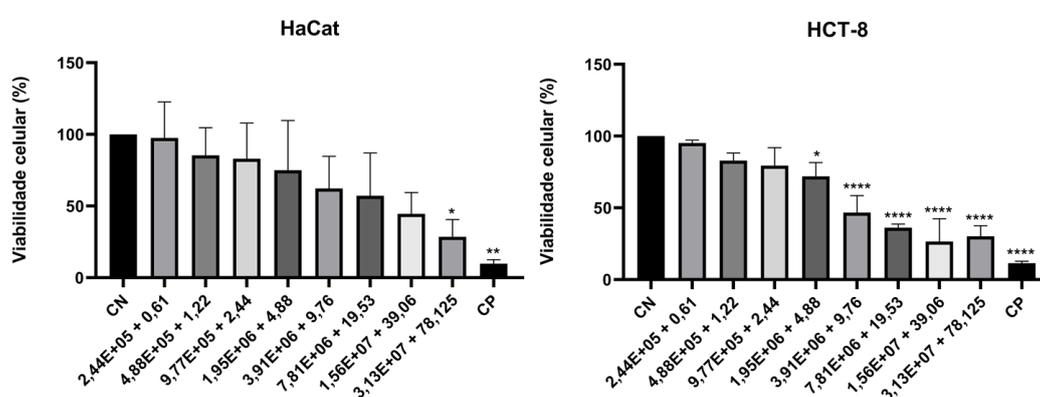
Considerando a importância de identificar e caracterizar compostos com diferentes mecanismos de ação que possuam atividade citotóxica contra células tumorais, de maneira isolada ou associada a tratamentos clássicos, sem apresentar efeitos adversos severos em células não-transformadas (TIGU *et al.*, 2020), os dados de seletividade apresentados na literatura e os resultados obtidos neste estudo corroboram o potencial seletivo da vitamina D, fundamentando sua aplicação em estratégias isoladas ou combinadas a serem estudadas nos diferentes modelos experimentais.

6.1.3 Combinação dos probióticos com vitamina D

Considerando os resultados promissores obtidos para a vitamina D, a partir das concentrações estudadas nos tratamentos isolados, foram realizados estudos com as

combinações entre as espécies de probióticos e a vitamina D: a primeira concentração de cada um dos probióticos ($2,44 \times 10^5$ UFC/mL) foi combinada à primeira concentração da vitamina D (0,61 UI), ambas isoladas; em seguida, a segunda de um ($4,88 \times 10^5$ UFC/mL de probiótico) foi combinada à segunda do outro (1,22 UI de vitamina D), e assim sucessivamente. Na Figura 7, encontram-se os resultados da exposição de ambas as linhagens à espécie *B. bifidum* combinada à vitamina D, e na Figura 8, de *L. gasseri* combinada com a vitamina D. Ainda, na Figura 9, são apresentados os resultados do tratamento das duas linhagens com o mix de ambas as espécies de probióticos combinado à vitamina D.

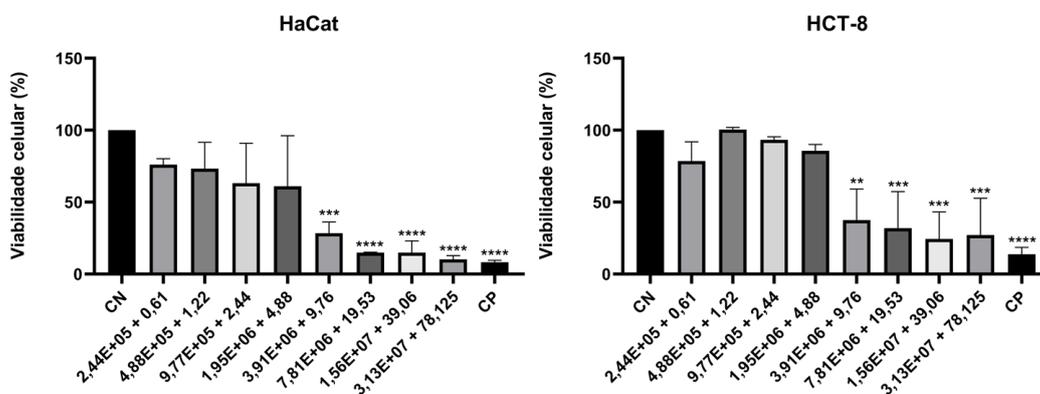
Figura 7 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de *B. bifidum* (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia, UI: unidades internacionais.

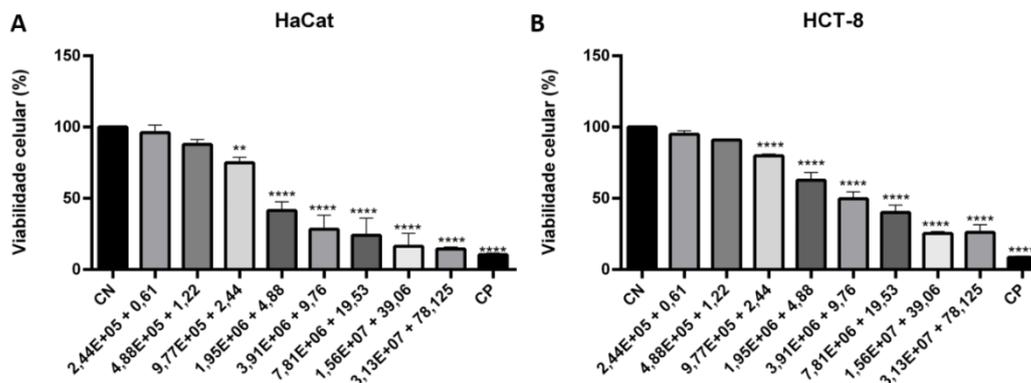
Figura 8 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de *L. gasseri* (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia, UI: unidades internacionais.

Figura 9 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações do Mix de probióticos (UFC/mL) + vitamina D (UI/mL)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA one-way e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), UFC: unidades formadoras de colônia, UI: unidades internacionais, Mix: combinação das duas espécies *B. bifidum* e *L. gasseri*.

Tanto na combinação de cada espécie isolada com Vitamina D quanto do mix de probióticos (*B. bifidum* + *L. gasseri*) com Vitamina D, observa-se redução dose-dependente da viabilidade celular de ambas as linhagens avaliadas. Destaca-se que na linhagem tumoral HCT-8 um efeito estatisticamente significativo é demonstrado a partir de $1,95 \times 10^6$ UFC/mL de *B. bifidum* + 4,88 UI de vitamina D, e a partir da concentração de $3,91 \times 10^6$ UFC/mL de *L. gasseri* + 9,76 UI de vitamina D, em ambas as linhagens testadas, enquanto que no tratamento com o mix de probióticos combinado à Vitamina D o efeito significativo é observado a partir de uma concentração menor ($9,77 \times 10^5$ UFC/mL do mix de probióticos + 2,44 UI de vitamina D), em ambas as linhagens testadas. Isso sugere que a combinação do mix de probióticos com a vitamina D teve maior efeito citotóxico do que as espécies combinadas à vitamina D separadamente, uma vez que alcançou redução significativa da viabilidade celular em concentrações menores de tratamento. Os respectivos valores de IC_{50} encontram-se apresentados na Tabela 5.

Os valores de IC_{50} relativos aos probióticos, tanto isolados como em mix, se apresentam na mesma grandeza (10^6 UFC/mL), com diferenças sutis nos valores, de maneira semelhante ao calculado para os tratamentos isolados com ambas as espécies *B. bifidum* e *L. gasseri* (Tabela 5). No entanto, os valores de IC_{50} relativos à vitamina D se mostram divergentes do descrito para os ensaios de viabilidade celular, variando em relação à linhagem e à estratégia de tratamento: na combinação do mix com a vitamina D, onde era esperado menor valor de IC_{50} devido à citotoxicidade mais destacada, o valor

de IC₅₀ para a vitamina D se mostra intermediário aos encontrados com *B. bifidum* + Vitamina D e *L. gasseri* + Vitamina D para a linhagem HaCat, e pouco abaixo ao encontrado para *B. bifidum* + Vitamina D para a linhagem HCT-8 (Tabela 5).

Tabela 5 – IC₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado das espécies de probióticos (UFC/mL) e vitamina D (UI/mL) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC ₅₀ (UFC/mL + UI/mL)		
	<i>B. bifidum</i> + Vitamina D	<i>L. gasseri</i> + Vitamina D	Mix + Vitamina D
HaCat	9,75 x 10 ⁶ + 24,37	1,88 x 10 ⁶ + 4,69	2,79 x 10 ⁶ + 6,97
HCT-8	5,42 x 10 ⁶ + 13,55	1,69 x 10 ⁶ + 42,19	5,31 x 10 ⁶ + 13,27

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: IC₅₀: concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UI: Unidades Internacionais, UFC: Unidades Formadoras de Colônia, Mix: *B. bifidum* combinado a *L. gasseri*.

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* Calcsyn®.

Novamente defrontou-se com o desafio de aplicação de formas comerciais dos probióticos, que podem justificar a observação de maior variância entre as replicatas experimentais – característica não compartilhada na aplicação de vitamina D isolada, também disponível comercialmente, indicando ser uma problemática experimental relacionada apenas ao uso de bactérias vivas. Apesar disso, nota-se o efeito de citotoxicidade a partir da combinação dos probióticos nessas estratégias, com indício de maior atuação sobre a linhagem tumoral que células normais, indicado pelo valor reduzido de IC₅₀ dos tratamentos com *B. bifidum* + Vitamina D e *L. gasseri* + Vitamina D sobre a linhagem HCT-8 em comparação aos respectivos IC₅₀ sobre a linhagem HaCat. Por outro lado, o tratamento com o Mix de probióticos + Vitamina D não demonstrou maior sensibilidade da linhagem tumoral, indicando ausência de seletividade dentro das condições testadas.

6.1.4 Associação com quimioterápicos

Embora os tratamentos isolados, em especial com a vitamina D, tenham se mostrado efetivos para redução da viabilidade celular, não foi possível observar um aumento expresso citotoxicidade resultante de sua combinação com as espécies de probióticos testadas, tal como a hipótese inicial. Isso pode ser reflexo das limitações

encontradas na aplicação de probióticos no modelo *in vitro*, visto que a tendência observada nos resultados da combinação é condizente com o efeito decorrente da aplicação da vitamina D isoladamente. Neste sentido, tendo em vista o potencial demonstrado pela vitamina D, avaliou-se sua combinação com alguns agentes quimioterápicos clássicos – a doxorrubicina (DXR), o 5-fluorouracil (5-FU) e a cisplatina (CDDP) –, a fim de investigar uma possível modulação no efeito citotóxico de tais quimioterápicos, aumentando sua citotoxicidade e/ou seletividade.

6.1.4.1 Combinação da vitamina D com doxorrubicina

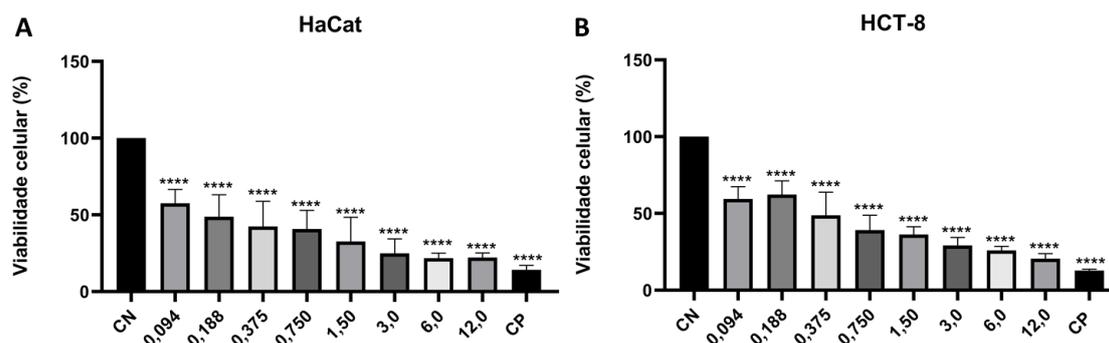
A doxorrubicina (DXR) é um antibiótico do grupo das antracilinas, derivado da bactéria *Streptomyces peucetius*, e é comumente utilizada no tratamento de tumores sólidos como de mama, ovário, bexiga e tireóide, dentre outros. Possui capacidade de intercalar-se com pares de bases da molécula de DNA, além de inibir a enzima topoisomerase II, resultando em quebras da dupla-fita e inibição de síntese de DNA e RNA (JOHNSON-ARBOR; DUBEY, 2021). Sua principal limitação se dá pela incidência de efeitos adversos agudos e crônicos, principalmente no contexto de cânceres gastrointestinais (POTOČNIK *et al.*, 2017).

Antes de associar a DXR a vitamina D, a fim de comparar os efeitos citotóxicos de sua aplicação isolada e combinada sob as mesmas condições experimentais, foi realizado o tratamento com DXR isoladamente, para a obtenção do perfil de citotoxicidade em uma faixa de concentração determinada de forma que o IC₅₀, obtido a partir de dados da literatura (valores em torno de 5,95 µM para células HCT-8), pudesse ser incluído (ABDELGHANY *et al.*, 2021). A Figura 10 apresenta os resultados de cada concentração testada sobre a viabilidade celular de ambas as linhagens.

Conforme dados já encontrados na literatura acerca da citotoxicidade da DXR e que nos serviram de base para determinação das concentrações avaliadas (ABDELGHANY *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2018; XIONG; XIAO, 2018), os resultados aqui descritos também demonstraram que o tratamento com DXR apresenta efeito altamente significativo na redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, a partir de 0,094 µM. Tal redução é observada de maneira semelhante na linhagem tumoral e na linhagem normal (Figura 10). A ausência de seletividade demonstrada pela DXR acarreta a toxicidade elevada decorrente do tratamento, afetando variados tecidos saudáveis e trazendo efeitos adversos como fadiga, alopecia, náusea e úlceras bucais, além de

complicações como supressão medular e cardiopatia (FU *et al.*, 2021; SONOWAL *et al.*, 2017). Este último é descrito como um efeito cardiotoxíco cumulativo dose-dependente, que pode levar a falência cardíaca, tornando crucial a redução da toxicidade induzida por doxorrubicina – sem atenuar sua atividade antineoplásica (DOUEDI; CARSON, 2021; JOHNSON-ARBOR; DUBEY, 2021).

Figura 10 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de DXR (μM)



Fonte: Do autor (2022)

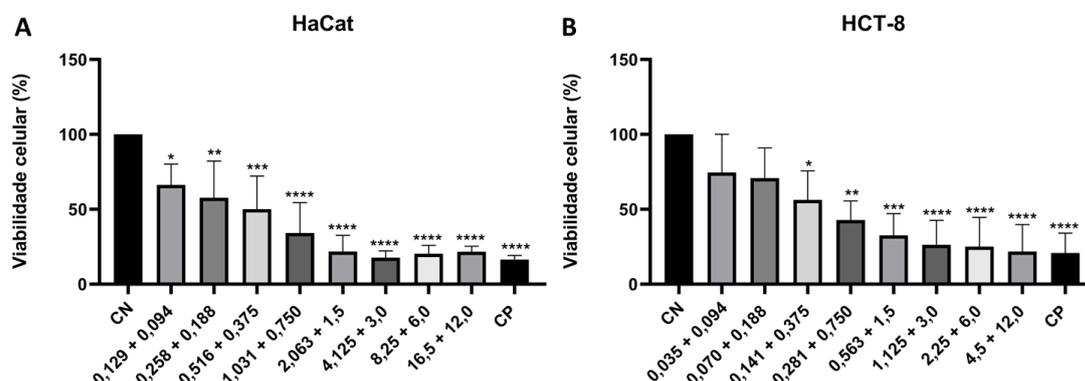
Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), DRX: doxorrubicina.

A partir do IC_{50} determinado para as duas linhagens testadas nos tratamentos isolados com a vitamina D ou DXR isoladamente, foi realizado tratamento combinado e os resultados obtidos são expressão na figura 11. A Tabela 6 apresenta o IC_{50} calculado para ambas as linhagens em consequência do tratamento isolado com DXR e tratamento associado (vitamina D + DXR).

É possível notar um efeito estatisticamente significativo na redução da viabilidade celular a partir do tratamento com a associação de vitamina D e doxorrubicina sobre a linhagem de células não-transformadas HaCat em todas as concentrações, salientando ainda que as concentrações testadas de vitamina D nessa linhagem são mais elevadas que as testadas na linhagem HCT-8 devido ao seu maior IC_{50} isolado (Tabelas 4 e 6). Ainda, os valores médios da redução de viabilidade resultante das menores concentrações da combinação sobre a linhagem HaCat (Figura 11A) mostram-se mais altos do que aqueles apresentados ao tratamento com DXR isoladamente (Figura 10A). Na linhagem tumoral HCT-8, observa-se redução da viabilidade celular de maneira significativa a partir da combinação de 0,141 UI de vitamina D e 0,375 μM DXR (Figura 11B), cujo valor para DXR é mais alto em comparação ao tratamento isolado (Figura 10B), o que pode indicar

que a sensibilidade das células foi reduzida pela combinação com vitamina D nos menores tratamentos quando comparados ao resultados do tratamento isolado com DXR.

Figura 11 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + DXR (μ M)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%). UI: unidades internacionais. DRX: doxorrubicina

Tabela 6 – IC_{50} apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e DXR (μ M) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC_{50}		
	Vitamina D	DXR	Vitamina D + DXR
HaCat	8,25	1,38	0,26 + 1,85
HCT-8	2,75	1,79	1,68 + 1,10

Fonte: Do autor (2022).

Legenda: IC_{50} : concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UI: Unidades Internacionais, DRX: doxorrubicina.

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* Calcsyn®. Os dados da coluna Vitamina D foram apresentados na Tabela 4 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

Os valores de IC_{50} apresentados na tabela 6 demonstram certa seletividade da combinação: no tratamento combinado ocorre uma redução do valor médio de IC_{50} na linhagem HCT-8 (1,68 UI/mL + 1,10 μ M), indicando maior sensibilidade quando comparado aos tratamentos isolados com vitamina D (2,75 UI/mL) e DRX (1,79 μ M), enquanto na linhagem HaCat o valor de IC_{50} observado com o tratamento combinado (0,26 UI/mL + 1,85 μ M) é menor do que o de vitamina D isolada (8,25 UI/mL) porém maior quando comparado ao tratamento com DXR (1,38 μ M) (Tabela 6). A redução do IC_{50} da combinação de Vitamina D + DXR, comparado ao tratamento isolado com DXR

sobre a linhagem tumoral, e seu aumento na linhagem normal, representam um efeito interessante na redução de possíveis efeitos tóxicos sobre o paciente, pois indica que menores doses do tratamento possam ser utilizadas sem que a efetividade seja comprometida e, possivelmente, menores efeitos colaterais serão observados. Os dados ressaltam a seletividade, sendo necessária maior concentração da mesma substância para reduzir o crescimento celular de tecidos saudáveis comparado ao necessário em células tumorais.

Estudo de Chen *et al.* (2021) acerca do efeito da DXR sobre células endoteliais aórticas humanas (HAECs) demonstrou a indução de marcadores de senescência consequente ao tratamento, em contraste à interessante atenuação da senescência decorrida do tratamento combinado à vitamina D. O mesmo estudo indica, ainda, a modulação da via de sinalização AMPK α /SIRT1/FOXO3 pela vitamina D, fortemente inibida pela DXR, que leva ao aumento da expressão de IL-10 e constitui um mecanismo proposto para o efeito protetor observado (CHEN *et al.*, 2021). Outrossim, Lee *et al.* (2021) descrevem a redução da cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina em modelo animal de câncer de mama a partir do tratamento associado com vitamina D, sem comprometimento dos efeitos antineoplásicos. Em conjunto com os resultados do presente estudo, denota-se então o potencial da vitamina D em elevar a segurança do uso de doxorrubicina e a possibilidade de alcançar a redução de doses clínicas efetivas, levando ao aumento da eficácia e redução de efeitos adversos (WEISS *et al.*, 2015).

Dada a interação da vitamina D e VDR com componentes reguladores da proliferação e ciclo celular (CHRISTAKOS *et al.*, 2016), e a inibição de síntese de DNA e RNA resultante da ação da DXR sobre bases nucleotídicas e a estrutura do DNA (JOHNSON-ARBOR; DUBEY, 2021), a investigação de eventos genotóxicos e a análise de controle do ciclo celular seriam interessantes para oferecer perspectivas integrativas acerca de seus mecanismos de ação nos diferentes perfis celulares, e elucidar as bases moleculares da seletividade observada quando a vitamina D é combinada a DXR.

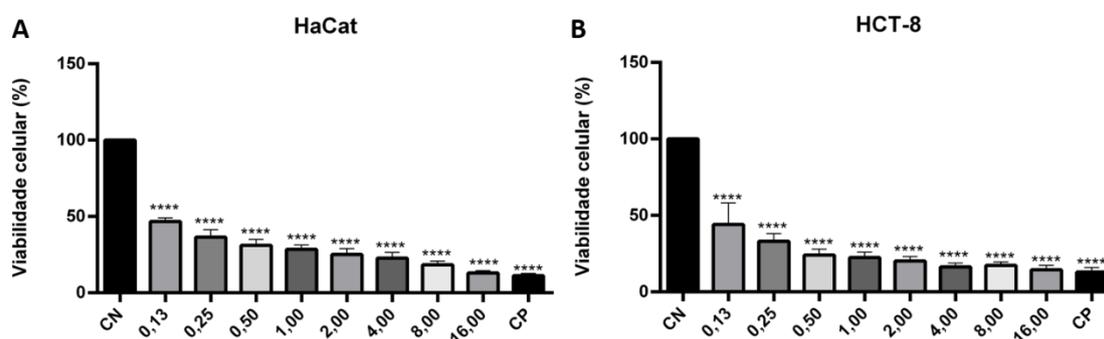
6.1.4.2 Combinação da vitamina D com 5-fluorouracil

O 5-fluorouracil (5-FU) é um análogo de pirimidina (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022a) cujos metabólitos possuem efeitos antineoplásicos por diferentes mecanismos de ação. É indicado pela *Food and Drug*

Administration (FDA, EUA) para o tratamento de adenocarcinoma gástrico, pancreático, colorretal e carcinoma de mama, além de ser aprovado para uso tópico em diferentes condições dermatológicas. Após sua entrada nas células, o 5-FU é convertido a fluorodesoxiuridina monofosfato, que forma um complexo com a enzima timidilato sintase e assim inibe a produção de desoxitimidina monofosfato (dTMP). Este é um dos nucleotídeos essenciais para a replicação e reparo de DNA, e sua ausência durante a fase S do ciclo celular resulta em quebras de dupla-fita catalizadas por endonucleases. Além disso, o 5-FU pode ser incorporado em fitas de DNA e RNA no lugar de timina ou uracila, resultando em uma sobrecarga de erros no sistema de reparo do DNA que acarreta na morte de células com alta taxa de proliferação (CASALE; PATEL, 2022).

Tendo em vista a problemática enfrentada pelas equipes clínicas em sua administração, incluindo mecanismos de resistência e baixa eficácia do 5-FU em monoterapia já reportados (ZHANG *et al.*, 2008), foi estudada neste trabalho a combinação de 5-FU com a vitamina D, em faixas condizentes com seus respectivos IC₅₀ nas linhagens testadas. A Figura 12 apresenta os resultados do tratamento das linhagens HaCat e HCT-8 com 5-FU isoladamente, para critério de comparação ao tratamento combinado à vitamina D, cujos resultados são apresentados na Figura 13. Ainda, encontram-se na Tabela 7 os valores de IC₅₀ calculados para ambas as linhagens em consequência do tratamento isolado com 5-FU e tratamento combinado (vitamina D + 5-FU).

