

---

**EFFECT OF THE PREBIOTICS NUTRIOSE<sup>®</sup> FB 06 AND  
RAFTILOSE<sup>®</sup> P95 UPON THE UPTAKE OF THE SHORT-  
CHAIN FATTY ACID BUTYRATE AND UPON ITS EFFECT  
ON CELL PROLIFERATION, VIABILITY AND  
DIFFERENTIATION IN IEC-6 CELLS**

---

CÁTIA SOFIA MOREIRA DA COSTA

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Universidade do Porto  
Faculdade de Ciências  
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

2012



CÁTIA SOFIA MOREIRA DA COSTA

---

**EFFECT OF THE PREBIOTICS NUTRIOSE® FB 06 AND  
RAFTILOSE® P95 UPON THE UPTAKE OF THE SHORT-CHAIN  
FATTY ACID BUTYRATE AND UPON ITS EFFECT ON CELL  
PROLIFERATION, VIABILITY AND DIFFERENTIATION IN IEC-6  
CELLS**

---

Dissertação de Candidatura ao grau de  
Mestre em Bioquímica da Universidade  
do Porto

Orientador – Professora Doutora Maria  
de Fátima Moreira Martel

Categoria – Professora Associada com  
Agregação

Afiliação – Departamento de Bioquímica,  
Faculdade de Medicina da Universidade  
do Porto

Co-orientador – Dr. Pedro Gonçalves

Categoria – Estudante de Doutoramento

Afiliação – Departamento de Bioquímica,  
Faculdade de Medicina da Universidade  
do Porto

**2012**



Esta investigação foi realizada no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. O trabalho experimental foi realizado com o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), COMPETE, QREN e FEDER (PTDC/SAU-OSM/102239/2008).



## Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação neste trabalho, em especial:

- Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pela oportunidade de realização da Dissertação Mestrado;
- À Professora Doutora Fátima Martel pela orientação e por toda a sua atitude pedagógica, profissionalismo, dedicação, apoio e incentivo ao longo de todo o percurso, que permitiu a concretização deste trabalho;
- Ao Dr. Pedro Gonçalves pela sua co-orientação. Por me ter integrado, por toda a compreensão e conhecimento transmitido. Pelo seu apoio, disponibilidade e espírito crítico ao longo de todo o processo de elaboração do presente trabalho. Pelo tempo que generosamente dedicou! Um enorme Obrigada!
- Ao Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Universidade do Porto, em especial à Professora Doutora Maria A. Vieira-Coelho pelo fornecimento dos prebióticos, Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95, utilizados nesta investigação;
- A todas as pessoas do Departamento, que me acompanharam, por me terem recebido, pela disponibilidade, simpatia e prontidão; especialmente ao João e à Ana Branco pelo convívio e partilha de conhecimento (em conjunto com Pedro);
- Aos meus amigos, que fiz ao longo deste percurso académico, em especial à Julinha, à Marisa, e nestes dois últimos anos os meus pitekinhos Marina, Ni (Daniela), Pipinhas (Bruno) e Joxinho ☺ . Tornaram-se grandes amigos e que assim seja para o resto da vida !!! Obrigada por todos os bons momentos ao longo destes anos que irei sempre recordar, por se rirem comigo e por me fazerem sorrir, pelo apoio em todos os momentos bons e menos bons, pela força constante sempre que precisei, pela alegria com que sempre começávamos um novo dia, pelo companheirismo... À minha Tininha xD

(Andreia) por me ter ajudado em TUDO ao longo deste último ano, pela amizade, paciência, companheirismo, pela troca de opiniões e pelos bons momentos que passamos... OBRIGADA por fazerem parte da minha vida e sobretudo pela verdadeira amizade...