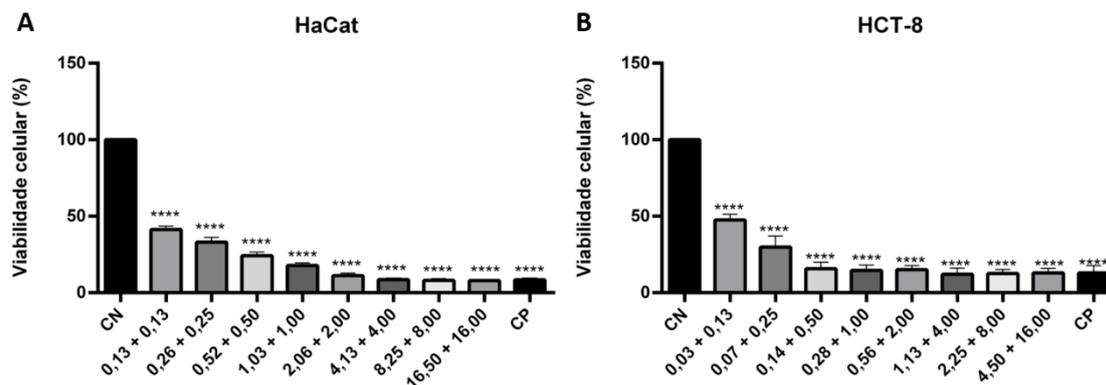
Figura 12 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de 5-FU (μM)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), 5-FU: 5-fluorouracil.

Figura 13 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + 5-FU (μ M)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), 5-FU: 5-fluorouracil.

Tabela 7 – IC₅₀ apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e 5-FU (μ M) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC ₅₀		
	Vitamina D	5-FU	Vitamina D + 5-FU
HaCat	8,25	0,10	0,220 + 0,044
HCT-8	2,75	0,19	0,084 + 0,017

Fonte: Do autor (2022).

Legenda: IC₅₀: concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, 5-FU: fluourouracil, UI: Unidades Internacionais HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal.

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* Calcsyn®. Os dados da coluna Vitamina D foram apresentados na Tabela 4 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

Nos tratamentos com 5-FU isoladamente, nota-se a redução da viabilidade celular de forma significativa em todas as concentrações testadas, e em ambas as linhagens (Figura 12). O mesmo perfil de citotoxicidade pode ser observado no tratamento de vitamina D combinada ao 5-FU (Figura 13). No entanto, a ação de 5-FU no tratamento isolado é semelhante na linhagem tumoral HCT-8 e na linhagem de queratinócitos normais HaCat, e o valor de IC₅₀ mais baixo na linhagem de queratinocitos normais (0,10 μ M, Tabela 7) do que na linhagem de adenocarcinoma colorretal (0,19 μ M, Tabela 7) reflete sua ação sistêmica acompanhada de numerosos efeitos adversos. São reportados como efeitos mais comuns diarreia, vômito, náusea e desidratação, além de neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, pirexia, entre outros, que podem suscitar efeitos secundários em pacientes imunocomprometidos (CASALE; PATEL, 2022).

Já os resultados do tratamento com 5-FU combinado à vitamina D demonstraram a manutenção do efeito citotóxico (Figura 13), porém de maneira diferente sobre cada linhagem. Os valores de IC₅₀ calculados para cada linhagem demonstram a inversão da dinâmica encontrada em seus efeitos isolados: na combinação, tanto para a vitamina D quanto para o 5-FU, é necessária uma menor concentração para atingir a redução de 50% da viabilidade de células HCT-8 (0,084 UI/mL + 0,014 µM) do que o necessário para o mesmo em células HaCat (0,220 UI/mL + 0,044 µM).

Apesar de estudos *in vitro* da combinação serem escassos, incluindo a aplicação de vitamina D3 (25µM) e 5-FU (50 µM) em linhagens celulares de câncer colorretal HT-29, SW480 e SW620 por Idris *et al.* (2022), que reporta efeito citotóxico sem detalhar os resultados do ensaio de viabilidade, estratégias de tratamento *in vivo* apresentam dados reprodutíveis em diferentes modelos animais. Em modelo de carcinogênese colorretal induzida por azoximetano, Aslam *et al.* (2021) Refaat *et al.* (2015) demonstram efeito mais pronunciado da terapia associada de 5-FU e vitamina D em relação às monoterapias, tal como o uso de análogos de vitamina D em combinação a 5-FU sobre modelo xenográfico com células HT-29 realizado por Milczarek *et al.* (2014). Em conjunto, os dados aqui apresentados e os obtidos em outros modelos relatados na literatura apontam para a capacidade da vitamina D em potencializar o efeito citotóxico e antitumoral do 5-FU de maneira seletiva às células tumorais, assinalando a vitamina D como um possível adjuvante para estratégias quimioterápicas da clínica.

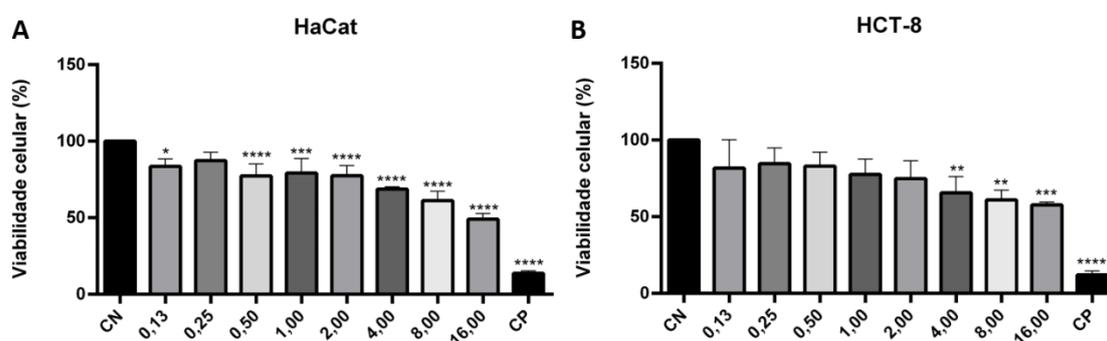
6.1.4.3 Combinação da vitamina D com cisplatina

A cisplatina, ou cis-diaminodicloroplatina(II) (CDDP), foi a primeira droga quimioterápica baseada em platina, seguida de oxaliplatina e carboplatina (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022b). Sua atuação ocorre através da ligação covalente de seu cerne de platina a purinas, o que resulta em ligações intra- ou inter-fita e culmina em quebras do DNA e morte celular. É aprovada pelo FDA para uso no tratamento de carcinomas e sarcomas, como de ovário, testículo e bexiga, além de ser combinada com outros compostos para tratamento de carcinomas de mama, colo de útero e endométrio ou de malignidades gastrointestinais, como câncer de esôfago, gástrico e hepatobiliar (GOLD; RAJA, 2021).

Apesar de sua ampla utilização, derivados de platina possuem alta toxicidade e podem enfrentar resistência em diversos tipos celulares, e por isso tem sido aplicados em

associações terapêuticas para elevar sua eficácia e reduzir efeitos adversos (BERMAN *et al.*, 2021). Com isso em vista, foi feita a combinação da cisplatina também com a vitamina D, que já demonstrou potencial citotóxico seletivo neste trabalho, a fim de observar se tais propriedades seriam replicadas no tratamento combinado. A seguir, a Figura 14 apresenta os resultados do tratamento isolado com CDDP para comparação à sua administração combinada à vitamina D, cujos resultados são apresentados na Figura 15. Ainda, encontram-se na Tabela 8 os valores de IC₅₀ calculados para ambas as linhagens em consequência do tratamento isolado com CDDP e combinado à vitamina D.

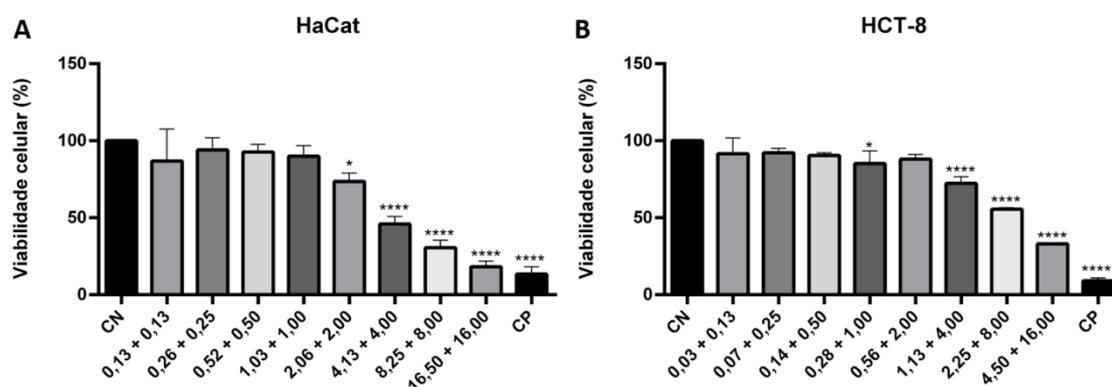
Figura 14 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de CDDP (μM)



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), CDDP: cisplatina

Figura 15 – Viabilidade celular das culturas tratadas por 48h com as diferentes concentrações de vitamina D (UI/mL) + CDDP (μM)



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) HaCat e (B) HCT-8. **** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, CN: controle negativo (sem tratamento), CP: controle positivo (DMSO 25%), CDDP: cisplatina.

Observou-se redução da viabilidade celular em ambas as linhagens no tratamento com a CDDP isoladamente (Figura 14), com presença de efeito estatisticamente significativo em todas as concentrações aplicadas à linhagem HaCat, a partir de 0,125 μM (Figura 14A), e nas três maiores concentrações aplicadas à linhagem HCT-8, a partir de 4,00 μM (Figura 14B). Esse efeito foi aprimorado nas maiores concentrações após associação com vitamina D (Figura 15), que resultou em queda mais destacada da viabilidade celular se comparado ao tratamento isolado com CDDP.

Tabela 8 – IC_{50} apresentado pelas linhagens HaCat e HCT-8 em consequência do tratamento isolado e/ou combinado de vitamina D (UI/mL) e CDDP (μM) após o tratamento por 48h.

Linhagem celular	IC_{50}		
	Vitamina D	CDDP	Vitamina D + CDDP
HaCat	8,25	40,81	19,94 + 4,08
HCT-8	2,75	65,89	60,20 + 12,33

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: IC_{50} : concentração necessária para reduzir 50% do crescimento celular, CDDP: cisplatina, UI: Unidades Internacionais, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal

Nota: Os valores apresentados foram obtidos pelo *software* Calculusyn®. Os dados da coluna Vitamina D foram apresentados na Tabela 4 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

Esses achados se refletem nos valores de IC_{50} obtidos no tratamento com CDDP isolada, no qual o IC_{50} para a linhagem HaCat (40,81 μM) se apresentou menor do que o IC_{50} para a linhagem HCT-8 (65,89 μM) (Tabela 8). Apesar de haver um aumento nos valores de IC_{50} para a vitamina D em ambas as linhagens, se comparado ao tratamento isolado com vitamina D (Tabela 8), após a combinação, esses valores foram reduzidos para CDDP (4,08 μM e 12,33 μM , respectivamente) (Tabela 8), indicando uma maior sensibilidade de ambas as linhagens celulares à estratégia combinada em relação à CDDP isolada.

O mesmo foi reportado por Bunch *et al.* (2019) em células de câncer urotelial de bexiga nas linhagens RT-112, T24 e 253J, por Huang *et al.* (2019) em carcinoma oral células escamosas com as linhagens CAL-27 e SCC-9, por Songyang *et al.* (2021) nas linhagens A549 e NCI-H1975 de câncer de pulmão de células não-pequenas, e por Piotrowska *et al.* (2019) em células de melanoma da linhagem A375. Todos esses autores demonstraram um efeito citotóxico mais proeminente resultante da combinação de CDDP e análogos de vitamina D do que das respectivas monoterapias. Ainda, neste último foi reportada redução no IC_{50} resultante da incubação com vitamina D3 combinada a CDDP em comparação ao uso de CDDP apenas (PIOTROWSKA *et al.*, 2019), o que se mostra

condizente com o observado no presente trabalho para as linhagens HCT-8 e HaCat, como descrito anteriormente.

No entanto, a combinação não foi capaz de instigar a seletividade dos tratamentos, uma vez que, com a combinação, continuou sendo necessária maior concentração de Vitamina D + CDDP para reduzir 50% da viabilidade da linhagem tumoral HCT-8 (60,20 UI + 12,33 μ M) do que o necessário para o mesmo efeito na linhagem não-transformada HaCat (19,94 UI + 4,08 μ M) (Tabela 8), apontando para a ausência de seletividade de seu efeito citotóxico para células tumorais em relação às células saudáveis.

Em geral, a CDDP pode acarretar também em toxicidade gastrointestinal, causando náusea e diarreia como principais efeitos colaterais, além de mielosupressão, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e outras complicações graves (GOLD; RAJA, 2021). Portanto, com a citotoxicidade atingida pelo tratamento combinado em menores concentrações de CDDP do que o tratamento isolado, os resultados observados neste trabalho podem se mostrar uma vantagem em testes clínicos, visto que a associação da CDDP à vitamina D permitiria a redução da dose de CDDP administrada, incorrendo em menores níveis de toxicidade sistêmica aos pacientes sem reduzir sua eficácia terapêutica.

6.1.5 Avaliação do sinergismo

A fim de avaliar e comparar a potencialidade das combinações de tratamentos propostas neste trabalho, foi aplicado o método de Chou-Talalay (CHOU; TALALAY, 1984), a partir do cálculo do índice de combinação (CI, *combination index*). O CI é calculado a partir da razão entre a concentração em estudo de cada fármaco ou molécula e seus respectivos IC_{50} , o que permite atribuir um número à relação entre o efeito da combinação de tais concentrações e o efeito médio do tratamento. Assim, razões que resultem em valor 1 indicam que o efeito da combinação das concentrações em estudo é exatamente igual à soma dos efeitos encontrados separadamente, o que é denominado efeito aditivo. Já razões maiores que 1 indicam que o efeito das concentrações isoladas é maior do que o efeito das respectivas concentrações combinadas, o que se denomina efeito antagônico. Razões menores que 1, por sua vez, indicam que o efeito das concentrações combinadas é maior do que seu efeito isolado, o que caracteriza o efeito sinérgico. Os resultados obtidos para as combinações de probióticos e vitamina D

encontram-se apresentados na Tabela 9, e para a combinação da vitamina D com quimioterápicos, na Tabela 10.

Nos experimentos que combinaram os probióticos à vitamina D, o índice de combinação calculado mostrou valores de 0,9 a 5,2 para a linhagem HaCat, e de 3,1 a 5161,34 para a linhagem HCT-8 (Tabela 9), chegando até mesmo a valores de 26100000 para o mix de probióticos combinado à vitamina D, o que não reflete o efeito observado através do ensaio de proliferação celular. Nestes (Seção 6.1.3), a combinação dos tratamentos resultou em um aumento do potencial citotóxico em ambas as linhagens testadas e redução do IC_{50} na linhagem HCT-8 em comparação aos tratamentos isolados, indicando efeito aditivo ou sinérgico dos tratamentos para potencializar os resultados obtidos sobre as linhagens celulares. No entanto, na Tabela 9, notam-se valores do CI por vezes muito acima da faixa determinada por Chou e Talalay, que descrevem valores próximos a 1,0, o qual se utiliza como limite entre os efeitos sinérgico e antagônico (CHOU; TALALAY, 1984). Isso indicaria um efeito fortemente antagônico dos tratamentos, em contraste ao aumento da citotoxicidade encontrado na maioria das combinações em relação aos tratamentos isolados.

Como discutido nas seções anteriores, o intuito deste trabalho foi avaliar os efeitos dos probióticos em condições mais próximas possível em que são utilizados na clínica. Por outro lado, a aplicação de probióticos em sua formulação comercial se mostra sujeita à variabilidade, o que se traduz em divergências na metodologia *in vitro*. Tal discrepância observada nos experimentos provavelmente se deve ao desvio padrão obtido, o que se reflete em um valor de r mais baixo para as equações resultantes de tais dados, prejudicando a interpretação da equação. O valor de r é um coeficiente de correlação linear, utilizado para mensurar, de 0 a 1, a conformidade dos dados com a lei de ação das massas, que descreve a proporcionalidade entre a velocidade da reação e a massa ativa dos reagentes, ou seja, sua concentração molar (GORSKA-PONIKOWSKA *et al.*, 2017). Assim, um valor de r igual a 1 indicaria perfeita conformidade entre os dados obtidos experimentalmente e a equação que os descrevem, fazendo com que valores mais distantes desse parâmetro se mostrem mais distantes de tal conformidade (BURETA *et al.*, 2019). No entanto, tendo em vista a aplicabilidade desse método, pode-se supor que a avaliação da atividade de probióticos sobre a viabilidade celular não é adequadamente avaliada pelos coeficientes e índices aqui utilizados, uma vez que não se trata de reagentes químicos e sim de microorganismos vivos.

Já na análise da combinação da vitamina D com os quimioterápicos DXR e 5-FU, foi possível detectar o efeito sinérgico através dos valores do CI menores que 1,0, que na linhagem HCT-8 se mostram nas faixas de 0,10 a 0,57 e 0,07 a 1,71 respectivamente (Tabela 10), em congruência com o observado no ensaio de proliferação celular (Seções 6.1.4.1 e 6.1.4.2). Em HCT-8, no tratamento com Vitamina D + DXR os valores de CI indicam sinergismo ou sinergismo forte em todas as concentrações testadas, enquanto no tratamento com Vitamina D + 5-FU variados níveis de sinergismo podem ser identificados, exceto na maior concentração testada, demonstrando haver benefício na associação desses quimioterápicos à vitamina D. Sobre a linhagem HCT-8, apenas na combinação de Vitamina D + CDDP foi detectado efeito antagônico na maioria das concentrações testadas, com valores de CI maiores que 1,0, na faixa de 10,4 a 87,5 (Tabela 10), o que reflete os resultados do ensaio de proliferação que resultaram em citotoxicidade semelhante quanto aos tratamentos isolados.

Na linhagem HaCat, a aplicação dos quimioterápicos DXR, CDDP e 5-FU em combinação com a vitamina D resultou em efeito antagônico na maioria das concentrações testadas, identificado através dos valores de CI maiores que 1,0 (Tabela 10). Isso indica que a combinação gerou efeito menor dos tratamentos sobre a viabilidade celular do que seu uso isolado, em congruência com o observado nos ensaios de MTT para a linhagem HaCat (Seção 6.1.4).

Além das estratégias de tratamento e combinações realizadas neste trabalho, seriam proveitosos os estudos de outras estratégias de exposição da combinação de tratamentos, além da exposição simultânea, a fim de determinar se o pré-tratamento com um dos compostos utilizados, especialmente a vitamina D, seria capaz de sensibilizar as células ao tratamento posterior e, assim, atingir maior efeito citotóxico ou maior seletividade sobre a linhagem tumoral.

Tabela 9 – Índice de combinação (CI) e descrição de efeito (sinérgico ou antagônico) obtidos para os tratamentos combinados de probióticos e vitamina D nas linhagens HaCat e HCT-8.

Tratamentos / Linhagens		<i>B. bifidum</i> + Vitamina D		<i>L. gasseri</i> + Vitamina D		Mix + Vitamina D	
Hacat		r = 0,92		r = 0,89		r = 0,96	
(UFC/mL)	(UI/mL)	CI	Efeito	CI	Efeito	CI	Efeito
2,44E+05	0,61	1,403	AM	0,78	SM	136,465	AMF
4,88E+05	1,22	0,942	P	1,374	AM	239,834	AMF
9,77E+05	2,44	1,637	A	1,599	A	434,325	AMF
1,95E+06	4,88	2,018	A	2,938	AF	738,005	AMF
3,91E+06	9,77	2,219	A	1,221	AM	1379,496	AMF
7,81E+06	19,53	3,598	AF	0,986	P	2686,983	AMF
1,56E+07	39,06	4,894	AF	1,896	A	5091,185	AMF
3,13E+07	78,13	5,216	AF	2,434	A	10100	AMF
HCT-8		r = 0,90		r = 0,62		r = 0,98	
(UFC/mL)	(UI/mL)	CI	Efeito	CI	Efeito	CI	Efeito
2,44E+05	0,61	10500	AMF	2846,839	AMF	26100000	AMF
4,88E+05	1,22	136,796	AMF	192,319	AMF	9760000	AMF
9,77E+05	2,44	145,199	AMF	249,706	AMF	1540000	AMF
1,95E+06	4,88	62,434	AMF	5161,339	AMF	287000	AMF
3,91E+06	9,77	4,776	AF	19,477	AMF	133000	AMF
7,81E+06	19,53	3,818	AF	15,503	AMF	91300	AMF
1,56E+07	39,06	3,168	A	155,448	AMF	34000	AMF
3,13E+07	78,13	8,901	AF	94,221	AMF	54800	AMF

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: r: coeficiente de correlação linear, CI: *combination index*, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UI: Unidades Internacionais, UFC: Unidades Formadoras de Colônia, Mix: *B. bifidum* + *L. gasseri*. Os símbolos utilizados para indicar o efeito se encontram descritos na Tabela 1; em verde são indicadas as variações do efeito antagônico, e em amarelo as variações do efeito sinérgico.

Tabela 10 – Índice de combinação (CI) e descrição de efeito (sinérgico ou antagônico) obtidos para os tratamentos combinados de vitamina D e quimioterápicos nas linhagens HaCat e HCT-8.

Tratamentos/Linhagens		Vitamina D + DXR		Vitamina D + 5-FU		Vitamina D + CDDP	
HaCat		r = 0,97		r = 0,97		r = 0,89	
(UI/mL)	(μ M)	CI	Efeito	CI	Efeito	CI	Efeito
0,13	0,13	0,24	SF	0,096	SMF	0,332	S
0,26	0,25	0,594	SF	0,111	SF	1,183	AL
0,52	0,50	1,009	P	0,133	SF	3,427	AF
1,03	1,00	0,983	P	0,181	SF	6,042	AF
2,06	2,00	0,884	SL	0,224	SF	2,588	A
4,13	4,00	1,203	AM	0,35	S	2,09	A
8,25	8,00	1,591	A	0,662	S	2,317	A
16,50	16,00	2,207	A	1,304	AM	2,696	A
HCT-8		r = 0,95		r = 0,82		r = 0,94	
(UI/mL)	(μ M)	CI	Efeito	CI	Efeito	CI	Efeito
0,04	0,13	0,107	SF	0,723	SM	20,114	AMF
0,07	0,25	0,324	S	0,226	SF	31,002	AMF
0,14	0,50	0,537	S	0,075	SMF	39,495	AMF
0,28	1,00	0,571	S	0,132	SF	26,591	AMF
0,56	2,00	0,279	SF	0,286	SF	87,495	AMF
1,13	4,00	0,297	SF	0,355	S	30,74	AMF
2,25	8,00	0,166	SF	0,822	SM	20,601	AMF
4,50	16,00	0,13	SF	1,718	A	10,432	AMF

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: r: coeficiente de correlação linear, CI: *combination index*, HaCat: queratinócitos normais, HCT-8: adenocarcinoma colorretal, UI: Unidades Internacionais. Os símbolos utilizados para indicar o efeito se encontram descritos na Tabela 1; em verde são indicadas as variações do efeito antagônico, e em amarelo as variações do efeito sinérgico.

6.2 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO NA CARCINOGENESE COLORRETAL

6.2.1 Avaliação da toxicidade

Durante todo o período de tratamento com a vitamina D e os probióticos e/ou indução das lesões pré-neoplásicas, o consumo de água e o peso corpóreo dos animais foram mensurados a fim de detectar possíveis sinais de toxicidade provenientes dos tratamentos. Os resultados de peso inicial e final, ganho de peso e consumo de água encontram-se apresentados na Tabela 11.

Não foi constatada diferença estatística no consumo de água ou no ganho de peso dos animais de nenhum dos grupos de tratamento quando comparados ao controle negativo (Tabela 11), indicando ausência de efeitos tóxicos dos tratamentos avaliados. Dados da literatura também apontam ausência de sinais de toxicidade, como alterações de peso, padrão alimentar e parâmetros bioquímicos em ratos Wistar, resultante da ingestão de vitamina D (DETRIGIACHI *et al.*, 2016) ou de probióticos do gênero *Lactobacillus* (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2016; THUMU; HALAMI, 2020; TSAI *et al.*, 2014; ZAINALABIDIN; TAN; YAP, 2018). Em humanos, o limite máximo tolerável de ingestão de vitamina D, segundo o *Institute of Medicine* (EUA), é de 4000 UI/dia para adultos acima de 18 anos (INSTITUTE OF MEDICINE (US). COMMITTEE TO REVIEW DIETARY REFERENCE INTAKES FOR CALCIUM AND VITAMIN D, 2011), enquanto probióticos não possuem especificações e são em geral reconhecidos como seguros pelo FDA (EUA) (ZAWISTOWSKA-ROJEK; TYSKI, 2018). Em conjunto com os dados reportados pela literatura, tais achados sugerem ausência de toxicidade da administração dos tratamentos.

Em contraste, foi detectado ganho de peso significativamente maior dos grupos tratados sob a estratégia de pré-tratamento em relação ao controle positivo ($p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,0001$) (Tabela 11). Esses dados não implicam em toxicidade, uma vez que é a perda de peso inesperada que tem mostrado valor preditivo positivo no diagnóstico de câncer colorretal e outros (NICHOLSON *et al.*, 2018), com alta correlação nas faixas etárias acima de 50 para homens e 70 anos para mulheres (NICHOLSON *et al.*, 2020)

Tabela 11 – Valores médios e desvio-padrão do peso inicial e final, ganho de peso e consumo de água obtidos em ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos e respectivos grupos controle.

Grupos de tratamento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de água (mL/dia)
Controle negativo	281,25±47,51	345,75±48,26	64,50±4,80	35,94±3,51
Controle solvente	278,33±49,74	353,67±64,22	75,33±23,12	33,03±4,76
Vit D 2000 UI	287,00 ±6,38	357,25±13,50	70,25±12,69	39,63±1,61
Prob 10 ⁷ UFC	314,50±12,15	408,50±25,51	94,00±22,32	42,66±2,02
Solvente + DMH (simult.)	311,83±65,95	359,50±29,58	47,67±70,40	44,00±5,04
Vit D 250 UI + DMH (simult.)	255,33±10,13	313,00±21,1	57,67±13,22	42,44±2,26
Vit D 2000 UI + DMH (simult.)	265,5±23,36	314,00±25,34	48,50±9,20	38,19±3,73
Prob 10 ⁵ UFC + DMH (simult.)	299,00±26,66	354,67±29,09	27,83±30,77	14,44±15,82
Prob 10 ⁷ UFC + DMH (simult.)	278,50±47,64	329,33±58,82	50,83±16,38	38,25±3,20
Comb 250 UI + 10 ⁷ UFC + DMH (simult.)	297,50±11,36	313,83±18,65	16,33±8,12	46,89±4,24
Comb 2000 UI + 10 ⁷ UFC + DMH (simult.)	307,67±10,82	324,00±13,52	16,33±5,85	36,88±1,51
Solvente + DMH (pré-trat.)	280,33±30,16	342,0±33,68	61,67±43,93	35,52±5,48
Vit D 250 UI + DMH (pré-trat.)	223,8±12,68	309,8±18,05	86,00±17,9 *	27,05±5,38
Vit D 2000 UI + DMH (pré-trat.)	216,33±22,70	301,83±21,81	85,50±24,45 *	30,58±9,40
Prob 10 ⁵ UFC + DMH (pré-trat.)	208,33±14,72	295,33±23,91	87,00±21,37 **	28,98±6,00
Prob 10 ⁷ UFC + DMH (pré-trat.)	195,00±40,29	296,20±23,68	101,20±42,15 **	35,68±5,07
Comb 250 UI + 10 ⁷ UFC + DMH (pré-trat.)	170,67±12,06	290,17±40,58	127,38±37,68 ***	40,58±0,27
Solvente + DMH (pós-trat.)	307,33±72,44	366,33±47,33	59,00±53,43	39,71±5,16
Vit D 250 UI + DMH (pós-trat.)	338,33±46,04	379,33±38,92	41,00±24,65	31,83±5,80
Vit D 2000 UI + DMH (pós-trat.)	325,50±38,98	360,50±24,13	35,00±19,96	26,65±0,02
Prob 10 ⁵ UFC + DMH (pós-trat.)	326,83±10,01	364,00±16,94	37,17±18,99	29,29±2,19
Prob 10 ⁷ UFC + DMH (pós-trat.)	328,60±38,79	370,80±17,40	35,17±26,49	29,48±6,14
Comb 2000 UI + 10 ⁷ UFC + DMH (pós-trat.)	291,17±24,06	363,00±44,41	71,83±22,36	34,67±5,49

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* e *B. bifidum*, UI: unidades internacionais, UFC: unidades formadoras de colônia, DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Os valores são média±desvio padrão. *p<0,01; **p<0,05; **** p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). n = 6 (por grupo).

6.2.2 Avaliação da carcinogenicidade

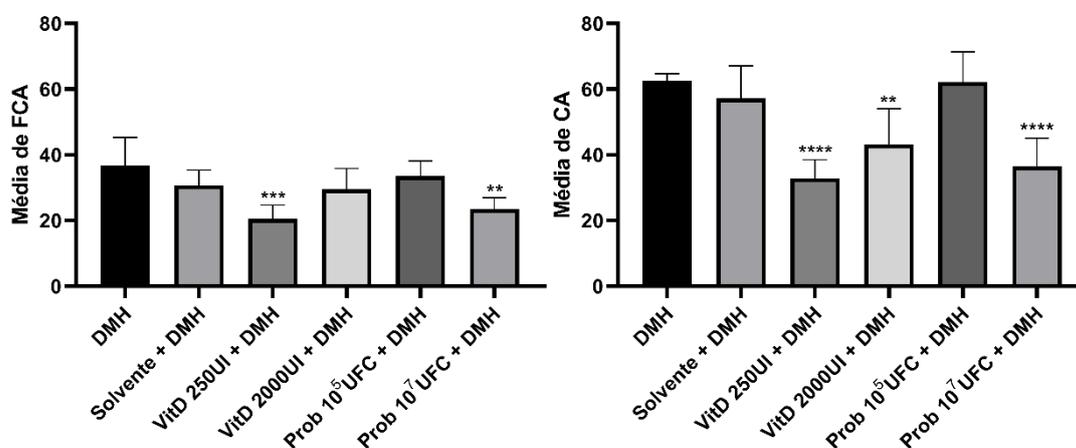
Para a avaliação da carcinogenicidade no cólon distal de ratos Wistar, os animais foram tratados apenas com as maiores doses de vitamina D (2000 UI) e probióticos (10⁷ UFC), além dos grupos controle negativo (água via gavagem e EDTA 1 mM s.c.) e

solvente (óleo vegetal 10%), sem a aplicação do indutor de carcinogênese (DMH). Não foram observadas alterações nos cortes histológicos dos animais dos grupos descritos, confirmando a ausência de potencial carcinogênico dos tratamentos (Apêndice B).

6.2.3 Tratamento Simultâneo

A fim de investigar uma possível modulação do efeito de diferentes estratégias, foram adotadas neste estudo as abordagens pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento simultâneo. A presença de FCA e CA na porção distal do cólon de cada animal foi utilizada como parâmetro para avaliação do efeito anticarcinogênico. Os resultados obtidos no modelo de administração de vitamina ou probióticos concomitante à indução das lesões pré-neoplásicas com DMH, denominado tratamento simultâneo, são apresentados no Apêndice C e na Figura 16.

Figura 16 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia.

No que se refere aos FCA, os resultados mostraram diferenças estatísticas apenas nos grupos tratados com vitamina D 250 UI + DMH e Probiótico 10⁷ UFC + DMH, em relação ao grupo tratado apenas com DMH ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, Figura 16). Em relação ao número de CA, o efeito de redução de lesões pré-neoplásicas foi observado para os

probióticos na maior dose combinada ao DMH (10^7 UFC + DMH, $p < 0,001$) e nas duas doses de vitamina D combinadas ao DMH (250 UI + DMH e 2000 UI + DMH) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle positivo (DMH) (Figura 16).

Interessantemente, maior significância foi observada com a menor dose testada de vitamina D (250 UI + DMH), além da dose de 10^7 UFC do mix de probióticos + DMH, com redução respectiva de 48,4% e 42,7% no número de CA em relação ao grupo DMH. Não foi encontrada diferença estatística entre o grupo tratado com probióticos na menor dose e o controle positivo, da mesma forma que não se observou influência do solvente (óleo vegetal 10%) combinado à administração de DMH sobre os efeitos quimiopreventivos observados. Na razão CA/FCA, por sua vez, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (Apêndice C) e a multiplicidade de criptas mostra presença, em maioria, de FCA contendo uma CA, de maneira condizente com o relatado na literatura, que reporta que a maioria dos FCA resultantes de 4 semanas de exposição ao carcinógeno DMH se mostra com 1 ou 2 criptas aberrantes (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Uma vez que evidências mostram que o crescimento de FCA se dá pela fissão de criptas, diversos autores consideram a multiplicidade de criptas, isto é, o número de criptas aberrantes por foco, ser mais preditiva da transformação tumoral que o número total de FCA (RENEHAN *et al.*, 2002; SUZUI; MORIOKA; YOSHIMI, 2013). Assim, os resultados encontrados no presente estudo indicam efeito protetor das doses descritas de vitamina D e probióticos sobre a carcinogênese colônica, baseado principalmente no número de CA. Esses achados se encontram em concordância com dados da literatura que reportam a redução de 25 a 30 % no número de CA associada à administração de 10^7 a 10^9 UFC probióticos das espécies *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus gasseri* (FOO *et al.*, 2011), de 55,7% após administração de *L. delbrueckii* e de 45,1% com a administração de *B. animalis* var. *lactis* em modelo de carcinogênese colônica induzida por DMH em camundongos (LIBOREDO *et al.*, 2013). Murillo *et al.* (2010) mostraram a redução da incidência e tamanho de tumores em camundongos tratados com 1-25-dihidroxitamina D3 em modelo de carcinogênese induzida por azoximetano (AOM) e dextran sulfato de sódio (DSS). Uma redução do número de FCA e CA após administração de 100 UI/kg p.c. de vitamina D3 em modelo de neoplasia colônica associada a colite induzida por DMH/DSS foi também demonstrada por Li *et al.* (2015).

A dose diária recomendada para manutenção de níveis séricos saudáveis de 1,25-dihidroxitamina D3 (acima de 30 $\mu\text{g/mL}$) varia segundo diversos órgãos de saúde

governamentais. De acordo com as diretrizes publicadas pela *Endocrine Society*, 600 UI diárias de vitamina D seriam adequadas para manutenção da saúde óssea e muscular em condições mínimas de síntese cutânea, porém 1500 a 2000 UI seriam indicadas para elevar os níveis séricos com consistência e possibilitar benefícios além dos esqueléticos (HOLICK *et al.*, 2011).

No experimento piloto do presente trabalho (Apêndice A), foram utilizadas as doses de 500 UI, 1000 UI e 2000 UI por dia de tratamento, demonstrando efeito preventivo da maior dose avaliada. No entanto, estudos também realizados em modelos animais de carcinogênese química retornam dados a partir de doses mais baixas que as recomendações diárias, como o de Refaat *et al.* (2015), que utilizou 500 UI/dia e encontrou efeito significativo na redução do número de tumores colônicos em cerca de 47,7%, semelhante ao promovido pela administração de 5-FU. Li *et al.* (2015) demonstraram que doses de 30 a 300 UI por quilograma de peso corpóreo acarretaram também uma queda significativa no número de CA e FCA.

A partir disso, foi adicionado um grupo com dose diária de 250 UI, a qual por sua vez acarretou efeito protetor mais destacado que a maior dose. Esse grupo também permite satisfazer as recomendações de determinação de doses em quimioprevenção/quimioterapêutica, uma vez que se busca maximizar o efeito mantendo níveis aceitáveis de efeitos adversos (citotóxicos) e de tolerância em futuros ensaios de fase I e II (HOURDEQUIN *et al.*, 2013). Assim, foram escolhidas para dar seguimento aos experimentos as doses de 2000 UI e 250 UI por serem, respectivamente, a maior dose recomendada pelas diretrizes internacionais e uma dose menor que a recomendação diária.

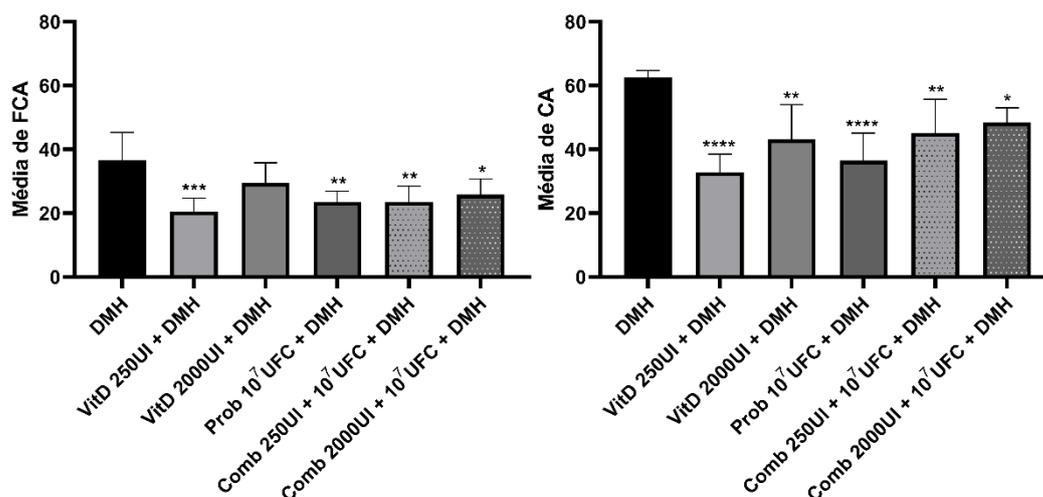
Quanto à administração de probióticos, são recomendadas pelas diretrizes da *World Gastroenterology Organisation* (Organização Mundial de Gastroenterologia) doses variando na grandeza de 10^7 a 10^{11} UFC por dia, a depender da condição de saúde em foco (GUARNER *et al.*, 2017). Com base nisso, foram utilizadas as doses piloto de 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/dia (Apêndice A), sendo observados efeitos nos três grupos, porém mais pronunciados na menor dose. Foi então adicionado o grupo tratado com 10^5 UFC/dia, a fim de testar a hipótese de redução da dose tal como avaliado para a vitamina D. Nesse caso, no entanto, mostrou-se a ausência de efeito da menor dose (Figura 16), de maneira congruente às orientações das diretivas mundiais e à literatura existente (FAHMY *et al.*, 2019; FOO *et al.*, 2011; GENARO *et al.*, 2019; IRECTA-NÁJERA *et al.*, 2017; LIBOREDO *et al.*, 2013).

A administração oral de *Lactobacillus casei* foi investigada por Irecta-Nájera *et al.* (2017) também sobre modelos de carcinogênese química induzida no cólon de ratos, onde foi demonstrado que a suplementação com tal probiótico é capaz de reduzir significativamente o número de focos de criptas aberrantes. Tiptiri-Kourpeti *et al.* (2016) observaram redução de 80% no volume tumoral em animais tratados com a mesma estirpe bacteriana, além de aumento em proteínas indutoras de apoptose. Foo *et al.* (2011) estudaram o efeito do tratamento com *B. longum* e/ou *L. gasseri* no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e tumores no cólon de camundongos, com resultados semelhantes sobre a multiplicidade e tamanho dos tumores. Os dados da literatura apontam então para a existência mecanismos de ação variados sobre a carcinogênese colônica, que em conjunto com os resultados aqui obtidos, corroboram um grande potencial quimiopreventivo *in vivo* (DE ALMEIDA *et al.*, 2019).

Levando em conta as doses com efeito estatisticamente significativo de cada tratamento, foram testadas também as combinações de vitamina D e probióticos, estabelecendo os seguintes grupos: Vit D 250 UI + Prob 10^7 UFC + DMH e Vit D 2000 UI + Prob 10^7 UFC + DMH, que foram também comparados ao grupo controle positivo (DMH). As médias resultantes do ensaio de FCA encontram-se apresentadas no Apêndice C e Figura 17.

Foi possível observar efeito significativo na redução de FCA em decorrência dos tratamentos combinados de ambas as doses, de 29,1% e 23,8% para as combinações de Vit D 250 UI + Prob 10^7 UFC + DMH e Vit D 2000UI + Prob 10^7 UFC + DMH, respectivamente, quando comparado ao grupo DMH ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), porém não em relação aos grupos de tratamentos isolados (Apêndice C, Figura 17). Neste sentido, infere-se então que a administração de vitamina D e probióticos não possuem efeito sinérgico sobre a carcinogênese no modelo testado. Uma hipótese é que a interação da 1,25-dihidroxitamina D₃, sendo capaz de regular a composição e função da microbiota bacteriana intestinal, além da resposta imune inata do hospedeiro ao microbioma (FAKHOURY *et al.*, 2020; SHANG; SUN, 2017), desenvolva efeitos semelhantes de forma isolada ou associada a probióticos. Assim, a investigação de alvos moleculares modulados pelos tratamentos isolados e pela combinação poderá esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos, nas próximas seções.

Figura 17 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com probióticos e/ou vitamina D de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, Comb: combinação de vitamina D com mix de probióticos. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia

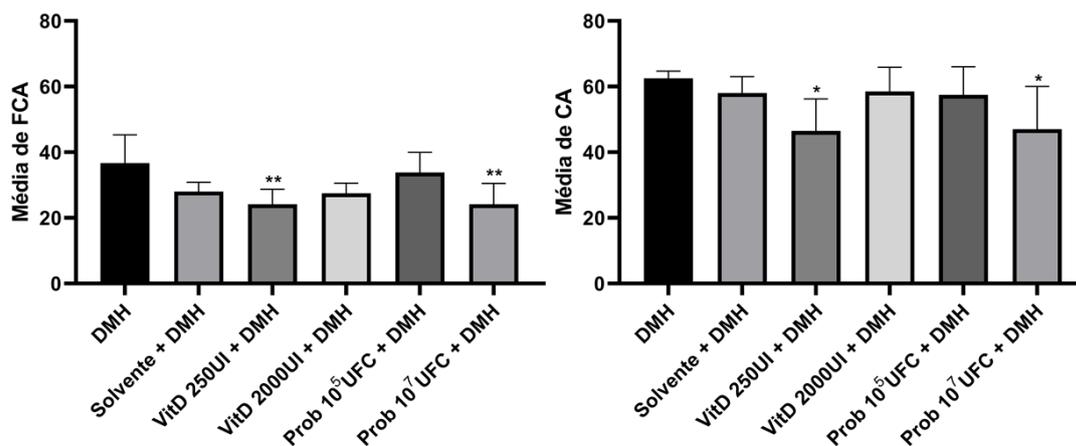
Nota: Os dados dos grupos VitD 250UI + DMH, VitD 2000UI + DMH e Prob 10⁷ UFC + DMH foram apresentados na Figura 16 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

6.2.4 Pré-Tratamento

Tomando como base os resultados prévios do esquema de tratamento simultâneo no ensaio piloto, foram utilizadas as doses de 250 e 2000 UI de vitamina D e 10⁵ e 10⁷ UFC de probióticos para avaliar o potencial quimiopreventivo de tais tratamentos, então administrados previamente à aplicação do carcinógeno DMH.

Os resultados das médias de FCA e CA na porção distal do cólon de cada grupo de tratamento encontram-se apresentados no Apêndice D e na Figura 17. Observa-se uma redução estatisticamente significativa no número de FCA apenas no tratamento com a menor dose de Vitamina D (250 UI) ($p < 0,01$), de 27,0% em relação ao controle positivo, além de efeito também significativo ($p < 0,01$) de 26,2% resultante da administração do mix de probióticos na dose de 10⁷ UFC. No tocante à redução de CA, os mesmos grupos, tratado com Vitamina D à dose de 250 UI + DMH e tratado com Probióticos na dose de 10⁷ UFC + DMH também apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) (Apêndice D, Figura 18).

Figura 18 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com probióticos ou vitamina D de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



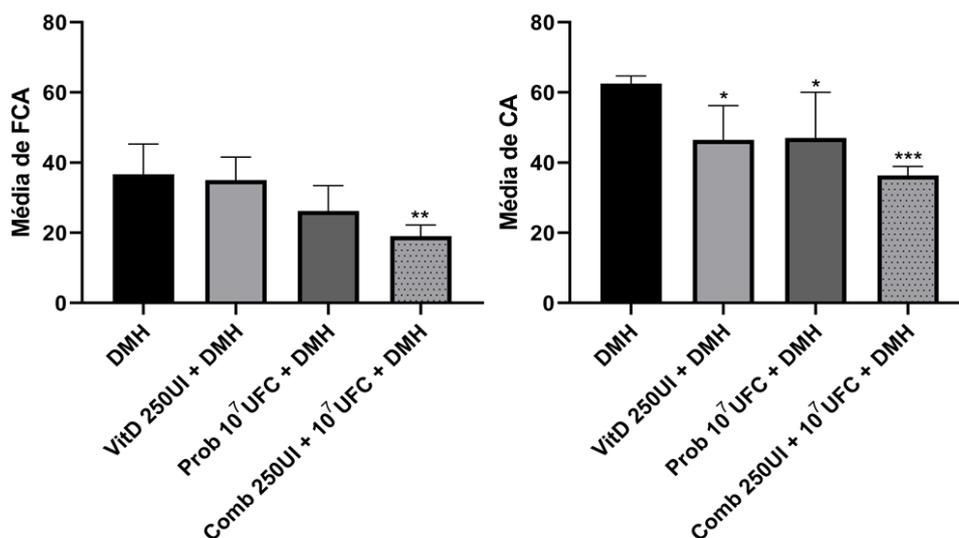
Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia.

Mais uma vez, observa-se a ação dos tratamentos sobre a multiplicidade de criptas aberrantes, refletida no número de CA (Figura 18), o que indica uma modulação sobre eventos relacionados à iniciação da carcinogênese (RENEHAN *et al.*, 2002; SUZUI; MORIOKA; YOSHIMI, 2013), portanto apontando para um efeito protetor no modelo testado. Da mesma maneira que no tratamento simultâneo, a estratégia de administração do mix de probióticos de maneira anterior à indução da carcinogênese corrobora dados encontrados na literatura, como apresentado em um estudo com camundongos que demonstrou redução de até 68,1% de CA, a partir de tratamento com a espécie *Lactobacillus casei* 393, 2 semanas antes do início da aplicação de DMH (IRECTA-NÁJERA *et al.*, 2017). Esses resultados são também condizentes com o observado por Appleyard *et al.* (2011) após administração de probiótico comercial incluindo $3,3 \times 10^9$ UFC de oito espécies de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* para animais com colite crônica quimicamente induzida, nos quais observou-se menor severidade inflamatória em comparação a grupos controle e ausência de diagnóstico de carcinoma colorretal.

Com base no efeito significativo das doses isoladas acima citadas, foi realizado o tratamento com a combinação de vitamina D e probióticos, originando os grupos Vitamina D 250 UI + Probióticos 10^7 UFC + DMH no esquema de pré-tratamento. As médias obtidas pelo ensaio de FCA encontram-se no Apêndice D e Figura 19.

Figura 19 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, Comb: combinação de vitamina D com mix de probióticos, UI: unidades internacionais, UFC: unidades formadoras de colônia

Nota: Os dados dos grupos VitD 250UI + DMH e Prob 10⁷UFC + DMH foram apresentados na Figura 18 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

Nota-se redução estatisticamente significativa do número de FCA decorrente do tratamento ($p < 0,01$), em 51,1% em relação ao controle positivo, como também de 42,9% do número de CA do mesmo grupo ($p < 0,001$, Figura 19). Tal efeito se mostra marcadamente mais acentuado do que o identificado a partir dos tratamentos isolados, o que indica potencialização da atividade anticarcinogênica da vitamina D e do mix de probióticos utilizado.