- Ao Simão pela pessoa especial que se tem vindo a tornar na minha vida. Obrigada por todo o apoio que me dá todos os dias, por me ouvir, pela paciência, pela boa disposição que sempre o acompanha, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por acreditar em mim... Obrigada por tudo, obrigada pelo carinho determinante para o meu sorriso diário...
- Aos meus pais, a eles devo muito do que sou hoje... Obrigada pelo apoio e por tudo aquilo que me ajudaram a conquistar.
- Um agradecimento muito especial ao meu Maninho lindo (com a nossa coelhinha sempre ☺ ), pela pessoa sempre presente e fantástica que é para mim (pena é ser tão preguiçoso!!! Dá-me vontade de te dar umas boas palmadas por ver tantas capacidades, em todos os aspetos, desperdiçadas). Pelo carinho, miminho e atenção com que todos os dias, a toda o momento me presenteia... Jamais conseguirei descrever por palavras !!!
- A toda a minha família, em especial às minhas primas Eliana e Sara, pelas lindas pessoas que são !!! Sempre estiveram presentes, pelo incentivo incondicional ao longo de todo este percurso, pela paciência e ajuda ☺ .
- A toda a equipa Maia A.C. (clube que me deu oportunidade e no qual iniciei este percurso no atletismo à exatamente um ano) por me terem recebido tão bem, em especial ao Grande Professor José Regalo, o meu treinador, “que acolheu uma miúda caída do céu” que nunca praticou atletismo (que mal sabe o que é correr xD) e soube ter paciência, soube sempre quando era preciso dar tempo e que tem sempre a palavra certa; é sem dúvida uma Grande Pessoa, um Exemplo, a quem devo muito... A todos os colegas de equipa/formação do meu Maninho do C.D. Trofense, lindos miúdos que me fizeram/fazem vibrar todos (raríssimas exceções) os fins-de-semana...anos e anos...são parte de mim... E a todos aqueles que não estão mencionados mas que contribuíram para este curto mas intenso percurso...

...Obrigada a Todos...

## Índice

Agradecimentos.....	v
Índice.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de figuras.....	xiii
Abreviaturas.....	xvii
<b>Capítulo I : Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.    Cancro colo-retal.....	3
1.1    Carcinogénese colo-retal.....	4
1.2    Fatores de risco do cancro colo-retal.....	6
1.3    Rastreio, tratamento e quimioprevenção.....	6
2.    Fibra alimentar e prebióticos.....	7
2.1    Nutriose® FB 06.....	8
2.2    Raftilose® P95.....	9
2.3    Mecanismos de proteção contra o cancro colo-retal.....	10
3.    Butirato.....	11
3.1    Absorção intestinal de butirato.....	12
3.1.1    Transportador de monocarboxilatos do tipo 1, MCT1.....	13
3.1.2    Transportador de monocarboxilatos acoplado a sódio do tipo 1, SMCT1..	14
<b>Capítulo II : Objetivo.....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo III: Materiais e Métodos.....</b>	<b>19</b>
1.    Cultura celular das células IEC-6.....	21
2.    Tratamentos agudos e crónicos das células.....	21
3.    Determinação da captação de <sup>14</sup> C-butirato pelas células IEC-6.....	22
4.    Doseamento de proteínas.....	22

5. Determinação da viabilidade celular - atividade da desidrogenase do lactato (LDH) .....	23
6. Determinação da e proliferação celular - ensaio da sulforodamina B (SRB)....	24
7. Determinação da diferenciação celular-atividade da fosfatase alcalina (ALP) .	24
8. Extração de ARN e qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa de ARNm).....	25
9. Cálculos e tratamento estatístico.....	26
10. Materiais .....	27
<b>Capítulo IV : Resultados.....</b>	<b>29</b>
1. Efeito da Nutriose® FB 06 e da Raftilose® P95 sobre a captação apical de <sup>14</sup> C-BT em células IEC-6: dependência da concentração e do tempo.....	31
2. Efeito da Nutriose® FB 06 e da Raftilose® P95 sobre a captação apical de <sup>14</sup> C-BT mediada por SMCT1 e MCT1 em células IEC-6 .....	35
3. PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa de ARNm (qRT-PCR) de MCT1 e SMCT1 em células IEC-6.....	38
4. Efeito da Nutriose® FB 06 e da Raftilose® P95 na viabilidade e proliferação celular em células IEC-6 .....	39
5. Efeito da interação entre o BT e Nutriose® FB 06 ou BT e a Raftilose® P95 na viabilidade celular, proliferação e diferenciação em células IEC-6.....	44
<b>Capítulo V : Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo VI : Referências Bibliográficas.....</b>	<b>59</b>