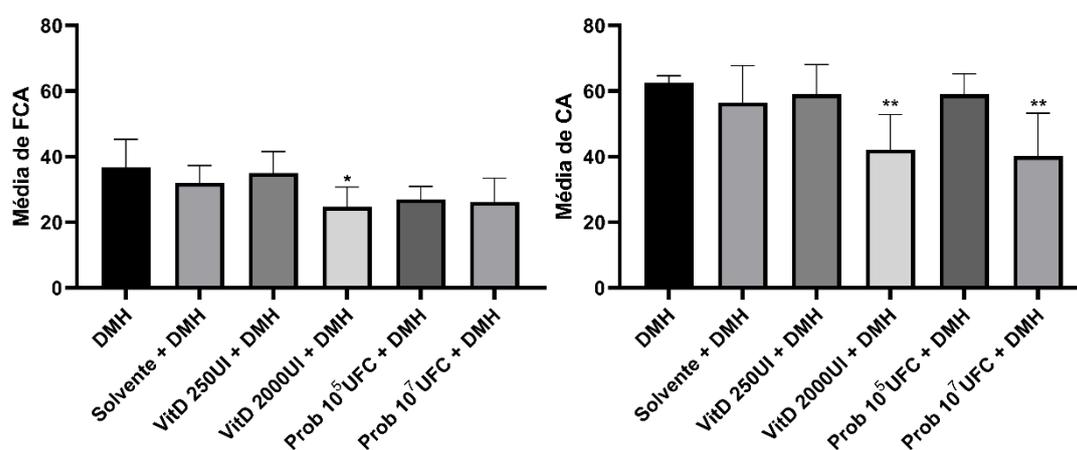
Uma vez que se tem em foco a quimioprevenção, voltada para a administração de agentes quimiopreventivos por longos períodos de tempo ou mesmo por toda a vida do paciente, é vantajoso que o composto de interesse apresente efetividade em baixas doses, além de ser de fácil acesso e administração, de baixa toxicidade, baixo custo e nenhuma ou reduzida incidência de efeitos colaterais (PENNY; WALLACE, 2015). Com suas propriedades conhecidas, a rara ocorrência de efeitos adversos, associada apenas à hipercalcemia decorrente de ingestão excessiva de vitamina D (acima de 10000 UI por dia) (TEBBEN; SINGH; KUMAR, 2016) e a casos de dor abdominal em pacientes com doença inflamatória intestinal após administração de probióticos (DORE *et al.*, 2019), e a baixa dose efetiva demonstrada neste trabalho para a vitamina D e probióticos, entende-se que estes tratamentos atendem a todas as características idealmente encontradas em

um agente quimiopreventivo, destacando o potencial de sua aplicação em estratégias de prevenção.

6.2.5 Pós-Tratamento

Seguindo as doses determinadas no esquema de tratamento simultâneo, foram realizados os grupos de 250 UI de vitamina D + DMH, 2000 UI de vitamina D + DMH, 10^5 de probióticos + DMH e 10^7 UFC de probióticos + DMH para avaliar os efeitos da administração posterior à aplicação do carcinógeno DMH. Os resultados das médias de FCA e CA na porção distal do cólon de cada grupo de tratamento encontram-se apresentados no Apêndice E e na Figura 20.

Figura 20 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia.

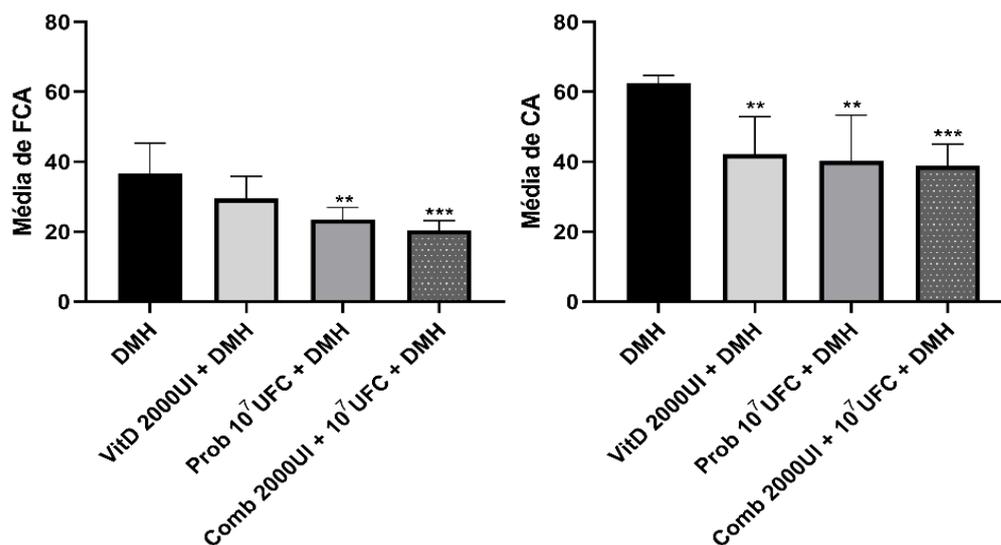
É possível notar o efeito de redução do número de CA de maneira estatisticamente significativa apenas no tratamento com a maior dose de Vitamina D (2000 UI + DMH) ($p < 0,05$), de 34,1% em relação ao controle positivo, além de 37,2% decorrente da administração de probióticos na dose de 10^7 UFC + DMH ($p < 0,05$) (Apêndice E, Figura 20). Por outro lado, no referente à redução de FCA, apenas o grupo tratado com Vitamina D na dose de 2000 UI + DMH apresentou significância estatística (Figura 20), mantendo-se a provável ação do tratamento com vitamina D sobre a multiplicidade de criptas

aberrantes e número de CA, enquanto para os probióticos o efeito significativo se mostra apenas sobre o número total de CA e não sobre FCA, embora uma diminuição possa ser observada (RENEHAN *et al.*, 2002; SUZUI; MORIOKA; YOSHIMI, 2013).

Somando-se às evidências citadas anteriormente, nas diversas estratégias de tratamento com vitamina D e probióticos de diferentes espécies, tais resultados ratificam o reportado na administração de *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium lactis*, e *B. bifidum* em um total de 10^9 UFC por animal após o término do período de indução da carcinogênese por DMH em ratos Fisher F344, a qual resultou em menor incidência de FCA e CA quando comparados ao grupo de controle positivo, como também a incidência de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma *in situ* e adenoma tubular no cólon dos animais (GENARO *et al.*, 2019).

Uma vez observado efeito estatisticamente significativo desses grupos de tratamento, foi testada também a combinação de vitamina D e probióticos, originando o seguinte grupo: Vitamina D 2000 UI + Probióticos 10^7 UFC + DMH que foi, também, comparado ao grupo controle positivo (DMH). As médias resultantes do ensaio de FCA encontram-se no Apêndice E e Figura 21.

Figura 21 – Médias de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, Comb: combinação de vitamina D com mix de probióticos, UI: unidades internacionais, UFC: unidades formadoras de colônia

Nota: Os dados dos grupos VitD 2000UI + DMH e Prob 10^7 UFC + DMH foram apresentados na Figura 20 e aqui reapresentados para facilitar a comparação.

Nota-se, então, efeito com maior significância estatística na redução de CA e FCA em decorrência dos tratamentos combinados, de 39,3% e 50,2%, respectivamente, quando comparado ao grupo DMH ($p < 0,001$) (Apêndice E, Figura 21). Assim, infere-se que a ação terapêutica da combinação é tão efetiva quanto dos isolados. No entanto, não foi detectada diferença estatística em relação aos grupos de tratamentos isolados, o que indica que a combinação não apresenta potencialização de seus efeitos em separado sobre a carcinogênese no esquema testado. É possível, como citado anteriormente, que os efeitos da ativação do VDR pela 1,25-dihidroxitamina D3 sobre a microbiota intestinal (BATTISTINI *et al.*, 2020; FAKHOURY *et al.*, 2020; SHANG; SUN, 2017) resultem em efeitos equivalentes nesse aspecto, estando de maneira associada ou não a probióticos.

Tendo em vista a existência de âmbitos de congruência na ação da vitamina D e de probióticos, como na modulação de vias inflamatórias, regulação do ciclo celular e do perfil de acetilação de histonas (CHRISTAKOS *et al.*, 2016; EL-SHARKAWY; MALKI, 2020; FARROKHI *et al.*, 2020), e de particularidades de suas respectivas atividades, como a inibição da via Wnt/ β -catenina já demonstrada pela vitamina D (FERRER-MAYORGA *et al.*, 2019) e a biotransformação de compostos no lúmen intestinal por probióticos (SHUWEN *et al.*, 2019), a comparação dos efeitos dos tratamentos isolados com os efeitos da combinação sobre pontos específicos da sinalização celular é imprescindível para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos tratamentos.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL

Dada a modulação do microbioma colônico, tanto pelo tratamento com probióticos como pela vitamina D, relatada na literatura (BELLERBA *et al.*, 2021; SONG; CHAN, 2019), foi realizada a caracterização da composição bacteriana das fezes dos animais submetidos aos principais tratamentos. Foram avaliados os grupos controle negativo (água + EDTA 1 mM), solvente (óleo vegetal 10%) e positivo (DMH 40 mg/kg p.c), e as maiores doses dos tratamentos (Vitamina D 2000 UI + DMH e Probióticos 10^7 UFC + DMH) da abordagem de tratamento simultâneo, o qual fundamentou a aplicação das outras estratégias (pré e pós-tratamento). A abundância microbológica dos grupos estudados encontra-se apresentada na Figura 22.

Figura 22 – Abundância microbiológica encontrada nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese



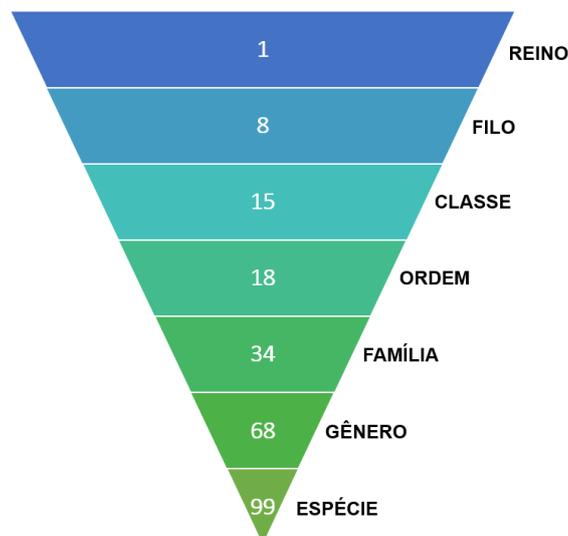
Fonte: Do autor (2022)

Legenda: CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), CS: controle solvente (óleo vegetal 10%), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D 2000 UI, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum* (10^7 UFC), EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Foi constatado maior número de sequências bacterianas nos grupos não tratados (controles negativo e solvente), seguido do grupo tratado com DMH, em relação aos grupos expostos a vitamina D e a probióticos (Figura 22). A menor diversidade e riqueza de espécies é em geral, associada a estados patológicos, visto que favorece a predominância de estirpes patogênicas sobre bactérias benéficas (DOS REIS *et al.*, 2017; HILLS *et al.*, 2019; THURSBY; JUGE, 2017). No entanto, tais achados se mostram divergentes aos encontrados neste trabalho, que demonstra uma menor incidência de FCA nos grupos tratados com vitamina D e probióticos em todas as abordagens de tratamento. Sendo a disbiose definida como um estado alterado da composição da microbiota (RINNINELLA *et al.*, 2019), apenas o número de espécies não é capaz de informar sobre os efeitos dos tratamentos, de maneira que foram também analisados os padrões de composição taxonômica da microbiota fecal de cada grupo de tratamento a fim de obter informações que permitam esclarecer a variação microbiológica apresentada entre as amostras e verificar se há correlação entre os tipos de microorganismos e o efeito protetor observado no ensaio de FCA.

A Figura 23 apresenta o número de taxonomias encontradas nas fezes de ratos Wistar tratados de maneira simultânea à indução de carcinogênes, e a composição taxonômica da microbiota fecal de cada grupo avaliado encontra-se apresentada na Figura 24, que apresenta o perfil microbiológico proporcional, e na Figura 25, que demonstra o perfil microbiológico quantitativo.

Figura 23 – Número de taxonomias encontradas nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.



Fonte: Do autor (2022).

Foram detectadas sequências de 8 diferentes filos bacterianos. Os filos mais abundantes foram o filo Firmicutes e o filo Bacteroidetes. No total de 34 famílias, 68 gêneros e 99 espécies encontrados (Figura 23), os organismos mais frequentes são pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, gênero *Streptococcus* e família Peptostreptococcaceae, dentre outros sob o filo Firmicutes (Figura 24 e Figura 25).

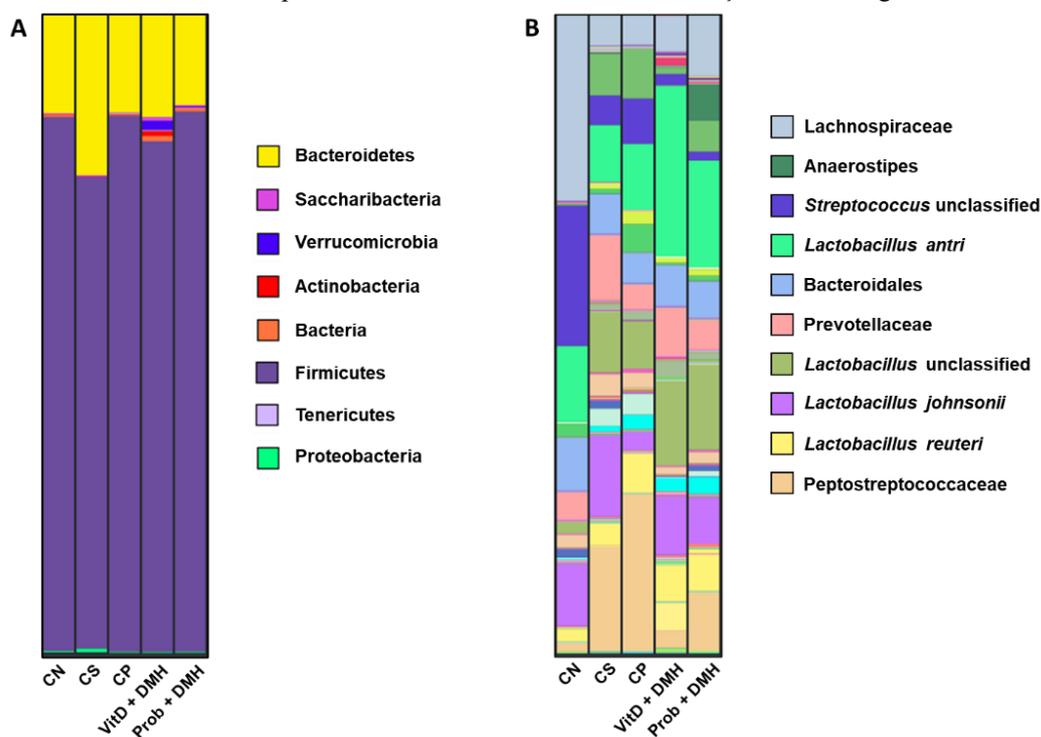
A distribuição das espécies, em nível quantitativo, difere a depender do grupo em estudo. Observa-se o aumento em Bacteroidetes e Proteobacteria no grupo tratado com o indutor de carcinogênese (DMH), se comparado ao grupo controle negativo (Figura 24A), além de predominância no controle positivo de espécies da família Peptostreptococcaceae (Figura 24B). Tal perfil se mostra condizente com o reportado em pacientes de CCR, nos quais são encontradas maiores proporções de espécies do filo Bacteroides como *Alistipes* spp., e do filo Proteobacteria, como *Shigella* spp., além de aumento de *Peptostreptococcus stomatis*, da família Peptostreptococcaceae (SAUS *et al.*, 2019).

No grupo tratado com vitamina D, observou-se aumento dos filos Actinobacteria e Verrucomicrobia se comparado aos grupos controle negativo, solvente e positivo (Figura 25A), o que se correlaciona com dados da literatura de aumento da abundância de gêneros como *Bifidobacterium*, do primeiro filo, e *Akkermansia*, do segundo filo, após suplementação com 1,25-dihidroxitamina D (BELLERBA *et al.*, 2021). Progredindo nos níveis taxonômicos (Figura 25B), destaca-se o aumento relativo de abundância de espécies *Lactobacillus* spp., também de acordo com o esperado no aumento de

organismos do filo Firmicutes, relatado por estudos em humanos e animais (BELLERBA *et al.*, 2021).

Já no grupo tratado com probióticos, foi detectada a redução de bactérias do filo Bacteroidetes (Figura 25A), além da família Peptostreptococcaceae e do gênero *Streptococcus* do filo Firmicutes (Figura 25B), as quais se encontram muitas vezes aumentados em pacientes com CCR, representando modulação positiva da microbiota (SAUS *et al.*, 2019). Ainda, o aumento de espécies do gênero *Lactobacillus*, tal como no grupo tratado com vitamina D + DMH, também representa fator protetor, uma vez que é correlacionado inversamente a doenças gastrointestinais em geral (BHATTARAI; PEDROGO; KASHYAP, 2017).

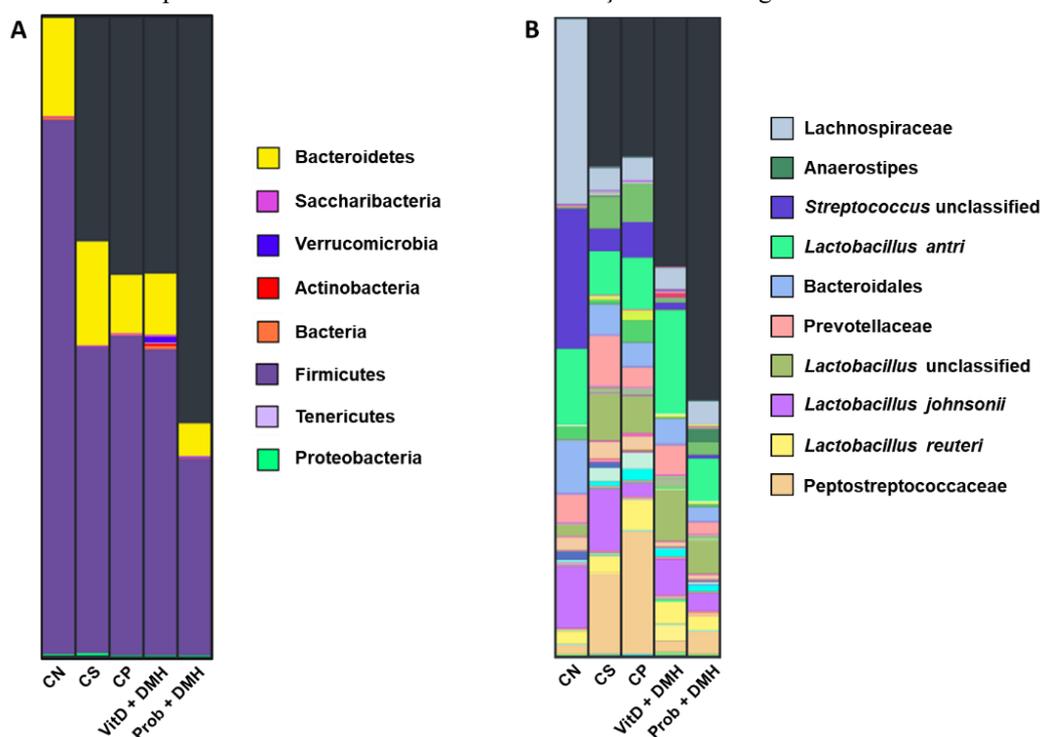
Figura 24 – Perfil microbiológico proporcional encontrado nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) Filos e (B) espécies, famílias ou ordens mais comuns. CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), CS: controle solvente (óleo vegetal 10%), CP: controle positivo (DMH), Vit D: vitamina D (2000 UI), Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum* (10^7 UFC), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Figura 25 – Perfil microbiológico quantitativo encontrado nas fezes de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: (A) Filos e (B) espécies, famílias ou ordens mais comuns. CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), CS: controle solvente (óleo vegetal 10%), CP: controle positivo (DMH), Vit D: vitamina D (2000 UI), Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum* (10^7 UFC), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Em pacientes com a síndrome do intestino irritável (IBS, *Irritable Bowel Syndrome*), associada a elevado risco para o CCR, a microbiota encontra-se enriquecida em diversas espécies pertencentes aos filios Proteobacteria e Firmicutes, porém com a concentração de *Lactobacillus* reduzida quando comparado a indivíduos saudáveis, e diminuída em Actinobacteria e Bacteroidetes, tal como identificado neste trabalho nos grupos tratados com vitamina D e probióticos em relação ao grupo tratado com DMH. Muitos estudos associam tal perda de diversidade com a desregulação de funções como a síntese de aminoácidos, a manutenção da integridade de junções celulares, a modulação da resposta inflamatória e outros fatores que contribuem para o processo patogênico (BHATTARAI; PEDROGO; KASHYAP, 2017). Inversamente, nas doenças inflamatórias intestinais (IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*) como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, que representam importantes fatores de risco na carcinogênese do cólon, populações dos filios Firmicutes e Bacteroidetes mostram-se reduzidas, com aumento nas famílias de Proteobacteria, de maneira que sugere-se sua correlação com a severidade dos sintomas mas não necessariamente uma correlação causal com sua patofisiologia

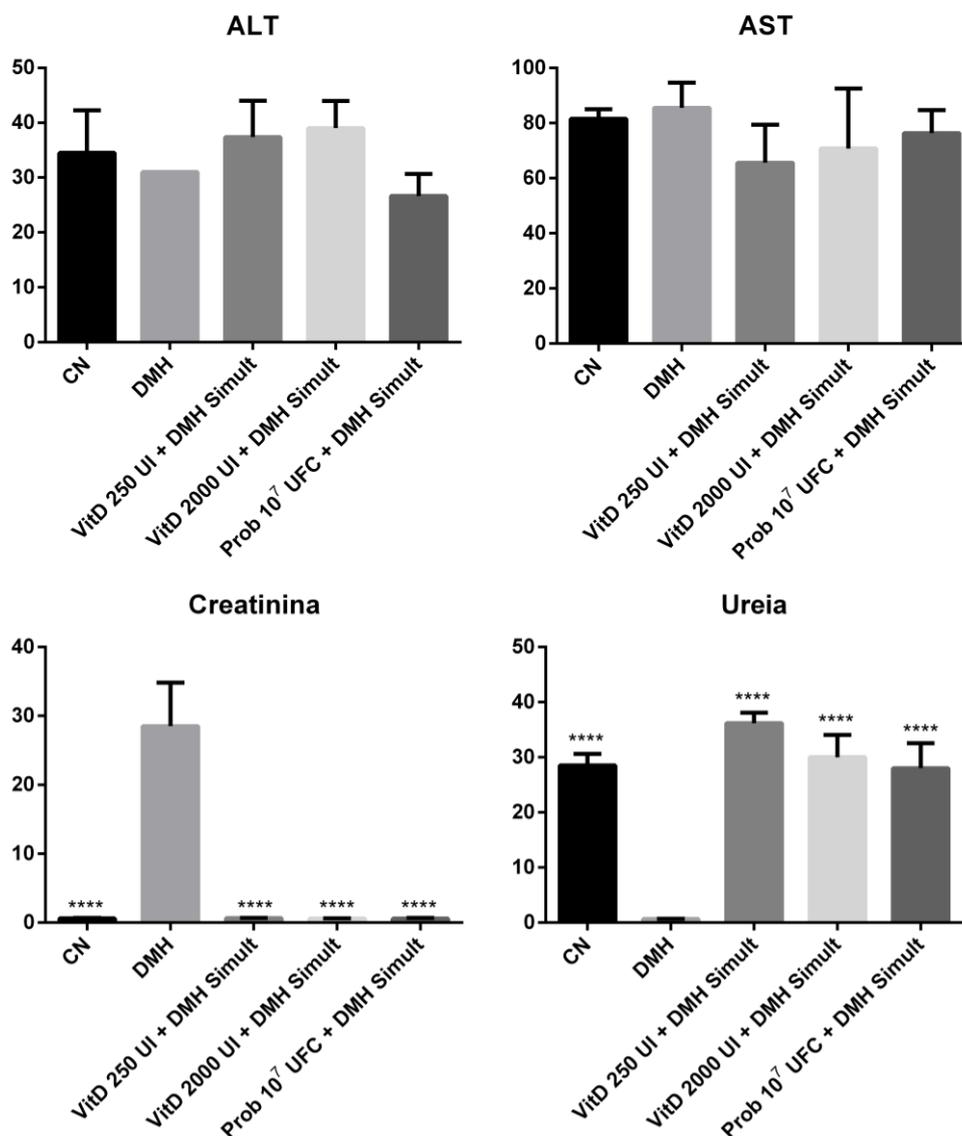
(RINNINELLA *et al.*, 2019). De maneira semelhante, pacientes com câncer colorretal apresentam redução de Bacteroidetes e Firmicutes e aumento de Proteobacteria quanto a voluntários saudáveis, indicando a redução de espécies produtoras de butirato e expansão de patógenos oportunistas (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Os resultados aqui apresentados confirmam, então, a relação da composição da microbiota intestinal com a indução da carcinogênese, como também a capacidade de modulação pela suplementação com vitamina D e probióticos no modelo utilizado. Neste aspecto, os dados indicam a aquisição de perfil microbiológico inverso aos padrões de risco, com aumento de *Lactobacillus spp.* e gêneros pertencentes a Actinobacteria nos grupos tratados, representando possível proteção a eventos carcinogênicos. Neste sentido, pode-se assumir que o efeito protetor pode estar relacionado não somente ao tipo de microorganismo apresentado por cada grupo, mas ainda, pela quantidade (maior ou menor) de tais filos coexistentes em cada grupo avaliado.

6.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

A fim de avaliar o efeito dos tratamentos sobre a toxicidade hepática e renal, foram realizadas dosagens bioquímicas dos biomarcadores alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), creatinina e ureia no soro dos animais ao final dos tratamentos. Foram selecionados os grupos de tratamentos isolados da abordagem simultânea que obtiveram efeito significativo na redução de lesões pré-neoplásicas (Vitamina D 250 UI + DMH, Vitamina D 2000 UI + DMH, Probióticos 10^7 UFC + DMH), visto que foram utilizados como embasamento para os ensaios subsequentes. O grupo solvente + DMH não foi investigado visto que não apresentou influência nos efeitos quimiopreventivos ou carcinogênicos detectados no ensaio de FCA (Seção 6.2). Os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados encontram-se apresentados na Apêndice F e na Figura 26.

Figura 26 – Parâmetros bioquímicos determinados no soro de ratos Wistar tratados vitaminas D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: **** p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, CN: controle negativo água + EDTA 1mM), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c) , EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

A análise bioquímica demonstrou diferenças nos parâmetros de creatinina e ureia sérios nos grupos de 250UI de Vitamina D + DMH, 2000 UI de Vitamina D + DMH e Probióticos 10⁷ UFC + DMH em comparação ao grupo DMH, mas não nos parâmetros ALT e AST (Figura 26). Uma vez que estas últimas são indicadores tradicionais e específicos de lesão hepática quando aumentados em relação a indivíduos saudáveis, esses achados indicam que a integridade hepática dos animais foi mantida durante o

experimento, como demonstrado por outros estudos com o modelo de indução carcinogênica colorretal por DMH (JUAN *et al.*, 2019; SHEBBO *et al.*, 2020).

A nítida diferença nos níveis de creatinina e ureia no soro dos animais pertencentes ao grupo DMH quando comparados aos grupos de tratamento e ao controle negativo reflete o reportado na literatura, tanto para animais (ABDEL-RASOL *et al.*, 2021) como para pacientes de CCR (YANG *et al.*, 2021). Particularmente nos seres humanos, o alto nível de creatinina encontrado no soro dos indivíduos se correlaciona com o contexto da carcinogênese colorretal, devido ao consumo de carne vermelha processada a altas temperaturas, no qual a creatinina e os aminoácidos das células musculares podem originar aminas heterocíclicas carcinogênicas (DURKO; MALECKA-PANAS, 2014). Ainda, alta concentração de creatinina sérica tem sido estudada como fator preditivo devido à sua correlação com baixa sobrevivência (*overall survival*) em pacientes de CCR (YANG *et al.*, 2021). Uma vez que neste trabalho os tratamentos com vitamina D e probióticos combinados ao DMH foram capazes de modular os níveis de creatinina e de ureia de maneira similar ao encontrado no grupo controle negativo, infere-se que tanto a vitamina D quanto os probióticos apresentam capacidade de reduzir a toxicidade sistêmica do DMH mantendo a integridade renal dos animais e corroborando as evidências ao seu potencial quimiopreventivo.

6.5 ESTUDO DOS ALVOS DE QUIMIOPREVENÇÃO

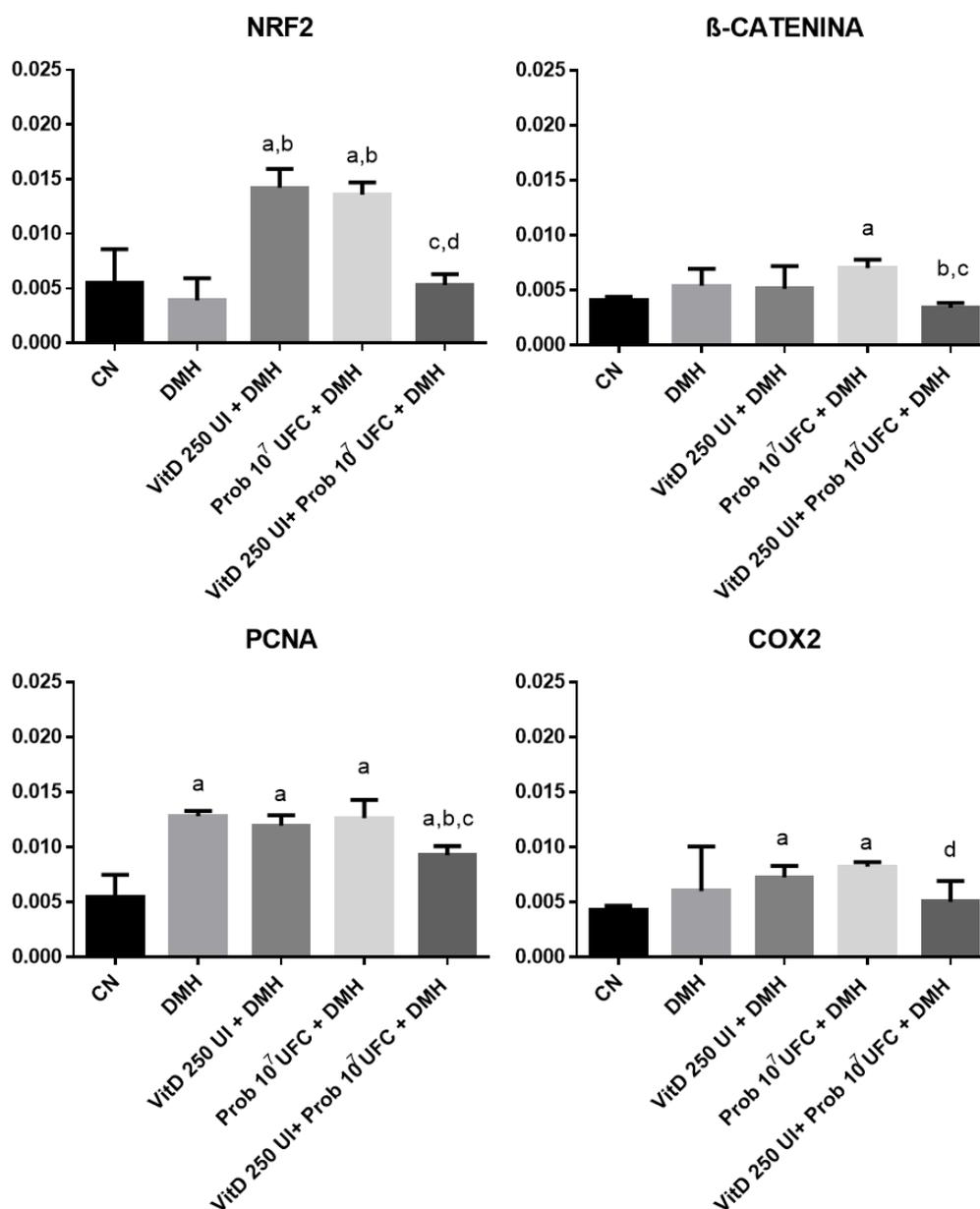
6.5.1 Avaliação imuno-histoquímica

A fim de investigar os mecanismos que possam estar envolvidos na atividade quimiopreventiva apresentada pelos tratamentos, foi avaliada a expressão proteica de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX-2 nos grupos de tratamento e nas três abordagens empregadas (pré, pós e tratamento simultâneo), onde a vitamina D e probióticos combinados ao DMH demonstraram efeitos significativos de redução de FCA.

6.5.1.1 Tratamento Simultâneo

Os resultados da análise semi-quantitativa da expressão dos marcadores nos grupos tratados com vitamina D e probióticos de maneira simultânea à carcinogênese encontram-se apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX2 no tecido colorretal parafinizado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI + DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10⁷ UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos controle negativo e DMH para os marcadores estudados, exceto para PCNA. Apesar disso, foi possível identificar diferença significativa dos grupos tratados em relação aos controles negativo e positivo. Particularmente, a expressão de Nrf2 nos grupos tratados com 250 UI de Vitamina D +

DMH e 10^7 UFC de Probióticos + DMH demonstrou uma diferença significativa quando comparados aos grupos controle negativo e positivo ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Os níveis de expressão semelhante de Nrf2 observados no grupo de controle negativo e no grupo DMH (Figura 27) se correlacionam à modulação da via Nrf2 pelo processo de carcinogênese, tanto no sentido da inibição como da hiperativação. Juntamente com a inflamação, o estresse oxidativo se mostra um fator relevante envolvido na carcinogênese colorretal. A partir da indução de diversos tipos celulares imuno-inflamatórios em um tecido, processos inflamatórios podem desencadear também a alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) ou nitrogênio (RNS, *reactive nitrogen species*), que conseqüentemente podem causar danos no DNA e assim promover a ativação de oncogenes ou a inibição de genes supressores de tumor, provocando ou promovendo a iniciação carcinogênica (SADEGHI *et al.*, 2017). Uma vez que a ação de Nrf2 induz elementos de resposta antioxidante (AREs, *antioxidant response elements*), a modulação de sua atividade é um fator comum encontrado na carcinogênese (MA, 2013). Sua limitação permite a indução de danos ao DNA e representa vantagem seletiva para células tumorais nas etapas de iniciação, ao passo que o aumento da expressão de Nrf2 é encontrado em estágios mais avançados, nos quais fornece maior sobrevivência e citoproteção às células tumorais (SADEGHI *et al.*, 2017). Essa modulação ocorre também na indução de carcinogênese colorretal pelo DMH e seus metabólitos, de maneira que níveis baixos de Nrf2 e enzimas antioxidantes são relatados na literatura em grupos tratados apenas com DMH ou AOM, e correlacionados à formação de tumores (DARBAND *et al.*, 2020; MANIGANDAN *et al.*, 2015; PANDURANGAN *et al.*, 2014).

Por isso, a elevação de Nrf2 é considerada de grande importância na proteção celular em estágios iniciais de tumorigênese (SADEGHI *et al.*, 2017), e pode assim explicar o efeito de redução da formação de criptas aberrantes pelos tratamentos indicados (Seção 6.2), embora, pela ausência de diferença entre os controles negativo e positivo (Figura 27), a comparação de redução não possa ser fielmente realizada. A atuação de Nrf2 sobre AREs depende da supressão de sua ubiquitinação e de sua translocação do citosol para o núcleo. Para isso, a proteína 1 associada ao ECH do tipo Kelch (KEAP1, *Kelch like ECH associated protein 1*) deve ser desassociada de Nrf2 em resposta ao estresse oxidativo, e assim este último é capaz de se ligar aos AREs e regular um grande número de genes envolvidos em processos de citoproteção, detoxificação e metabolização

de drogas, síntese de enzimas metabólicas, e vias antioxidantes (SADEGHI *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2021). Neste âmbito, como fator de transcrição, o Nrf2 modula a expressão de enzimas como glutathiona peroxidase 2 (*GPX2*), tioredoxina 1 (*TXN1*), isoformas de glutathiona S-transferase (*GSTA1*, 2, 3, 5), entre outros (SONG *et al.*, 2021). A expressão de *GST* foi também investigada neste trabalho, e será discutida na seção seguinte.

Estudos mostram a regulação dos níveis de Nrf2 por tratamentos com vitamina D e seus análogos, resultando em inibição da degradação mediada por KEAP1, aumento de sua expressão e/ou translocação nuclear (JEON; SHIN, 2018). Tais resultados foram observados em modelos animais de toxicidade renal e hepática (EL-MAGD; ERAKY, 2020), testicular (ABBASZADEH *et al.*, 2021) e neuronal (HOSSEINIRAD *et al.*, 2021), além de modelos de estudo da doença de Alzheimer (EL-DIN *et al.*, 2020) e de envelhecimento (CHEN *et al.*, 2019). Este último destacou a indução significativa da expressão de Nrf2 em animais tratados com 1,25-dihidroxitamina D3 de maneira dose-dependente, em contraste com a ausência de efeito em animais *knockout* para VDR, confirmando a regulação de Nrf2 pela vitamina D através da atuação de seu receptor a nível transcricional (CHEN *et al.*, 2019). Ainda, um estudo *in vitro* com queratinócitos epidermais humanos (HEK₂₉₃) foi capaz de demonstrar a elevação da expressão de alvos de Nrf2 envolvidos na resposta antioxidante em decorrência do tratamento com diversos análogos de vitamina D3, incluindo glutathiona-dissulfeto redutase (*GSR*), superóxido dismutase 1 e 2 (*SOD1* e *SOD2*), heme oxigenase 1 (*HMOX1*) e catalase (*CAT*) (CHAIPRASONGSUK *et al.*, 2019).

Muitos pesquisadores reportam, ainda, a correlação negativa entre o status oxidativo geral do hospedeiro e a abundância de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em sua microbiota intestinal (DING *et al.*, 2020), assim como a proteção contra o estresse oxidativo a partir da aplicação de bactérias probióticas, tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*, por meio da regulação da via Nrf2/KEAP1 (WANG *et al.*, 2017). Por exemplo, a administração de *L. rhamnosus* em modelo animal demonstrou promover mecanismos anti-oxidativos e anti-inflamatórios de forma dependente de Nrf2 (SAEEDI *et al.*, 2020), como também a ingestão de *L. plantarum* (ABOULGHEIT *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017), *L. reuteri* (GUPTA *et al.*, 2020) e *L. gasseri* (LIU *et al.*, 2021). Além disso, probióticos do gênero *Lactobacillus* são capazes de converter compostos fenólicos comuns da alimentação, provenientes, por exemplo, de frutas e vegetais como os catecóis, que se mostram interessantes na indução da expressão de *HMOX1* e outros alvos de Nrf2 (SENGER *et al.*, 2016), indicando uma interação ampla em diversos

mecanismos entre a modulação da microbiota intestinal, a ativação de vias antioxidantes e o efeito anticarcinogênico aqui observados.

Outro destaque se encontra na expressão de β -catenina no grupo tratado com combinação de 250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH, embora não haja diferença estatística entre os grupos controle negativo e positivo (DMH) (Figura 27). A análise semi-quantitativa demonstra uma diferença estatisticamente significativa do tratamento combinado (250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH) em relação ao grupo que recebeu apenas o indutor de carcinogênese, além de uma redução também significativa em comparação ao grupo tratado apenas com 250 UI de Vitamina D + DMH (Figura 27). Esses resultados indicam um potencial do tratamento combinado na modulação de β -catenina que não foi atingido apenas com os tratamentos isolados (250 UI de Vitamina D + DMH ou 10^7 UFC de Probióticos + DMH). Considerando o papel central da via de sinalização Wnt/ β -catenina e seus variados transdutores na tumorigênese colorretal, o tratamento aqui destacado se mostra em concordância com estratégias inibidoras desta via para modulação da sinalização promotora de iniciação e progressão tumorais (NIE *et al.*, 2020), e congruente com o efeito de redução de FCA observado neste grupo (Seção 6.2).

Em geral, como observado pelo baixo grau de expressão relativa do marcador no grupo controle negativo, a β -catenina é mantida em níveis adequados através de ubiquitinação e degradação proteossômica, catalizados pelo complexo de destruição de β -catenina. Esse complexo, formado pela proteína axina em conjunto com o produto do gene *APC*, além de proteínas quinase, é recrutado pela ligação de uma proteína Wnt a um receptor transmembrana denominado Fzd (*Frizzled*) e ao seu correceptor LRP6/5 (proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade 6 ou 5), permitindo a estabilização da β -catenina. Assim, a β -catenina não degradada é acumulada no citosol e chega ao núcleo celular, onde forma complexos com fatores de transcrição, como os da família TCF/LEF (fator de célula T/fator realçador linfoide), e ativa a transcrição de determinados genes envolvidos na proliferação, migração e diferenciação celular, controle de ciclo e metabolismo celular, dentre outros (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009). Tal equilíbrio na sinalização Wnt/ β -catenina é essencial para o funcionamento normal do intestino, devido ao seu papel na manutenção e auto-renovação do epitélio intestinal, particularmente em novas células na base das criptas intestinais (SCHATOFF; LEACH; DOW, 2017). No entanto, 90% dos pacientes com CCR apresenta mutações em algum dos componentes da cascata de sinalização Wnt/ β -catenina, condizente com o leve

aumento na expressão relativa de β -catenina observado no grupo DMH (Figura 27), o que torna sua alteração crucial nos processos carcinogênicos (NIE *et al.*, 2020).

Um dos efeitos reportados da 1,25-dihidroxitamina D3 e sua ligação ao VDR, que pode contribuir para a proteção observada em estudos animais e epidemiológicos, é o antagonismo à via Wnt/ β -catenina em células de CCR. Estudos demonstram que a vitamina D é capaz de promover a expressão de DKK1 (Dickkopf 1), um dos inibidores extracelulares da via Wnt/ β -catenina, que se liga ao correceptor LRP6/5 e impede sua interação com ligantes Wnt, assim mantendo a atividade do complexo de destruição de β -catenina. Além disso, a vitamina D pode induzir a expressão de proteínas E-caderina, as quais podem evitar a translocação de β -catenina sintetizada no citosol para o núcleo, e assim impedir a transcrição mediada por β -catenina e fatores da família TCF/LEF. Ainda, uma vez ativado, o VDR é capaz de interagir diretamente com β -catenina, com consequente redução de sua disponibilidade no núcleo celular e bloqueio da transcrição de alvos da sinalização Wnt/ β -catenina (GONZÁLEZ-SANCHO; LARRIBA; MUÑOZ, 2020).

Entretanto, uma vez que não foi observada redução significativa da expressão de β -catenina nos grupos de monoterapia (250 UI de Vitamina D + DMH e 10^7 UFC de Probióticos + DMH), é provável que o efeito aqui observado seja consequente dos mecanismos induzidos em conjunto pela ação da vitamina D e dos probióticos. Estudos demonstram tanto a modulação *in vitro* da via Wnt/ β -catenina por probióticos do gênero *Lactobacillus* em células de CCR (GHANAVATI *et al.*, 2020; TORRES-MARAVILLA *et al.*, 2021), como a inibição de genes importantes para a cascata de sinalização como os codificantes de axina 2 (*AXIN2*), catenina beta 1 (*CTNNB1*), inibidor 2 de ligação ao DNA (*ID2*), entre outros, além de indução da expressão de *APC* e caseína quinase 1 epsilon (*CSNK1E*, um dos componentes centrais do complexo de destruição de β -catenina) (GHANAVATI *et al.*, 2020). Em modelos animais, também foi reportada a redução de β -catenina e seus alvos em decorrência da administração de probióticos, tanto do gênero *Lactobacillus* (ALI *et al.*, 2019; GHANAVATI *et al.*, 2020), como de outras espécies (CHEN *et al.*, 2020).

No tocante à expressão de PCNA, foi possível identificar uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de controle negativo e o grupo DMH (Figura 27). O PCNA é um cofator das DNA polimerases, e, portanto, essencial para a síntese e reparo de DNA. Desempenha funções como ancoragem para a polimerase δ e outras enzimas, e no recrutamento de outros fatores ao garfo de replicação, participando assim

do reparo de DNA, remodelamento de cromatina, proliferação e progressão do ciclo celular (GONZÁLEZ-MAGAÑA; BLANCO, 2020). Dessa maneira, sua expressão se apresenta consideravelmente alterada em variados tipos tumorais, e se mostra associada à progressão tumoral, sendo inclusive utilizada como marcador prognóstico para diversas malignidades, incluindo o CCR (ZHOU *et al.*, 2018). Isso se mostra condizente com a indução da carcinogênese detectada em todos os grupos que receberam DMH (DMH, 250 UI de Vitamina D + DMH, 10^7 UFC de Probióticos + DMH e 250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH) e a expressão de PCNA mais elevada nestes que no controle negativo (Figura 27).

Ainda, destacou-se a redução significativa encontrada na expressão relativa de PCNA no grupo tratado com combinação de 250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH em comparação ao grupo que recebeu apenas DMH (Figura 27), indicando modulação da proliferação celular por parte do tratamento combinado. A relação entre a administração de vitamina D e os níveis de PCNA foram investigados em poucos estudos, entre eles na análise da proliferação de células mesenquimais multipotentes de rato (C3H 10T1/2) (ARTAZA *et al.*, 2010) e células de leiomioma uterino humano (HuLM) (SHARAN *et al.*, 2011), nas quais foi observada redução significativa da expressão de PCNA associada a inibição da proliferação celular dependente de 1,25-dihidroxitamina D3. Além disso, estudo com camundongos reporta proliferação celular de queratinócitos epidermais mais pronunciada na ausência de expressão de VDR, demonstrando correlação entre sua atividade e os níveis de PCNA (BIKLE *et al.*, 2013). Já probióticos são mais explorados nesse âmbito, já tendo sido demonstrado *in vitro* o efeito inibitório de *L. plantarum* na expressão de PCNA de células HT-29, de maneira dose-dependente (SUN *et al.*, 2021), e *in vivo*, como a redução significativa da expressão de PCNA em modelo animal de câncer oral após administração de *L. salivarius* (ZHANG *et al.*, 2013), e em ratos Wistar com indução de carcinogênese colorretal por DMH, nos quais a administração de *L. acidophilus* e *B. bifidum* resultou em redução significativa no índice de marcação para PCNA associada a redução do número de FCA, quando comparado ao grupo DMH, em dois estudos independentes (LEE *et al.*, 2020; MOHANIA *et al.*, 2014). Assim, os dados obtidos neste trabalho, condizentes com a literatura, corroboram o potencial antitumoral de vitamina D e probióticos, impulsionado em parte pela inibição de proteínas relacionadas à proliferação celular como PCNA (TRIPATHY *et al.*, 2021).

Já a expressão relativa de COX2 não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle negativo e positivo (DMH), ou nos grupos tratados com 250 UI de Vitamina D + DMH, 10^7 UFC de Probióticos + DMH e 250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH em comparação ao grupo DMH, na abordagem simultânea (Figura 27). Infere-se, portanto, que os tratamentos neste modelo não foram capazes de modular vias relacionadas diretamente à inflamação.