## Resumo

O cancro colo-retal (CCR) é um dos cancros mais comuns em todo o mundo. A dieta está claramente ligada tanto ao risco como à incidência de CCR. Muitos estudos epidemiológicos mostram uma relação inversa entre a ingestão de fibra alimentar e a incidência de CCR. Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que escapam à hidrólise e absorção no trato superior do tubo digestivo e alcançam o cólon onde afetam benéficamente o hospedeiro pela proliferação seletiva de determinados tipos de bactérias (bifidobactérias, lactobacilos). O ácido gordo de cadeia curta, butirato (BT), produzido no lúmen intestinal principalmente através da fermentação bacteriana de fibra da dieta, desempenha um papel fundamental na homeostasia do epitélio do cólon, tendo múltiplos papéis reguladores a esse nível. Um dos efeitos benéficos do BT propostos para a saúde é a prevenção da carcinogénese do cólon. O BT é transportado para as células epiteliais do cólon por dois sistemas de transporte específicos: o transportador de monocarboxilatos electroneutro acoplado ao  $H^+$  do tipo 1 (MCT1) e o transportador de monocarboxilatos electrogénico acoplado ao  $Na^+$  do tipo 1 (SMCT1). O MCT1 e SMCT1 foram recentemente propostos como genes supressores tumorais, provavelmente devido à sua capacidade de mediar a captação do BT para as células epiteliais do cólon.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e da Raftilose<sup>®</sup> P95 sobre (a) a captação de  $^{14}C$ -BT e (b) os efeitos do BT sobre a proliferação, viabilidade e diferenciação celular, na linha celular de epitélio intestinal normal de rato, células IEC-6. A captação de  $^{14}C$ -BT foi determinada por cintilometria líquida. A expressão de ARNm de MCT1 e de SMCT1 foi quantificada por qRT-PCR. A viabilidade, proliferação e diferenciação celular foram quantificadas com os ensaios da desidrogenase do lactato (LDH), sulforodamina B (SRB) e fosfatase alcalina (ALP), respetivamente.

Este estudo demonstrou que agudamente (1 h, 3 h, 6 h), nenhum dos prebióticos testados (até 100 mg/ml) afetam a captação de  $^{14}C$ -BT nem a viabilidade e proliferação celular. Por outro lado, a exposição crónica (48 h) aos prebióticos (Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml and Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml) aumentou a captação de  $^{14}C$ -BT e este aumento não é dependente de alterações na viabilidade nem da proliferação celular. Este aumento parece envolver o SMCT1 mas não o MCT1. Os prebióticos não tiveram efeito na expressão de ARNm nem do SMCT1 nem do MCT1. O BT (5 mM; 48 h) diminuiu acentuadamente a viabilidade e a proliferação e aumentou a diferenciação celular das células IEC-6. Em geral, a combinação dos prebióticos com o BT não alterou significativamente estes parâmetros, pois apenas a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml diminuiu o efeito do BT sobre a viabilidade celular.

Tendo em conta estes resultados, que mostram que a exposição crónica à Nutriose® FB 06 e à Raftilose® P95 origina um aumento da captação de <sup>14</sup>C-BT pelas células epiteliais intestinais, pode-se especular que estes prebióticos possam interferir com os níveis intracelulares de BT no epitélio do cólon. Apesar da Nutriose® FB 06 e da Raftilose® P95 não terem modificado os efeitos do BT nos parâmetros estudados (viabilidade, proliferação e diferenciação celular), não podemos excluir que possam interferir no efeito do BT ao nível de outros alvos intracelulares (p.e. ao nível da apoptose ou da inibição da ativação do NF-KB), e deste modo contribuir para a homeostasia do epitélio do cólon.