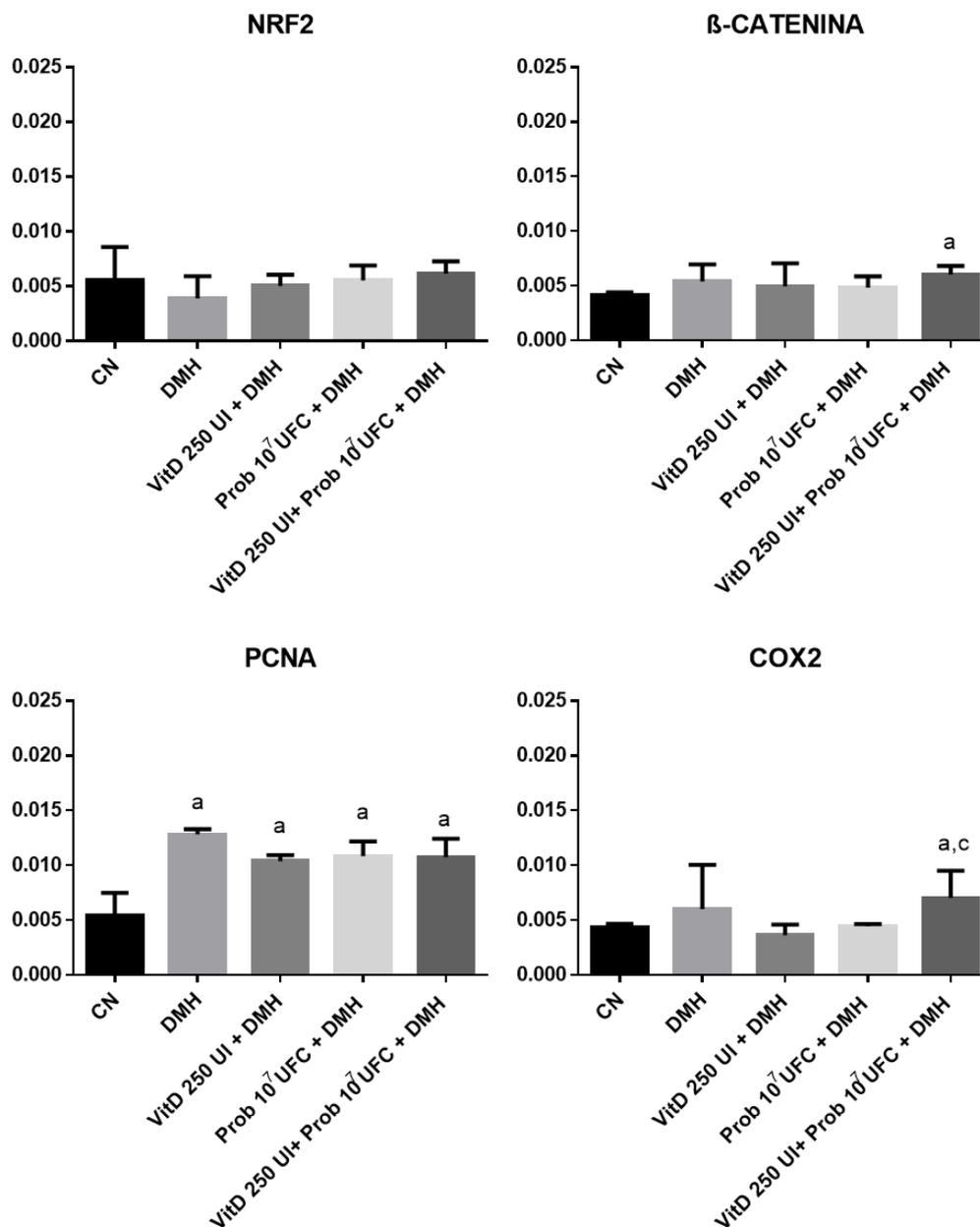
6.5.1.2 Pré-tratamento e Pós-tratamento

Também foi realizada a análise semi-quantitativa da expressão dos marcadores nos grupos tratados de maneira anterior e posterior à indução da carcinogênese colorretal com DMH. Os resultados obtidos são apresentados Figuras 28 e 29 a seguir, respectivamente.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados na abordagem de pré-tratamento (Figura 28), o que pode indicar um impacto dos tratamentos diretamente nos processos de iniciação da carcinogênese e nas vias relacionadas já citadas, com base nos dados do tratamento simultâneo, porém não correlacionado aos efeitos quimiopreventivos observados no ensaio de FCA (Seção 6.2).

No pós-tratamento, a expressão de Nrf2 não mostrou diferença significativa entre os grupos de controle negativo e positivo, ou nos grupos tratados com 2000 UI de Vitamina D + DMH, 10^7 UFC de Probióticos + DMH e 2000 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH em comparação ao grupo DMH (Figura 29). Isso se mostra congruente ao papel ambivalente que esse marcador apresenta no CRC. Como explorado anteriormente, a ativação da via de sinalização Nrf2 protege células normais da transformação tumoral através da indução de resposta antioxidante. Entretanto, após a iniciação da carcinogênese, tal via pode ser integrada ao metabolismo alterado de células tumorais e hiperativada, uma vez que representa vantagem na sobrevivência ao estresse celular provocado pelo microambiente hipóxico e de síntese proteica desregulada em que se encontram (SADEGHI *et al.*, 2017). Assim, estágios posteriores da carcinogênese podem se beneficiar da ativação de Nrf2, de maneira que sua inibição nessa fase seria mais benéfica ao objetivo quimioterapêutico. Esse efeito biológico pode ser observado no grupo tratado com a combinação de 2000 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH, que apresenta expressão reduzida de Nrf2 em relação ao grupo DMH, porém sem significância estatística (Figura 29).

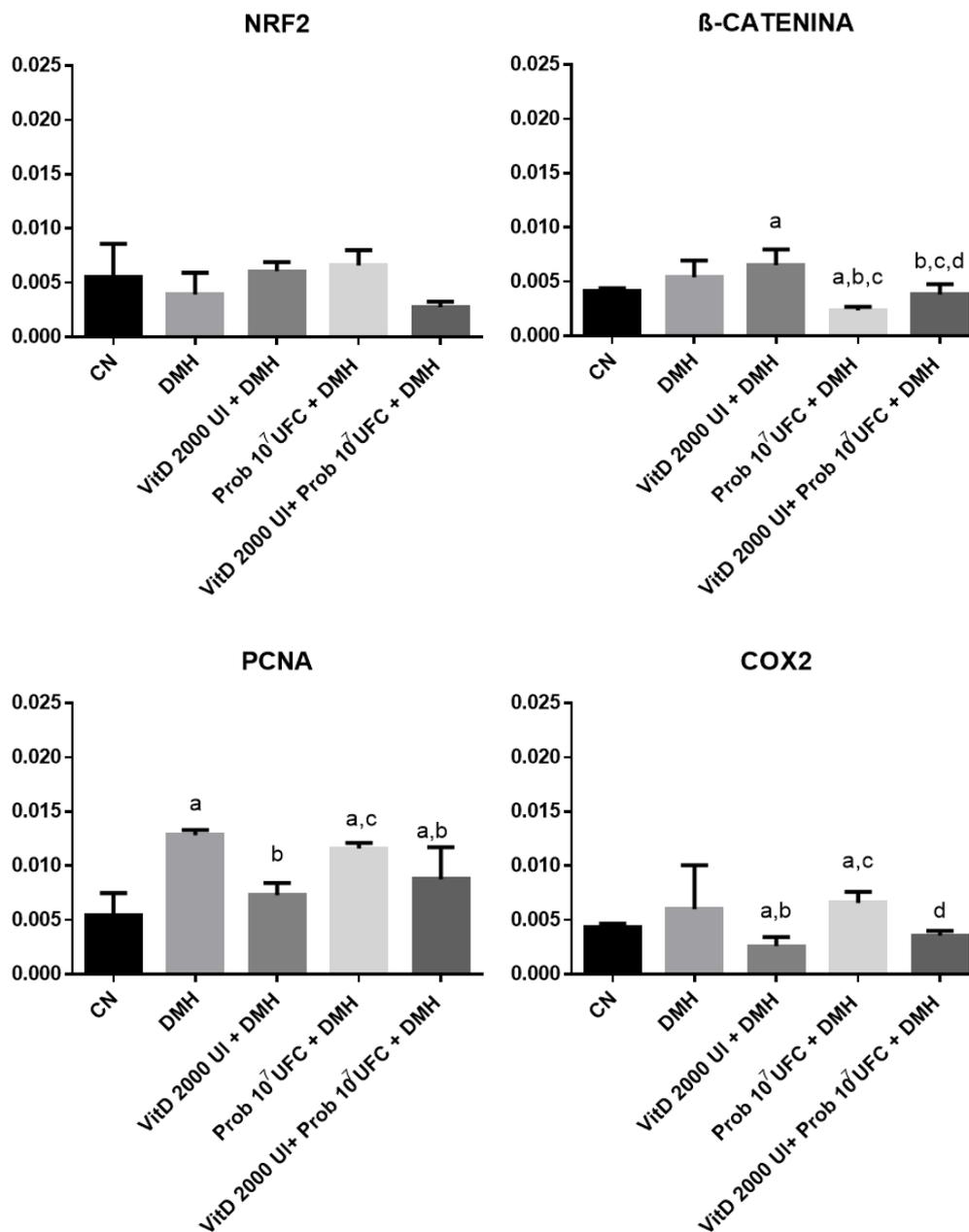
Figura 28 – Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX-2 no tecido colorretal parafinado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI +DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10^7 UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Figura 29 – Análise semi-quantitativa da expressão de Nrf2, β -catenina, PCNA e COX-2 no tecido colorretal parafinado distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI + DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10⁷ UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

No tocante à expressão de β -catenina, foram identificados efeitos semelhantes ao encontrado no tratamento simultâneo, sem diferença estatística entre os controles negativo e positivo (DMH), mas com redução no grupo tratado com a combinação de

vitamina D e probióticos quando comparado ao grupo DMH, desta vez nas doses de 2000 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH (Figura 27). Porém, diferente do observado na estratégia simultânea, o efeito de redução de β -catenina no pós-tratamento se mostrou significativo também com probióticos não associados à vitamina D (10^7 UFC de Probióticos + DMH) e destacadamente mais pronunciado que o resultado atingido pela combinação (Figura 27). Infere-se, portanto, que a atuação das espécies probióticas sobre a via Wnt/ β -catenina possa ser responsável por grande parte da eficácia observada dos efeitos aqui descritos de redução de β -catenina, como relatado em estudos *in vivo* em decorrência da administração de probióticos do gênero *Lactobacillus* (ALI *et al.*, 2019; GHANAVATI *et al.*, 2020).

A expressão de PCNA na estratégia de pós-tratamento também se mostrou semelhante ao observado no tratamento simultâneo: não houve diferença estatística entre os controles negativo e positivo (DMH), mas foi detectada redução da expressão de PCNA nos grupos tratados com 2000 UI de Vitamina D + DMH e com a combinação de 2000 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH, quando comparados ao grupo DMH (Figura 27). Isso indica, novamente, a inibição de vias de proliferação celular pelos tratamentos indicados também no modelo de administração posterior à indução da carcinogênese, de maneira correspondente à redução do número de lesões pré-neoplásicas observada nestes grupos através do ensaio de FCA (Seção 6.2.5).

Além disso, foi observada redução estatisticamente significativa na expressão de COX2 no grupo tratado com 2000 UI de Vitamina D + DMH em relação ao grupo DMH, apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos de controle negativo e positivo (DMH) (Figura 27). A prostaglandina-endoperóxido sintase 2, conhecida como COX2, é uma isoforma importante da enzima chave na via de biossíntese de prostaglandinas, que catalisa a reação de cicloxigenase para a inserção de duas moléculas de oxigênio ao seu substrato, ácido araquidônico, formando a prostaglandina G2, e posteriormente a reação de peroxidase, para redução a prostaglandina H2. Esta última é considerada o precursor geral de todas as prostaglandinas específicas, e por isso a COX2 encontra-se envolvida em processos de inflamação e diversos mecanismos de transdução de sinal (BROWN; DUBOIS, 2005; GORADEL *et al.*, 2019). A expressão de COX2 é conhecidamente elevada em tecidos tumorais, incluindo de CCR, comparada àqueles não-tumorais. Cerca de 85% dos carcinomas e 50% dos adenocarcinomas colorretais apresentam hiperexpressão de COX2, de maneira correlacionada a prognósticos graves (BROWN; DUBOIS, 2005). Sua atuação no contexto tumoral se dá tanto pela modulação imune,

como a supressão de morte celular induzida por $TNF\alpha$, através da inibição de IL-10 e aumento de IL-12, como por outros mecanismos. Prostaglandinas podem contribuir para o desenvolvimento tumoral estimulando a angiogênese, através da indução do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) por exemplo, ou evitando a apoptose, diretamente por meio de sua ação anti-apoptótica ou pela remoção do pró-apoptótico ácido araquidônico (FERRANDEZ; PRESCOTT; BURT, 2003; PU *et al.*, 2021). Dessa maneira, sua redução no grupo aqui destacado é benéfica e correlacionada à redução do número de lesões pré-neoplásicas identificadas no ensaio de FCA (Seção 6.2.5).

Já foi demonstrada a correlação da suplementação de vitamina D e a redução da expressão de COX2 em indivíduos com adenoma colorretal (GIBBS *et al.*, 2021), tal como a detecção de maiores níveis de VDR e menores níveis de COX2 em pacientes nos estágios iniciais, se comparados a estágios avançados (JOANNA *et al.*, 2019). Estudos sobre essa correlação elucidam a inibição da síntese e da ação biológica de prostaglandinas pró-inflamatórias pela vitamina D através da supressão direta da transcrição do gene *PTGS2* para COX2, a partir da atuação de VDR como fator de transcrição, como também por meio do aumento da expressão da enzima 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase (HPGD), responsável pela degradação de prostaglandinas e portanto antagonista de COX2 (JEON; SHIN, 2018; LIU *et al.*, 2018).

O grupo tratado com a combinação de 2000 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH na estratégia de pós-tratamento também foi mostrou queda na expressão de COX2, embora não tenha sido identificada diferença estatística quanto ao grupo DMH (Figura 26). Na literatura, probióticos também são correlacionados à redução da expressão ou atividade de COX2, tanto em modelos animais como *in vitro*. Em células de CCR da linhagem LS174T, foi relatada a redução significativa na expressão de COX2 após exposição a um coquetel de espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (PARISA *et al.*, 2020). Em animais nos quais foi induzida a carcinogênese colorretal por DMH ou AOM, a administração de *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. debueckii*, *B. lactis*, entre outros, foi correlacionada à redução de COX2, acompanhada de queda na infiltração inflamatória (DOS REIS *et al.*, 2017; KAEID; SHUKLA, 2018; PARISA *et al.*, 2020). Com base nesses dados, justifica-se o efeito biológico observado semelhante ao grupo de 2000 UI vitamina D + DMH, indicando o potencial de atuação de ambos sobre os processos inflamatórios no contexto do câncer colorretal.

Os achados deste trabalho apontam, então, para efeitos quimiopreventivos promissores tanto dos tratamentos isolados como combinados, capazes de reduzir o processo inflamatório, o estresse oxidativo e/ou a proliferação celular desencadeados durante a iniciação da carcinogênese, mediante a modulação de genes e proteínas envolvidas na sinalização de processos alterados na carcinogênese colorretal.

6.5.2 Avaliação da expressão gênica

Similarmente, foi avaliada a expressão gênica de alvos correlacionados às vias envolvidas na carcinogênese colorretal, através da abundância relativa do RNAm dos genes óxido nítrico sintase 2 (*NOS2*, conhecido como *iNOS*) e glutatona S-transferase (*GST*). Foram selecionados os grupos que obtiveram efeito estatisticamente significativo na redução do número de lesões pré-neoplásicas no ensaio de FCA nas diferentes abordagens de tratamento (pré, pós e tratamento simultâneo), para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos.

6.5.2.1 Tratamento Simultâneo

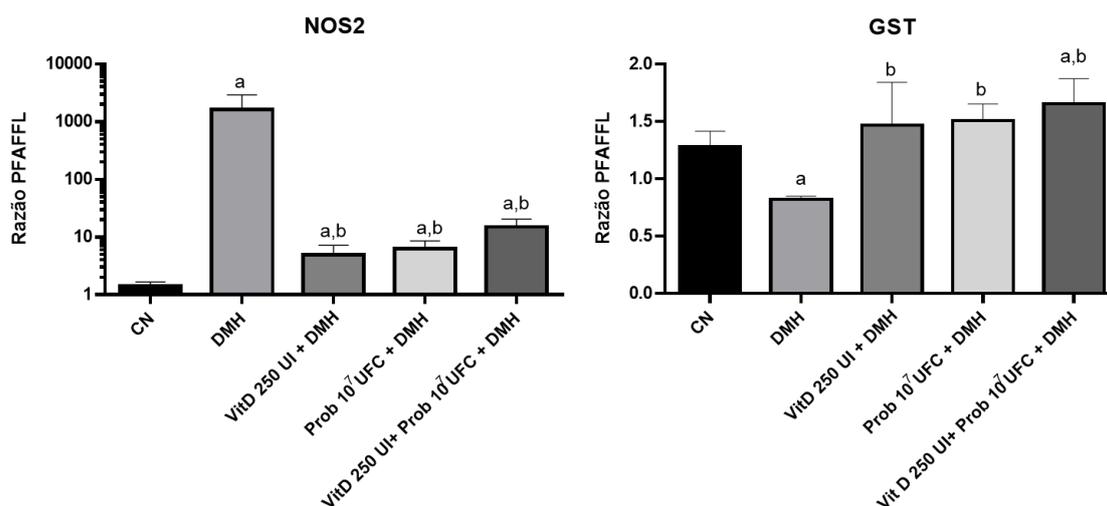
Os resultados da análise expressão de ambos os genes selecionados, nos grupos tratados de maneira simultânea à indução da carcinogênese colônica, encontram-se apresentados na Figura 30.

Na análise do perfil de expressão gênica de *NOS2*, foi observada uma diferença significativa entre os níveis de expressão encontrados no grupo controle negativo quando comparados ao grupo DMH, de maneira que o valor relativo se apresenta extremamente elevado no grupo que recebeu apenas o indutor de carcinogênese, trazendo, inclusive, a necessidade de utilização de escala logarítmica para melhor visualização dos dados (Figura 30). Esses dados se mostram condizentes com o papel de *NOS2* como a forma induzível da enzima, relacionada a estímulos inflamatórios e responsável pela alta produção de óxido nítrico (NO) em condições agudas e crônicas, presentes na iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (LIAO; YE; LIU, 2019). O NO produzido nesse contexto, como uma espécie reativa de nitrogênio, pode induzir danos ao DNA através da inibição dos processos de reparo ou da modificação direta da estrutura do DNA, como a desaminação nitrosativa, a formação de nitrosaminas ou quebras de fita (DE OLIVEIRA

et al., 2017). Dessa forma, numerosos estudos reportam a maior expressão ou atividade de NOS2 em diversos tipos de câncer, incluindo o colorretal, e as associam a processos de angiogênese e metástase, além de resistência imune e quimioterapêutica, indicando prognósticos mais graves (LIAO; YE; LIU, 2019).

Com isso em vista, a diferença estatística significativa observada dos grupos de tratamento (250 UI de Vitamina D + DMH, 10^7 UFC de Probióticos + DMH e a combinação de 250 UI de Vitamina D + 10^7 UFC de Probióticos + DMH) em relação ao grupo DMH indica um importante efeito sobre esses mecanismos da tumorigênese. Tanto na administração de 250 UI de vitamina D quanto de 10^7 UFC de probióticos, de forma simultânea à indução da carcinogênese por DMH, e ainda, a combinação de ambos, houve redução expressiva da abundância relativa do transcrito de *NOS2* (Figura 30).

Figura 30 – Abundância relativa dos transcritos que codificam para NOS2 e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI +DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10^7 UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

A diminuição da expressão de *NOS2* decorrente da administração de vitamina D é reportada na literatura em modelos animais de carcinogênese quimicamente induzida (EL-SHEMI *et al.*, 2016; REFAAT *et al.*, 2015), de maneira semelhante ao observado neste trabalho. Probióticos das espécies *L. acidophilus* (DAVOODVANDI *et al.*, 2021; TORRES-MARAVILLA *et al.*, 2021) e *L. gasseri* (OH *et al.*, 2020) são igualmente

associados ao efeito de redução da expressão de *NOS2*, enquanto o tratamento combinado de vitamina D e probióticos não apresenta parâmetros na literatura comparáveis aos investigados neste trabalho. Nesse aspecto, os dados de expressão gênica aqui obtidos se correlacionam à redução do número de lesões pré-neoplásicas identificada no ensaio de FCA em tais grupos, uma vez que a inibição específica das isoformas de NOS é reportada na literatura como responsável pela inibição de crescimento tumoral em modelos animais (JANAKIRAM; RAO, 2012).

Interessantemente, diferenças nos níveis de expressão de *NOS2* são geralmente acompanhadas pela expressão de *COX2* na literatura (REFAAT *et al.*, 2015; TORRES-MARAVILLA *et al.*, 2021). Essa associação também foi identificada neste trabalho, com a redução da expressão relativa de *COX2* detectada nos grupos tratados através do ensaio imunohistoquímico (Figuras 27, 28 e 29), ainda que não tenha representado efeito estatisticamente significativo. Isso se explica pela interação entre a sinalização promovida por *NOS2* e a via de *COX2*, na qual o NO produzido por *NOS2* promove aumento na transcrição do gene *PTGS2* para *COX2*, como demonstrado em células HCT116 e HCA7 de adenocarcinoma colorretal (SHENG *et al.*, 2020). Ainda, o NO é capaz de nitrosilar a enzima *COX2*, o que promove um aumento de sua atividade catalítica (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017), tornando ambos componentes importantes e interligados na inflamação e na tumorigênese colorretal. Portanto, a redução da expressão de *NOS2* nos grupos tratados com Vitamina D + DMH possivelmente estará levando à redução da expressão de *COX2* e de seus efeitos pró-inflamatórios.

Foi também observada diferença na expressão relativa de *GST* entre os grupos CN e DMH, com a redução de sua expressão neste último (Figura 28), o que se correlaciona com o papel de *GST* na proteção a desafios oxidantes. Com a transcrição regulada por Nrf2, as enzimas da família *GST* são responsáveis por detoxificar uma ampla gama de substâncias prejudiciais, como ROS, juntamente com a enzima NAD(P)H quinona desidrogenase 1 (NQO1) e outras. As enzimas *GST* utilizam a glutatona para inativar ROS, gerando glutatona oxidada, que é reduzida novamente a glutatona pela glutatona-dissulfeto redutase (GSR) (TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018). Devido ao seu papel na regulação do status oxidativo, principalmente nos diferentes contextos nutricionais que apresentam variados riscos para a carcinogênese colorretal, o polimorfismo do gene *GST* e sua consequente perda de atividade enzimática são correlacionados a maior risco de CCR em diferentes populações (KLUSEK; GŁUSZEK; KLUSEK, 2014).

Dessa maneira, o aumento na expressão de GST observado em todos os grupos tratados, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DMH (Figura 30), indica o efeito protetor induzido tanto pela vitamina D como pelos probióticos, de maneira isolada (Vitamina D 250 UI + DMH e Probióticos 10^7 UFC + DMH) ou combinada entre si (Vitamina D 250 UI + Probióticos 10^7 UFC + DMH), contra o estresse oxidativo. Estudo em modelo de indução carcinogênica por DMH também reportou uma elevação na expressão e na atividade de GST, acompanhado de outras enzimas relacionadas, decorrente de tratamento com *L. plantarum* e *L. rhamnosus* (WALIA *et al.*, 2018). Dados acerca da influência de tratamento ou suplementação com vitamina D sobre a expressão de GST não estão disponíveis no contexto colorretal, porém é reportada em estudos acerca do envelhecimento (MARK *et al.*, 2016) e neurotoxicidade (ALJOHRI; ALOKAIL; HAQ, 2019). Portanto, a relação da vitamina D com as vias de indução de AREs, explorada na seção anterior, faz jus a maiores investigações, embasadas nos achados aqui relatados.

6.5.2.2 Pré-Tratamento e Pós-tratamento

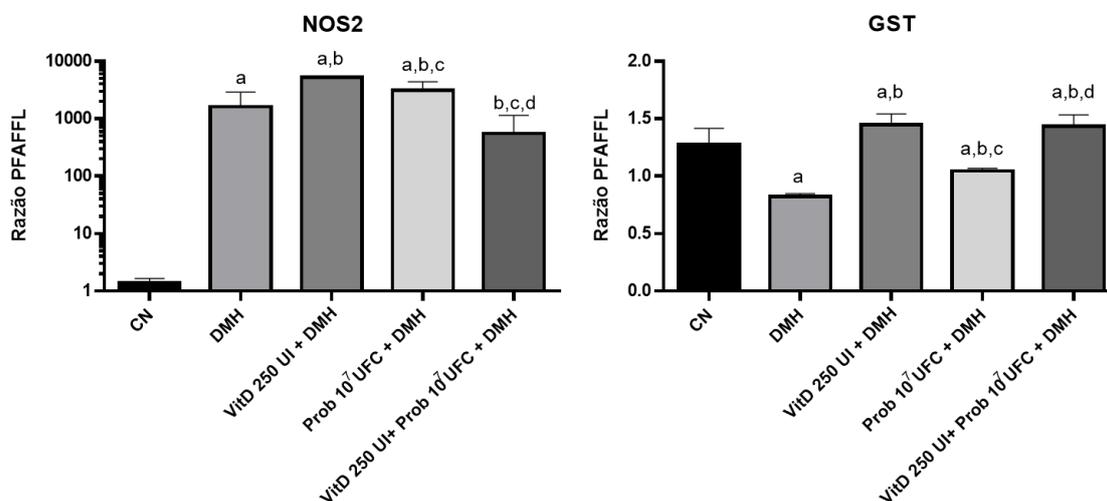
Os resultados do perfil de expressão gênica para *NOS2* e *GST* nos grupos tratados de maneira anterior e posterior à indução de carcinogênese com DMH são apresentados nas Figuras 31 e 32. O efeito biológico sobre a expressão de *GST* foi semelhante nas estratégias de pré (Figura 31) e pós-tratamento (Figura 32) ao observado no esquema simultâneo (Figura 30), com aumento na expressão de *GST* em todos os grupos tratados em comparação ao grupo DMH, indicando a mesma dinâmica do efeito protetor antioxidante oferecido pelos tratamentos nas três abordagens.