**Palavras-chave:** Butirato, células IEC-6, MCT1, SMCT1, prebióticos, Nutriose® FB 06, Raftilose® P95.

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. Diet is clearly linked to both risk and incidence of CRC. Many epidemiological studies show an inverse relationship between dietary fiber intake and the incidence of CRC. Prebiotics are non-digestible food ingredients that escape hydrolysis and absorption in the upper digestive tract and reach the colon where they beneficially affect the host by inducing selective proliferation of a limited number of bacteria (*bifidobacteria*, *lactobacilli*). The short-chain fatty acid butyrate (BT), produced in the intestinal lumen by bacterial fermentation of mainly dietary fiber, plays a key role in colonic epithelium homeostasis, having multiple regulatory roles at that level. One of the proposed beneficial effects of BT on human colonic health is the prevention/inhibition of colon carcinogenesis. BT is transported into colonic epithelial cells by two specific carrier-mediated transport systems: the electroneutral H<sup>+</sup>-coupled monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and the Na<sup>+</sup>-coupled monocarboxylate cotransporter 1 (SMCT1). MCT1 and SMCT1 were recently proposed to function as tumor suppressors, most probably due to their ability to mediate the entry of BT into colonic epithelial cells.

The aim of this study was to evaluate the effect of the prebiotics Nutriose<sup>®</sup> FB06 and Raftilose<sup>®</sup> P95 upon (a) the uptake of <sup>14</sup>C-BT and (b) the effects of BT on cell proliferation, viability and differentiation, in the rat normal intestinal epithelial cell line, IEC-6 cells. Uptake of <sup>14</sup>C-BT was measured by liquid scintillation counting. MCT1 and SMCT1 mRNA expression was quantified by qRT-PCR. Cell viability, proliferation and differentiation were quantified with the lactate dehydrogenase (LDH), sulforhodamine B and alkaline phosphatase activity assays, respectively.

This study showed that acutely (1 h, 3 h, 6 h), none of the prebiotics tested (until 100 mg/ml) affect neither <sup>14</sup>C-BT uptake nor cellular viability and proliferation. On the other hand, chronic exposure (48 h) to prebiotics (Nutriose<sup>®</sup> FB06 50 mg/ml and Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml) increased <sup>14</sup>C-BT uptake and this increase is not dependent on changes on cell viability or proliferation. This increase appears to involve SMCT1 but not MCT1. Prebiotics had no effect in SMCT1 and MCT1 mRNA expression levels. BT (5 mM; 48 h) markedly decreased cellular viability and proliferation and increased IEC-6 cell differentiation. In general, combination of prebiotics with BT did not significantly modify these parameters, with the exception of Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml which decreased the effect of BT upon cell viability.

Given these results, showing that chronic exposure to Nutriose<sup>®</sup> FB 06 and Raftilose<sup>®</sup> P95 increases uptake of <sup>14</sup>C-BT by intestinal epithelial cells, it can be

speculated that these prebiotics may interfere with the intracellular levels of BT in the colon epithelium. Although Nutriose<sup>®</sup> FB 06 and Raftilose<sup>®</sup> P95 did not modify the effects of BT upon the studied parameters (cell viability, proliferation and differentiation), we cannot exclude that they can interfere with the effect of BT at other intracellular targets (e.g. apoptosis, inhibition of NF-KB activation), and thus contribute to colonic epithelium homeostasis.

**Key-words:** Butyrate, IEC-6 cells, MCT1, SMCT1, prebiotics, Nutriose<sup>®</sup> FB 06, Raftilose<sup>®</sup> P95.

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Sequência de <i>primers</i> e temperaturas de <i>annealing</i> (TAs) usadas para qRT-PCR.....	26
---	----

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Números estimados (milhares) de novos casos de cancro (incidência) e mortes (mortalidade) em homens e mulheres em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento no mundo em 2008.....	3
<b>Figura 2</b> - Incidência e mortalidade estimados de cancro na Europa, 2006.....	4
<b>Figura 3</b> - Percentagem de distribuição de casos de cancro colo-retal dentro do intestino grosso, Grã-Bretanha, 2006-2008; Cancer Research UK.....	4
<b>Figura 4</b> - Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a transição para CCR.....	5
<b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural da Nutriose® FB 06.....	8
<b>Figura 6</b> - Molécula de ácido butírico.....	11
<b>Figura 7</b> - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose® FB 06 ou de Raftilose® P95 durante 3 h na captação apical de <sup>14</sup> C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C por 3 min com <sup>14</sup> C-BT a 10 µM. <b>(A)</b> Captação de <sup>14</sup> C-BT na ausência (controlo) ou na presença de Nutriose® FB 06 1 mg/ml (n=13), 5 mg/ml (n=13), 10 mg/ml (n=13), 20 mg/ml (n=8), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). <b>(B)</b> Captação de <sup>14</sup> C-BT na ausência (controlo) ou na presença de Raftilose® P95 1 mg/ml (n=15), 5 mg/ml (n=15), 10 mg/ml (n=15), 20 mg/ml (n=15), 50 mg/ml (n=6), 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup> C-BT/mg proteínas/3 min (% do controlo) (médias aritméticas ± SEM). * <i>P</i> <0,05, significativamente diferente do controlo.....	32
<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose® FB 06 ou de Raftilose® P95 durante 1 h, 3 h ou 6 h na captação apical de <sup>14</sup> C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup> C-BT a 10 µM. <b>(A)</b> Captação de <sup>14</sup> C-BT na ausência (controlo) ou na presença de Nutriose® FB 06 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). <b>(B)</b> Captação de <sup>14</sup> C-BT na ausência (controlo) ou na presença de Raftilose® P95 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup> C-BT/mg proteínas/3 min (% do controlo) (médias	

aritméticas  $\pm$  SEM). \**P* <0,05, significativamente diferente do controle.....33

**Figura 9** - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose® FB 06 ou de Raftilose® P95 durante 48 h na captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM. **(A)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Nutriose® FB 06 10 mg/ml (n=8), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). **(B)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Raftilose® P95 10 mg/ml (n=8), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas  $\pm$  SEM). \**P* <0,05, significativamente diferente do controle.....34

**Figura 10** - Características da captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM, na ausência (controle; -) ou presença (+) de tratamento de 48 h com Nutriose® FB 06 50 mg/ml. **(A)** Dependência iônica. O NaCl do GFK foi isotonicamente substituído por GFK-LiCl (n=9). **(B)** Efeito de inibidores. As células foram pré-incubadas (20 min) e incubadas (3 min) com GFK-LiCl na ausência (controle) ou presença de NPPB 0,5 mM (n= 9) ou pCMB 0,5 mM (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas  $\pm$  SEM). \**P* < 0,05, significativamente diferente do controle.....36

**Figura 11** - Características da captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM na ausência (controle; -) ou presença (+) de um tratamento de 48 h com Raftilose® P95 20 mg/ml. **(A)** Dependência iônica. O NaCl do GFK foi isotonicamente substituído por GFK-LiCl (n=9). **(B)** Efeito de inibidores. As células foram pré-incubadas (20 min) e incubadas (3 min) com GFK-LiCl (controle) na ausência (controle) ou presença de NPPB 0.5 mM (n=9) ou pCMB 0,5 mM (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas  $\pm$  SEM). \**P* < 0,05, significativamente diferente do controle.....37

**Figura 12** - Níveis de expressão do ARNm do MCT1 e SMCT1 em células IEC-6 tratadas cronicamente durante 48 h com: **(A)** Nutriose® FB 06 50 mg/ml; e **(B)** Raftilose® P95 20 mg/ml. Os níveis de ARNm do MCT1 e do SMCT1 foram quantificados por qRT-PCR, como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como média aritmética correspondente à expressão de MCT1 ou SMCT1 relativamente ao GAPDH (n=6).....38

**Figura 13** - Efeito agudo (3 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Nutriose® FB 06 1 mg/ml (n=9), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=6)

ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 1 mg/ml (n=12), 5 mg/ml (n=11), 10 mg/ml (n=12), 20 mg/ml (n=12), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.....39

**Figura 14** - Efeito agudo (6 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.....40

**Figura 15** - Efeito crônico (48 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.....41