No entanto, os efeitos sobre a expressão de *NOS2* mostraram-se em geral inversos ao observado no tratamento simultâneo. No pré-tratamento, é possível notar um aumento estatisticamente significativo na abundância relativa do RNAm de *NOS2* nos grupos tratados com 250 UI de vitamina D + DMH e 10^7 UFC de probióticos + DMH (Figura 31), refletindo uma atuação ambivalente dessa enzima sobre os processos carcinogênicos.

A depender do tipo de tumor, da faixa de concentração e da constância do influxo de NO gerado por *NOS2*, tanto em células tumorais quanto em células do microambiente tumoral, seus efeitos podem ser pró-tumorais, como discutido anteriormente, tornando sua redução de interesse para a inibição de processos de invasão e metástase, ou podem ser antitumorais (VANINI; KASHFI; NATH, 2015). Por exemplo, a hiperexpressão de

NOS2 em células HT-29 de câncer colorretal leva a um aumento de sua sensibilidade à morte celular induzida por cisplatina (ADAMS *et al.*, 2009), e altas concentrações de NO foram correlacionadas a inibição da proliferação celular, indução de apoptose e estímulo de vias de sinalização relacionadas ao dano de DNA, levando à fosforilação de p53, em linhagens de câncer de mama e osteossarcoma (YAKOVLEV *et al.*, 2010). Dessa maneira, ainda se mantém o duplo papel do NO observado em diferentes contextos, particularmente no trato gastrointestinal, onde por um lado é mediador das funções de defesa e reparo da mucosa intestinal, e por outro contribui para lesões teciduais em variadas doenças e condições (MUSCARÁ; WALLACE, 1999). Esses fenômenos então, explicariam o aumento observado na expressão de NOS2 na estratégia de pré-tratamento (Figura 31), interessante para a manutenção da integridade da mucosa intestinal, enquanto o mesmo marcador se mostrou reduzido nas estratégias de tratamento simultâneo e pós-tratamento (Figuras 30 e 32), nos quais a queda na atividade de NOS2 representaria melhores prognósticos.

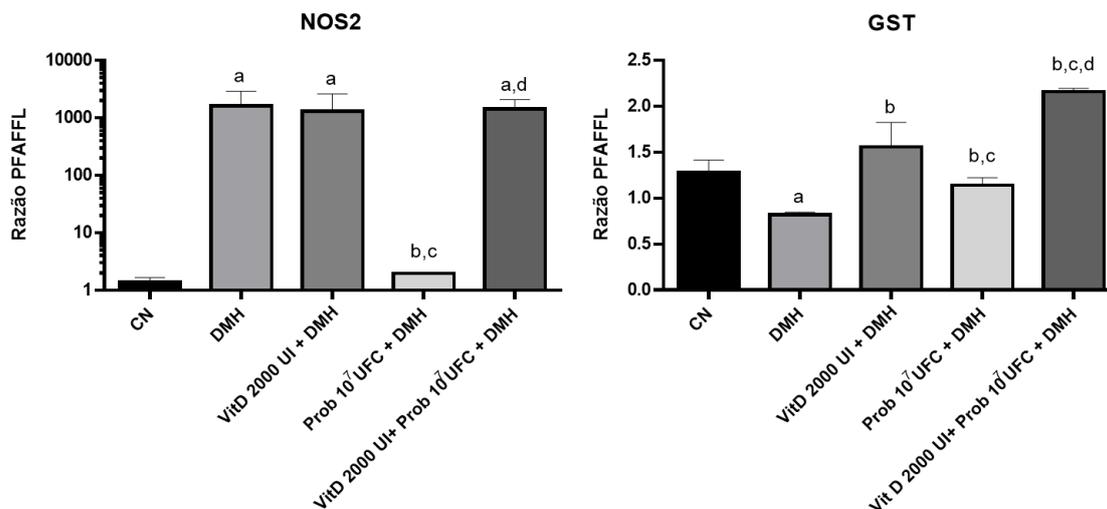
Figura 31 – Abundância relativa dos transcritos que codificam para iNOS e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI +DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10⁷ UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

Figura 32 – Abundância relativa dos transcritos que codificam para iNOS e GST no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução da carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina



Fonte: Do autor (2022)

Legenda: ^a Significativamente diferente do grupo controle negativo; ^b Significativamente diferente do grupo DMH; ^c Significativamente diferente do grupo VitD 250 UI +DMH; ^d Significativamente diferente do grupo Prob 10⁷ UFC + DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey). CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

No pós-tratamento, os grupos tratados com 2000 UI de Vitamina D + DMH e com a combinação de 2000 UI de Vitamina D + 10⁷ UFC de Probióticos + DMH mostraram níveis de expressão de NOS2 semelhantes ao do grupo DMH, ao passo que o grupo tratado com 10⁷ UFC de Probióticos + DMH demonstrou uma queda nesse parâmetro equivalente ao observado no tratamento simultâneo, também de maneira significativa (Figura 32). Visto que muitos estudos trazem resultados aparentemente paradoxais ou contraditórios, a investigação do papel de NOS2 na carcinogênese ainda requer esclarecimentos. Para além disso, a relação da suplementação de vitamina D e/ou probióticos no contexto do câncer colorretal e seu impacto sobre a expressão de NOS2 é digna de profunda exploração, tendo em vista os resultados expressivos obtidos neste trabalho e os potenciais efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos subsequentes.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no sistema teste *in vitro* corroboram a possível aplicação da vitamina D na quimioterapêutica do câncer colorretal, por indicarem seu efeito citotóxico acompanhado de notável efeito seletivo. Já os probióticos *L. gasseri* e *B. bifidum*, utilizados de maneira isolada ou combinada, não indicam ser promissores dada a ausência de seletividade sobre células tumorais. Não obstante, o efeito de redução da dose efetiva dos quimioterápicos doxorrubicina, 5-fluorouracil e cisplatina sobre adenocarcinoma colorretal e de elevação da dose citotóxica em queratinócitos normais de pele, decorrente do efeito sinérgico de sua associação ao tratamento com vitamina D, pode representar potencial de aplicação clínica, uma vez que permitiu a manutenção da eficácia quimioterápica com consequente redução da dose utilizada, o que pode estar eventualmente associado a menores efeitos adversos.

No sistema teste *in vivo*, a análise da microbiota fecal proveniente dos grupos tratados demonstra a capacidade de modulação da microbiota intestinal pelos probióticos e também pela vitamina D, além de sua associação com padrões benéficos no contexto da anticarcinogenicidade. As observações provenientes da análise histopatológica do cólon de ratos Wistar indicam o efeito protetor tanto da vitamina D como do *mix* de probióticos na carcinogênese colorretal, e sugerem também seu potencial quimiopreventivo. Em conjunto com a ratificação da segurança hepática dos tratamentos e do impacto benéfico em contraste à carcinogênese, seu efeito estatisticamente significativo em baixas doses permite sua exploração em estratégias de longo prazo.

A investigação de alvos moleculares através dos ensaios de RT-PCR e imunohistoquímica trouxe informações acerca dos mecanismos de ação da modulação observada. Os resultados obtidos permitem inferir a atuação de probióticos e vitamina D, em combinação ou isolados, sobre vias importantes para a carcinogênese em suas diferentes etapas, como a via de resposta a estresse oxidativo envolvendo a sinalização de Nrf2 e atividade de GST, via de regulação inflamatória a partir da atividade de COX2 e iNOS, e ainda vias de proliferação e modulação transcricional como a via Wnt/ β -catenina e o papel central de PCNA na replicação e progressão do ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Vitamin D3 protects against lead-induced testicular toxicity by modulating Nrf2 and NF- κ B genes expression in rat. **Reproductive Toxicology**, v. 103, p. 36–45, 2021.
- ABDEL-RASOL, M. A. et al. The antitumor activity of ginger against colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in rats. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1601–1610, 2021.
- ABDELGHANY, L. et al. Dipyrindamole induces the phosphorylation of CREB to promote cancer cell proliferation. **Oncology Letters**, v. 21, n. 4, p. 1–6, 2021.
- ABOULGHEIT, A. et al. Lactobacillus plantarum probiotic induces Nrf2-mediated antioxidant signaling and eNOS expression resulting in improvement of myocardial diastolic function. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 321, p. H839–H849, 2021.
- ADAMS, C. et al. Nitric oxide synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells. **The Journal of Gene Medicine**, v. 11, n. 2, p. 160–168, 2009.
- AGAH, S. et al. More protection of Lactobacillus acidophilus than Bifidobacterium bifidum probiotics on azoxymethane-induced mouse colon cancer. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 3, p. 857–864, 2018.
- AGNER, A. R. et al. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 582, n. 1–2, p. 146–154, 2005.
- AHN, J. et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 24, p. 1907–1911, 2013.
- ALEXANIAN, A.; SOROKIN, A. Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 11, p. 667, 14 nov. 2017.
- ALI, M. S. et al. Modulation of JNK-1/ β -catenin signaling by: Lactobacillus casei, inulin and their combination in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. **RSC Advances**, v. 9, n. 50, p. 29368–29383, 2019.
- ALIZADEH-NAVAEI, R. et al. Role of vitamin d in the effectiveness of chemotherapeutic drugs on gastric cancer cell lines. **World Cancer Research Journal**, v. 6, n. e1259, p. 1–5, 2019.
- ALJOHRI, R.; ALOKAIL, M.; HAQ, S. H. Neuroprotective role of vitamin D in primary neuronal cortical culture. **eNeurologicalSci**, v. 14, p. 43–48, 1 mar. 2019.
- APPLEYARD, C. B. et al. Pretreatment with the probiotic VSL#3 delays transition from inflammation to dysplasia in a rat model of colitis-associated cancer. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 6, p. 1004–1013, 2011.
- ARTAZA, J. N. et al. 1,25(OH)₂ Vitamin D3 inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of

mesenchymal multipotent cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 119, n. 1–2, p. 73–83, mar. 2010.

ASLAM, A. et al. Chemopreventive effects of vitamin D3 and its analogue, paricalcitol, in combination with 5-fluorouracil against colorectal cancer: The role of calcium signalling molecules. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 3, p. 166040, 1 mar. 2021.

AZQUETA, A. et al. Applying the comet assay to fresh vs frozen animal solid tissues: A technical approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110671, 2019.

BAHMANI, S.; AZARPIRA, N.; MOAZAMIAN, E. Anti-colon cancer activity of Bifidobacterium metabolites on colon cancer cell line SW742. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 9, p. 835–842, 2019.

BAHRI, M. et al. Potentiation of anticancer antibody efficacy by antineoplastic drugs: Detection of antibody-drug synergism using the combination index equation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 143, p. e58291, 1 jan. 2019.

BATTISTINI, C. et al. Vitamin D modulates intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 362, 2020.

BELLERBA, F. et al. The Association between vitamin D and gut microbiota: A systematic review of human studies. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3378, 2021.

BENARBA, B.; PANDIELLA, A. Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, p. 408–423, 2018.

BERMAN, H. G. et al. Genomic characterization of cisplatin response uncovers priming of cisplatin-induced genes in a resistant cell line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5814, p. 1–14, 2021.

BHAT, M. I.; KAPILA, R. Dietary metabolites derived from gut microbiota: Critical modulators of epigenetic changes in mammals. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 5, p. 374–389, 2017.

BHATTARAI, Y.; PEDROGO, D. A. M.; KASHYAP, P. C. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 1, p. G52, 23 nov. 2017.

BIKLE, D. D. et al. Protective role of vitamin D signaling in skin cancer formation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 1, p. 271, 2013.

BIKLE, D. D. Vitamin D and cancer: The promise not yet fulfilled. **Endocrine**, v. 46, n. 1, p. 29–38, 2014.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. **Cancer Letters**, v. 37, n. 2, p. 147–151, 1987.

BRACKEN, M. B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 102, n. 3, p. 120–122, 2009.

BRADBURY, K. E.; MURPHY, N.; KEY, T. J. Diet and colorectal cancer in UK Biobank: a prospective study. **International Journal of Epidemiology**, v. 49, n. 1, p.

246–258, 2020.

BROWN, J. R.; DUBOIS, R. N. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2840–2855, 2005.

BUNCH, B. L. et al. Vitamin D3 enhances the response to cisplatin in bladder cancer through VDR and TAp73 signaling crosstalk. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 5, p. 2449, 2019.

BURETA, C. et al. Synergistic effect of arsenic trioxide, vismodegib and temozolomide on glioblastoma. **Oncology Reports**, v. 41, p. 3404–3412, 2019.

CASALE, J.; PATEL, P. Fluorouracil. In: **StatPearls [NCBI Bookshelf]**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2022.

CASTELLANO-CASTILLO, D. et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and global DNA methylation in visceral adipose tissue from colorectal cancer patients. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2019.

CHAIPRASONGSUK, A. et al. Protective effects of novel derivatives of vitamin D3 and lumisterol against UVB-induced damage in human keratinocytes involve activation of Nrf2 and p53 defense mechanisms. **Redox Biology**, v. 24, n. 3, p. 24–27, 1 jun. 2019.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110, 2015.

CHANG, J.-H. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 361–368, 1 mar. 2012.

CHARTIER, É. A. **Minerve ou de La sagesse**. Paris: Paul Hartmann, 1939.

CHEN, D. et al. *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. **Cancer Letters**, v. 469, p. 456–467, 28 jan. 2020.

CHEN, L. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling. **Aging Cell**, v. 18, p. e12951, 2019.

CHEN, L. et al. Vitamin D3 attenuates doxorubicin-induced senescence of human aortic endothelial cells by upregulation of IL-10 via the pAMPK α /Sirt1/Foxo3a signaling pathway. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6, 1 jun. 2021.

CHEN, W. et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

CHEN, Y. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D Promotes negative feedback regulation of toll-like receptor signaling via targeting MicroRNA-155-SOCS1 in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3687–3695, 2014.

CHEN, Z. Y. et al. Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 1, 1 jan. 2017.

CHOI, S. S. et al. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 452–458,

2006.

CHOU, T. C. Preclinical versus clinical drug combination studies. **Leukemia and Lymphoma**, v. 49, n. 11, p. 2059–2080, 2008.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, n. C, p. 27–55, 1984.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 365, 2016.

CHUNG, I. et al. Role of VDR in anti-proliferative effects of calcitriol in tumour-derived endothelial cells and tumour angiogenesis in vivo. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 967–975, 2009.

COSTEA, T. et al. Chemoprevention of colorectal cancer by dietary compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

CROWE, A. R.; YUE, W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: An integrated protocol. **Bio-protocol**, v. 9, n. 24, 2019.

DA SILVA, F. M. M. et al. Colorectal cancer in patients under age 50: A five-year experience. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 47, n. 1, p. 1–10, 2020.

DARBAND, S. G. et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis. **Life Sciences**, v. 253, n. 117584, p. 1–13, 2020.

DAS, V.; KALITA, J.; PAL, M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 8–19, 2017.

DAVOODVANDI, A. et al. An update on the effects of probiotics on gastrointestinal cancers. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. 680400, 2021.

DAY, R. L. J. et al. Probiotics: Current landscape and future horizons. **Future Science OA**, v. 5, n. 4, 2019.

DE ALMEIDA, C. V. et al. Role of diet and gut microbiota on Colorectal cancer immunomodulation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 151–162, 2019.

DE OLIVEIRA, G. A. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase in the Carcinogenesis of Gastrointestinal Cancers. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 18, p. 1059, 20 jun. 2017.

DEKKER, E. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 2019.

DEL CARMEN, S. et al. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 122–129, 1 jan. 2017.

DETREGIACHI, C. R. P. et al. Effect of vitamin D supplements on the body weight and glycaemia in Wistar rats. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v.

10, n. 1, p. 1–8, 2016.

DING, S. et al. The protective role of probiotics against colorectal cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 8884583, p. 1–10, 2020.

DORE, M. P. et al. Side effects associated with probiotic use in adult patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 1–12, 2019.

DOS REIS, S. A. et al. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. **Nutrition Research**, v. 37, p. 1–19, 2017.

DOUEDI, S.; CARSON, M. P. Anthracycline medications (Doxorubicin). In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021.

DURKO, L.; MALECKA-PANAS, E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 10, n. 1, p. 45, 2014.

DUSSO, A. S.; BROWN, A. J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 289, n. 1 58-1, p. 8–28, 2005.

EL-DIN, S. S. et al. Active form of vitamin D analogue mitigates neurodegenerative changes in Alzheimer's disease in rats by targeting Keap1/Nrf2 and MAPK-38p/ERK signaling pathways. **Steroids**, v. 156, p. 108586, 2020.

EL-MAGD, N. F. A.; ERAKY, S. M. The molecular mechanism underlining the preventive effect of vitamin D against hepatic and renal acute toxicity through the NrF2/BACH1/HO-1 pathway. **Life Sciences**, v. 244, n. 117331, p. 1–13, 2020.

EL-SHARKAWY, A.; MALKI, A. Vitamin D signaling in inflammation and cancer: Molecular mechanisms and therapeutic implications. **Molecules**, v. 25, n. 3219, p. 1–31, 2020.

EL-SHEMI, A. G. et al. Paricalcitol enhances the chemopreventive efficacy of 5-fluorouracil on an intermediate-term model of azoxymethane-induced colorectal tumors in rats. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 6, p. 491–501, 2016.

ESCAMILLA, J.; LANE, M. A.; MAITIN, V. Cell-free supernatants from probiotic lactobacillus casei and lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 6, p. 871–878, 2012.

ESLAMI, M. et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 17127–17143, 2019.

FAGHFOORI, Z. et al. Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021.

FAHMY, C. A. et al. Bifidobacterium longum suppresses murine colorectal cancer through the modulation of oncomirs and tumor suppressor miRNAs. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 4, p. 688–700, 2019.

FAKHOURY, H. M. A. et al. Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 200, n. 105663, p. 1–9, 2020.

FARROKHI, A. S. et al. Histone deacetylase modifications by probiotics in colorectal

- cancer. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 51, n. 3, p. 754–764, 2020.
- FARVID, M. S. et al. Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 9, p. 937–951, 2021.
- FENG, Q. et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Nature Communications**, v. 6, 2015.
- FERRANDEZ, A.; PRESCOTT, S.; BURT, R. COX-2 and colorectal cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 27, p. 2229–2251, 2003.
- FERRER-MAYORGA, G. et al. Vitamin D and Wnt3A have additive and partially overlapping modulatory effects on gene expression and phenotype in human colon fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- FOCAC CETTI, C. et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 115686, 2015.
- FOO, N. P. et al. Probiotics prevent the development of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic tumorigenesis through suppressed colonic mucosa cellular proliferation and increased stimulation of macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13337–13345, 2011.
- FREEDMAN, D. M. et al. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 21, p. 1594–1602, 2007.
- FROICU, M. et al. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 12, p. 2386–2392, 2003.
- FU, X. et al. The cardioprotective mechanism of phenylaminoethyl selenides (PAESE) against doxorubicin-induced cardiotoxicity involves frataxin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 574656, p. 1–14, 2021.
- GANESH, K. et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. **Nature reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 6, p. 361, 1 jun. 2019.
- GENARO, S. C. et al. Probiotic supplementation attenuates the aggressiveness of chemically induced colorectal tumor in rats. **Life Sciences**, v. 237, p. 116895, 2019.
- GHANAVATI, R. et al. Lactobacillus species inhibitory effect on colorectal cancer progression through modulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 470, p. 1–13, 1 jul. 2020.
- GIBBS, D. C. et al. Inflammation modulation by vitamin D and calcium in the morphologically normal colorectal mucosa of colorectal adenoma patients in a clinical trial. **Cancer Prevention Research**, v. 14, n. 1, p. 65, 2021.
- GLOWKA, E.; STASIAK, J.; LULEK, J. Drug delivery systems for vitamin D supplementation and therapy. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, 2019.
- GOLD, J. M.; RAJA, A. Cisplatin. In: **StatPearls [NCBI Bookshelf]**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021.

- GONZÁLEZ-MAGAÑA, A.; BLANCO, F. J. Human PCNA structure, function, and interactions. **Biomolecules**, v. 10, n. 570, 2020.
- GONZÁLEZ-SANCHO, J. M.; LARRIBA, M. J.; MUÑOZ, A. Wnt and vitamin D at the crossroads in solid cancer. **Cancers**, v. 12, n. 3434, p. 1–19, 1 nov. 2020.
- GORADEL, N. H. et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 5, p. 5683–5699, 2019.
- GORHAM, E. D. et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 97, n. 1–2, p. 179–194, 2005.
- GORSKA-PONIKOWSKA, M. et al. 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 11, p. 3030–3049, 1 nov. 2017.
- GUARNER, F. et al. **Probiotics and prebiotics**. Milwaukee (WI): WGO Global Guidelines, 2017.
- GUPTA, N. et al. Lactobacillus reuteri DSM 17938 and ATCC PTA 5289 ameliorates chemotherapy-induced oral mucositis. **Scientific Reports**, v. 10, p. 16189, 2020.
- GURJAO, C. et al. Discovery and features of an alkylating signature in colorectal cancer. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 10, p. 2446–2455, 2021.
- HE, M.; SHI, B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: The role of probiotics and prebiotics. **Cell and Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- HENDLER, R.; ZHANG, Y. Probiotics in the treatment of colorectal cancer. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 101, 2018.
- HILLS, R. D. et al. Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.
- HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.
- HOSSEINIRAD, H. et al. Protective effect of vitamin D3 against Pb-induced neurotoxicity by regulating the Nrf2 and NF-κB pathways. **Neurotoxicity Research**, v. 39, p. 687–696, 2021.
- HOURDEQUIN, K. C. et al. Toxic effect of chemotherapy dosing using actual body weight in obese versus normal-weight patients: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 12, p. 2952–2962, 2013.
- HUANG, Z. et al. Vitamin D promotes the cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma by inhibiting LCN2-modulated NF-κB pathway activation through RPS3. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 12, 2019.
- HUSSAN, H. et al. Rising incidence of colorectal cancer in young adults corresponds with increasing surgical resections in obese patients. **Clinical and Translational Medicine**, v. 11, n. 4, p. e00160, 2020.
- IACONELLI, C. et al. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 17–26, 20 nov. 2015.

IDRIS, S. et al. Enhanced in vitro tumoricidal effects of 5-fluorouracil, thymoquinone, and active vitamin D3 triple therapy against colon cancer cells by attenuating the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Life Sciences**, v. 296, p. 120442, 2022.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). COMMITTEE TO REVIEW DIETARY REFERENCE INTAKES FOR CALCIUM AND VITAMIN D. Tolerable upper intake levels: Calcium and vitamin D. In: ROSS, A. C. et al. (Ed.). **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.

IRECTA-NÁJERA, C. A. et al. Protective effect of *Lactobacillus casei* on DMH-induced colon carcinogenesis in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 2, p. 163–171, 2017.

ISAZADEH, A. et al. Anti-cancer effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for colorectal cancer cell line Caco-2 through apoptosis induction. **Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 262–267, 2021.

ISEKI, K. et al. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. **International Journal of Cancer**, v. 81, n. 5, p. 730–733, 1999.

JANAKIRAM, N. B.; RAO, C. V. Chemoprevention of colon cancer by iNOS-selective inhibitors. **Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 155–167, 2012.

JEON, S. M.; SHIN, E. A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p. 1–14, 2018.

JOANNA, B. et al. Vitamin D, linoleic acid, arachidonic acid and COX-2 in colorectal cancer patients in relation to disease stage, tumour localisation and disease progression. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 3, p. 121–126, 2019.

JOHNSON-ARBOR, K.; DUBEY, R. Doxorubicin. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–5, 2021.

JUAN, M. E. et al. Reduction of preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon by maslinic acid, a pentacyclic triterpene from *Olea europaea* L. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.

KAEID, L. S.; SHUKLA, G. Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG) in conjunction with celecoxib (selective COX-2 inhibitor) modulated DMH-induced early experimental colon carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 70, n. 6, p. 946–955, 2018.

KEUM, N. et al. Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: A meta-Analysis of randomized controlled trials. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 5, p. 733–743, 2019.

KIM, J. M.; PARK, E. Coenzyme Q10 attenuated DMH-induced precancerous lesions in SD rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 56, n. 2, p. 139–144, 2010.

KLUSEK, J.; GŁUSZEK, S.; KLUSEK, J. GST gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. **Contemporary Oncology**, v. 18, 2014.

- KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
- LAMICHHANE, P. et al. Colorectal cancer and probiotics: Are bugs really drugs? **Cancers**, v. 12, n. 5, 2020.
- LEE, C. W. et al. Synbiotic Combination of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and *Lactobacillus acidophilus* Inhibits Colon Carcinogenesis in Rats. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020.
- LEE, K. J. et al. Cytoprotective effect of vitamin d on doxorubicin-induced cardiac toxicity in triple negative breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7439, 2 jul. 2021.
- LENOIR, M. et al. *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 9, p. 862–873, 2016.
- LI, W. et al. Combined use of vitamin D3 and metformin exhibits synergistic chemopreventive effects on colorectal neoplasia in rats and mice. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 2, p. 139–148, 2015.
- LI, X. Y. et al. Doxorubicin resistance induces IL6 activation in the colon cancer cell line LS180. **Oncology Letters**, v. 16, n. 5, p. 5923–5929, 2018.
- LIAO, W.; YE, T.; LIU, H. Prognostic Value of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Human Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- LIBOREDO, J. C. et al. Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 367–372, 2013.
- LIU, H. et al. Triggers for the Nrf2/ARE Signaling Pathway and Its Nutritional Regulation: Potential Therapeutic Applications of Ulcerative Colitis. **Molecular Sciences**, v. 22, n. 11411, p. 1–13, 2021.
- LIU, W. et al. The Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D in Tumorigenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2736, 13 set. 2018.
- MA, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401, 2013.
- MA, Y. et al. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: A systematic review of prospective studies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 28, p. 3775–3782, 2011.
- MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9–26, 2009.
- MAEDA, S. S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 411–433, 2014.
- MANIGANDAN, K. et al. Taxifolin curbs NF- κ B-mediated Wnt/ β -catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis. **Biochimie**, v. 119, p. 103–112, 2015.

- MANSON, J. A. E. et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 1, p. 33–44, 2019.
- MARK, K. A. et al. Vitamin D promotes protein homeostasis and longevity via the stress response pathway genes SKN-1, IRE-1, and XBP-1. **Cell Reports**, v. 17, n. 5, p. 1227–1237, 2016.
- MCCULLOUGH, M. L. et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2003.
- MEHTA, R. G. et al. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 950–961, 2010.
- MEHTA, S. S. et al. A prospective analysis of red and processed meat consumption and risk of colorectal cancer in women. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 29, n. 1, p. 141–150, 2020.
- MILCZAREK, M. et al. Vitamin D analogs combined with 5-fluorouracil in human HT-29 colon cancer treatment. **Oncology Reports**, v. 32, n. 2, p. 491, 2014.
- MOHANIA, D. et al. Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* modulates the formation of aberrant crypt foci, mucin-depleted foci, and cell proliferation on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Rejuvenation Research**, v. 17, n. 4, p. 325–333, 2014.
- MOTEVASELI, E. et al. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART7, p. 1065–1072, 2013.
- MURILLO, G. et al. Actions of vitamin D are mediated by the Tlr4 pathway in inflammation-induced colon cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1–2, p. 403–407, 2010.
- MUSCARÁ, M. N.; WALLACE, J. L. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 39, p. G1313–G1316, 1999.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Fluorouracil**. Bethesda (MD), [2022]. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluorouracil>>. Acesso em: 3 abr. 2022a.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **cis-Diamminedichloroplatinum**. Bethesda (MD), [2022]. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441203>>. Acesso em: 3 abr. 2022b.
- NEWMARK, H. L. et al. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: A preclinical model for human sporadic colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 88–92, 2009.
- NICHOLSON, B. D. et al. Weight loss as a predictor of cancer in primary care: a systematic review and meta-analysis. **The British Journal of General Practice**, v. 68, n. 670, p. e311, 2018.
- NICHOLSON, B. D. et al. The association between unexpected weight loss and cancer diagnosis in primary care: a matched cohort analysis of 65,000 presentations. **British**

Journal of Cancer, v. 122, n. 12, p. 1848, 2020.

NIE, X. et al. Emerging roles of Wnt ligands in human colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1–13, 2020.

NOURI, Z. et al. Dual anti-metastatic and anti-proliferative activity assessment of two probiotics on HeLa and HT-29 cell lines. **Cell Journal**, v. 18, n. 2, p. 127–134, 2016.

OH, N. S. et al. Cancer-protective effect of a synbiotic combination between *Lactobacillus gasseri* 505 and a *Cudrania tricuspidata* leaf extract on colitis-associated colorectal cancer. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2020.

OHARA, T.; SUZUTANI, T. Intake of *Bifidobacterium longum* and fructooligosaccharides prevents colorectal carcinogenesis. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**, v. 8, n. 1, p. 11–17, 2018.

PANDURANGAN, A. K. et al. Luteolin, a bioflavonoid inhibits Azoxymethane-induced colorectal cancer through activation of Nrf2 signaling. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 6516, n. 1, p. 13–20, 2014.

PARISA, A. et al. Anti-cancer effects of *Bifidobacterium* species in colon cancer cells and a mouse model of carcinogenesis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. e0232930, 2020.

PEDREIRO, S. R. J. **Avaliação de efeitos sinérgicos entre compostos fenólicos do *Cymbopogon citratus***. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2018.

PENNY, L. K.; WALLACE, H. M. The challenges for cancer chemoprevention. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8836–8847, 2015.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.

PILLOZZI, S. et al. The combined activation of K_{Ca} 3.1 and inhibition of K_v 11.1/hERG1 currents contribute to overcome Cisplatin resistance in colorectal cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 2, p. 200–212, 2018.

PIOTROWSKA, A. et al. Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 4, p. 1481, 2019.

POTOČNIK, N. et al. Cardiac autonomic modulation induced by doxorubicin in a rodent model of colorectal cancer and the influence of fullereneol pretreatment. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 2017.

PU, D. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor: A potential combination strategy with immunotherapy in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 248, 2021.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.

RECIO-BOILES, A.; CAGIR, B. **Colon cancer**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021. v. 2.

REFAAT, B. et al. Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 71, p. 1–15, 2015.

REJHOVÁ, A. et al. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 582–594, 2018.

RENEHAN, A. G. et al. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Colorectal Disease**, v. 4, n. 2, p. 76–89, 2002.

RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: Comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, p. 351–355, 2002.

SADEGHI-ALIABADI, H. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 815–819, 2014.

SADEGHI, M. R. et al. The role of Nrf2-Keap1 axis in colorectal cancer, progression, and chemoresistance. **Tumour Biology**, v. 39, n. 6, p. 1–6, 2017.

SAEEDI, B. J. et al. Gut-resident *Lactobacilli* activate hepatic Nrf2 and protect against oxidative liver injury. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 5, p. 956–968.e5, 2020.

SANTOSA, S.; FARNWORTH, E.; JONES, P. J. H. Probiotics and their potential health claims. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 6, p. 265–274, 2006.

SAUS, E. et al. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 69, p. 93, 2019.

SCHATOFF, E. M.; LEACH, B.; DOW, L. E. Wnt signaling and colorectal cancer. **Physiology & Behavior**, v. 13, n. 2, p. 101–110, 2017.

SENGER, D. R. et al. Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: Disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148042, 2016.

SHANG, M.; SUN, J. Vitamin D/VDR, probiotics, and gastrointestinal diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 876, 2017.

SHARAF, L. K. et al. Prophylactic intervention of probiotics (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG) and celecoxib modulate Bax-mediated apoptosis in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

SHARAN, C. et al. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-o-methyltransferase. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 1, p. 247, 2011.

SHEBBO, S. et al. Hepatoprotective effect of *Matricaria chamomilla* aqueous extract against 1,2-Dimethylhydrazine-induced carcinogenic hepatic damage in mice. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04082, 2020.

SHENG, J. et al. The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1095–1101, 2020.

- SHOKRYAZDAN, P. et al. Safety assessment of two new *Lactobacillus* strains as probiotic for human using a rat model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159851, 2016.
- SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 69–75, 2015.
- SHRUTHI, N. et al. Analysis of the cytotoxic effects of vitamin D3 on colorectal, breast and cervical carcinoma cell lines. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 2–8, 2017.
- SHUWEN, H. et al. Protective effect of the “food-microorganism-SCFAs” axis on colorectal cancer: from basic research to practical application. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 9, p. 2169–2197, 2019.
- SONG, M.; CHAN, A. T. Environmental factors, gut microbiota, and colorectal cancer prevention. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 275–289, 2019.
- SONG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244–1260, 2015.
- SONG, M. Y. et al. The role of NRF2/KEAP1 signaling pathway in cancer metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4376, 2021.
- SONGYANG, Y. et al. Effect of vitamin D on malignant behavior of non-small cell lung cancer cells. **Gene**, v. 768, 2021.
- SONOWAL, H. et al. Aldose reductase inhibitor increases doxorubicin-sensitivity of colon cancer cells and decreases cardiotoxicity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 3182, p. 1–14, 2017.
- SUN, M. et al. The effects of *Lactobacillus plantarum*-12 crude exopolysaccharides on the cell proliferation and apoptosis of human colon cancer (HT-29) cells. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 13, n. 2, p. 413–421, 2021.
- SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- SUTHAR, K. H.; AL MUTAR, S.; VENKATESAN, R. Oxaliplatin-induced pulmonary toxicity: A rare but serious complication. **Cureus**, v. 12, n. 3, 2020.
- SUZUI, M.; MORIOKA, T.; YOSHIMI, N. Colon preneoplastic lesions in animal models. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 4, p. 335–341, 2013.
- TAGLIABUE, E.; RAIMONDI, S.; GANDINI, S. **Vitamin D, Cancer Risk, and Mortality**. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 75.
- TEBBEN, P. J.; SINGH, R. J.; KUMAR, R. Vitamin D-mediated hypercalcemia: mechanisms, diagnosis, and treatment. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 5, p. 521, 2016.
- TEICHERT, A.; BIKLE, D. D. Vitamin D and cancer: A report of the IARC Working Group on Vitamin D. **Bioactive Foods and Extracts: Cancer Treatment and Prevention**, p. 481–495, 2010.
- THUMU, S. C. R.; HALAMI, P. M. In vivo safety assessment of *Lactobacillus fermentum* strains, evaluation of their cholesterol-lowering ability and intestinal microbial modulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 2, p.

705–713, 2020.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823, 2017.

ȚIGU, A. B. et al. The synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil combined with allicin against lung and colorectal carcinoma cells. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1947, 2020.

TIPTIRI-KOURPETI, A. et al. Lactobacillus casei exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–20, 2016.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727, 2018.

TORRES-MARAVILLA, E. et al. Role of gut microbiota and probiotics in colorectal cancer: Onset and progression. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, 2021.

TRIPATHY, A. et al. Probiotics: A promising candidate for management of colorectal cancer. **Cancers**, v. 13, n. 13, 2021.

TSAI, C. C. et al. Safety evaluation of multiple strains of Lactobacillus plantarum and Pediococcus pentosaceus in wistar rats based on the Ames test and a 28-day feeding study. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

TUKENMEZ, U. et al. The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

TURESKEY, R. J. Mechanistic evidence for red meat and processed meat intake and cancer risk: A follow-up on the International Agency for Research on Cancer Evaluation of 2015. **Chimia**, v. 72, n. 10, p. 718–724, 2018.

ULRICH, C. M. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D₃, folate and vitamin B12 biomarkers among international colorectal cancer patients: A pilot study. **Journal of Nutritional Science**, v. 2, p. 1–6, 2013.

VANINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334–343, 2015.

VARGHESE, J. E. et al. Role of vitamin D₃ on apoptosis and inflammatory-associated gene in colorectal cancer: An in vitro approach. **Journal of King Saud University. Science**, v. 32, n. 6, p. 2786–2789, 2020.

VERMA, A.; SHUKLA, G. Synbiotic (Lactobacillus rhamnosus+Lactobacillus acidophilus+inulin) attenuates oxidative stress and colonic damage in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon carcinogenesis in Sprague-Dawley rats: A long-term study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 6, p. 550–559, 2014.

WALIA, S. et al. Chemoprevention by probiotics during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 63, n. 4, p. 900–909, 2018.

WANG, Y. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 521, p. 1–15, 2017.

- WATERHOUSE, M. et al. Vitamin D and the gut microbiome: a systematic review of in vivo studies. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 2895–2910, 2019.
- WEI, H. et al. Antitumor mechanisms of bifidobacteria (Review). **Oncology Letters**, v. 16, n. 1, p. 3–8, 2018.
- WEISS, A. et al. Rapid optimization of drug combinations for the optimal angiostatic treatment of cancer. **Angiogenesis**, v. 18, n. 3, p. 233, 2015.
- WIERZBICKA, J. M. et al. Differential antitumor effects of vitamin D analogues on colorectal carcinoma in culture. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 3, p. 1084, 1 set. 2015.
- WROBEL, P.; AHMED, S. Current status of immunotherapy in metastatic colorectal cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 2019.
- XIONG, S.; XIAO, G. W. Reverting doxorubicin resistance in colon cancer by targeting a key signaling protein, steroid receptor coactivator. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 4, p. 3751–3758, 2018.
- YAKOVLEV, V. A. et al. Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. **Biochemistry**, v. 49, n. 25, p. 5331–5339, 2010.
- YANG, M. et al. Association between serum creatinine concentrations and overall survival in patients with colorectal cancer: A multi-center cohort study. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. 710423, 2021.
- YIN, L. et al. Meta-analysis: Serum vitamin D and colorectal adenoma risk. **Preventive Medicine**, v. 53, n. 1–2, p. 10–16, 2011.
- YUE, Y. C. et al. Metabolite secretions of *Lactobacillus plantarum* YYC-3 may inhibit colon cancer cell metastasis by suppressing the VEGF-MMP2/9 signaling pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2020.
- ZAHARUDDIN, L. et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 1, p. 131, 2019.
- ZAINALABIDIN, S.; TAN, S. M.; YAP, W. B. Safety evaluation of *Lactobacillus casei* C1 in Wistar rats. **Jurnal Sains Kesihatan Malaysia**, v. 16, n. 2, p. 23–31, 2018.
- ZAWISTOWSKA-ROJEK, A.; TYSKI, S. Are probiotic really safe for humans? **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 251, 2018.
- ZHANG, M. et al. *Lactobacillus salivarius* REN inhibits rat oral cancer induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 7, p. 686–694, 2013.
- ZHANG, N. et al. 5-fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1551, 2008.
- ZHENG, H. J. et al. The effect of probiotic and synbiotic supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Pharmacological Research**, v. 142, p. 303–313, 2019.

ZHOU, H. et al. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer: A meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 50, 2018.

APÊNDICE A – Resultados do ensaio piloto de FCA

Tabela 12 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.

Grupos de tratamento	Número de FCA com					Número de FCA	Número de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
DMH	22,50±15,67	10,17±3,66	4,00±2,10	2,00±1,90	0,17±0,41	38,83±12,62	63,67±6,15	1,78±0,58
Vit D 500 UI + DMH	23,40±8,18	7,20±4,55	2,00±1,00	0,60±0,50	0,40±1,00	42,00±20,33	54,83±11,74	1,45±0,35
Vit D 1000 UI + DMH	19,20±17,78	9,40±1,50	4,40±4,43	1,20±1,00	0,40±0,58	43,25±25,24	75,80±23,4	1,74±0,40
Vit D 2000 UI + DMH	20,67±6,74	4,55±9,40	1,00±4,4	0,50±1,20	1,00±0,40	29,50±6,32	43,17±10,83	1,47±0,27
Prob 10 ⁷ UFC + DMH	15,50±4,59	4,33±2,66	2,50±1,97	1,00±1,26	0,17±0,41	23,50±3,39	36,50±8,62	1,56±0,37
Prob 10 ⁸ UFC + DMH	24,80±7,39	19,20±2,94	4,20±2,22	2,00±2,52	0,20±0,50	63,00±30,84	106,00±28,67	1,67±0,09
Prob 10 ⁹ UFC + DMH	12,20±2,87	8,60±3,30	2,60±2,99	0,40±0,58	0,40±0,58	30,25±14,02	50,60±10,99	1,67±0,20
Comb 500 UI + 10 ⁸ UFC + DMH	19,40±4,19	11,40±5,56	4,60±0,96	0,40±0,58	0±0	44,75±21,42	72,40±14,12	1,60±0,72
Comb 1000 UI + 10 ⁸ UFC + DMH	32,20±12,37	12,60±6,40	3,60±3,11	0,20±0,50	0±0	60,75±32,08	79,40±30,50	1,42±0,11

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: FCA: focos de criptas aberrantes, CA: criptas aberrantes, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, Comb: combinação de vitamina D com mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia. DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Um total de 50 campos consecutivos foram analisados por animal. Os valores são média±desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey).

APÊNDICE B – Avaliação da carcinogenicidade

Tabela 13 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos e respectivos grupos controle.

Grupos de tratamento	Número de FCA com					Total de FCA	Total de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
Controle negativo	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Controle solvente	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Vit D 2000 UI	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Prob 10 ⁷ UFC	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: Controle negativo: água + EDTA 1mM, Controle solvente: óleo vegetal 10%), Vit D: vitamina D (2000 UI), Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum* (10⁷ UFC), EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético, UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia. Os valores são média±desvio padrão.

APÊNDICE C – Resultados do ensaio de FCA no tratamento simultâneo

Tabela 14 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.

Grupos de tratamento	Número de FCA com					Número de FCA	Número de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
DMH	22,50±15,67	10,17±3,66	4,00±2,10	2,00±1,90	0,17±0,41	38,83±12,62	63,67±6,15	1,78±0,58
Solvente + DMH	12,50±3,50	12,17±2,42	4,33±1,17	1,00±0,98	0,67±0,52	30,67±4,72	57,17±9,95	1,86±0,19
Vit D 250 UI + DMH	11,83±5,78	5,67±2,66	2,33±1,86	0,67±0,82	0±0	20,50±4,18 ***	32,83±5,64 ****	1,62±0,24
Vit D 2000 UI + DMH	20,67±6,74	5,33±1,37	2,33±1,97	1,00±1,55	0,17±0,41	29,50±6,32	43,17±10,8 **	1,47±0,27
Prob 10 ⁵ UFC + DMH	15,50±6,09	9,67±2,16	6,17±2,71	2,00±0,89	0,17±0,41	33,50±4,68	62,17±9,2	1,86±0,21
Prob 10 ⁷ UFC + DMH	15,50±4,59	4,33±2,66	2,50±1,97	1,00±1,26	0,17±0,41	23,50±3,39 **	36,50±8,62 ****	1,56±0,37
Comb 250 UI + 10 ⁷ UFC + DMH	8,17±3,43	10,00±4,60	3,67±1,75	1,50±1,22	0 ± 0	38,83±12,62	63,67±6,15	1,78±0,58
Comb 2000 UI + 10 ⁷ UFC + DMH	10,33±4,5	9,33±1,86	5,17±1,33	1,00±1,1	0 ± 0	23,33±5,2 **	45,17±10,5 **	1,94±0,16

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: FCA: focos de criptas aberrantes, CA: criptas aberrantes, Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*, Comb: combinação de vitamina D com mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia. DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Um total de 50 campos consecutivos foram analisados por animal. Os valores são média±desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey).

APÊNDICE D – Resultados do ensaio de FCA no pré-tratamento

Tabela 15 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira prévia à indução de carcinogênese.

Grupos de tratamento	Número de FCA com					Número de FCA	Número de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
DMH	22,50±15,67	10,17±3,66	4,00±2,10	2,00±1,90	0,17±0,41	38,83±12,62	63,67±6,15	1,78±0,58
Solvente + DMH	8,83±5,04	10,83±2,79	6,50±1,76	1,83±1,33	0±0	28,00±2,83	57,33 ± 5,32	2,06±0,23
Vit D 250 UI + DMH	9,67±3,78	8,50±2,74	4,17±1,94	1,83±1,33	0±0	24,17±4,54 **	46,50±9,73 *	1,93±0,27
Vit D 2000 UI + DMH	9,67±3,14	9,50±2,26	6,83±2,99	2,33±1,03	0±0	28,33±4,08	58,50±7,37	2,07±0,12
Prob 10 ⁵ UFC + DMH	17,17±5,42	11,17±4,58	4,17±2,23	1,33±1,03	0±0	33,83±6,11	57,33±8,36	1,72±0,25
Prob 10 ⁷ UFC + DMH	8,83±2,71	9,33±3,39	4,67±1,97	1,17±0,98	0,17±0,41	24,17±6,34 **	47,00±13,01 *	1,94±0,22
Comb 250 UI + 10 ⁷ UFC + DMH	7,00±3,79	8,17±3,13	2,33±1,86	1,50±1,05	0±0	19,00±3,22 **	36,33±2,58 ***	1,96±0,35

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: FCA: focos de criptas aberrantes, CA: criptas aberrantes, Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia. DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Um total de 50 campos consecutivos foram analisados por animal. Os valores são média±desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey).

APÊNDICE E – Resultados do ensaio de FCA no pós-tratamento

Tabela 16 – Médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com vitamina D e/ou probióticos de maneira posterior à indução de carcinogênese.

Grupos de tratamento	Número de FCA com					Número de FCA	Número de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
DMH	22,50±15,67	10,17±3,66	4,00±2,10	2,00±1,90	0,17±0,41	38,83±12,62	63,67±6,15	1,78±0,58
Solvente + DMH	14,67±3,93	11,50±2,88	4,50±1,52	1,33±1,86	0 ± 0	32,00±5,33	56,50±11,27	1,76±0,14
Vit D 250 UI + DMH	18,83±9,30	10,17±5,23	4,33±1,21	1,50±1,05	0,17±0,41	35,00±6,54	59,00±9,08	1,71±0,25
Vit D 2000 UI + DMH	13,50±5,79	7,17±4,26	2,00±0,89	1,67±1,03	0,33±0,82	24,67±6,09 *	42,17±10,7 **	1,73±0,33
Prob 10 ⁵ UFC + DMH	7,67±3,83	9,17±3,19	7,67±2,42	2,50±1,05	0 ± 0	27,00±3,90	59,00±6,32	2,20±0,19
Prob 10 ⁷ UFC + DMH	16,20±6,72	6,40±5,13	3,20±2,28	0,40±0,89	0 ± 0	26,20±7,22	40,20±13,12 **	1,54±0,28
Comb 2000 UI + 10 ⁷ UFC + DMH	8,67±4,23	6,17±2,32	4,17±1,47	1,33±1,03	0 ± 0	20,33±2,80 ***	38,83±6,18 ***	1,92±0,28

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: FCA: focos de criptas aberrantes, CA: criptas aberrantes, Solvente: óleo vegetal 10%, Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia. DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Um total de 50 campos consecutivos foram analisados por animal. Os valores são média±desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001 comparado ao grupo DMH (ANOVA *one-way* e teste de Tukey).

APÊNDICE F – Resultados do ensaio bioquímico

Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos determinados no soro de ratos Wistar tratados com vitamina D ou probióticos de maneira simultânea à indução de carcinogênese.

Grupos de tratamento	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
CN	29,00±17,35	138,33±51,42	0,61±0,07	40,67±11,93
DMH	20,67±8,96	212,00±208,15	14,46±16,62	18,83±20,99
Vit D 250 UI + DMH	37,40±6,62	65,67±13,82	0,65±0,03	36,17±1,94
Vit D 2000 UI + DMH	39,00±4,97	70,75±21,82	0,58±0,04	30,00±4,08
Prob 10 ⁷ UFC + DMH	29,00±0	79,00±9,9	0,56±0,02	25,50±2,12

Fonte: Do autor (2022)

Legenda: CN: controle negativo (água + EDTA 1mM), DMH: 1,2-Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c), Vit D: vitamina D, Prob: mix de probióticos *L. gasseri* + *B. bifidum*. UI: unidades internacionais. UFC: unidades formadoras de colônia, EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético, ALT: alanina aminotransferase, AST aspartato aminotransferase. Os valores são média±desvio padrão.

ANEXO A

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITOS DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE PROBIÓTICO E VITAMINA D SOBRE A CARCINOGENESE DO CÓLON**, registrada com o nº **0008/2020**, sob a responsabilidade de **Pollyanna Francielli de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/06/2020 a 01/07/2022**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/Inhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	206	206	0	Biotério central da universidade federal de alfenas

Alfenas, 16 de Novembro de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG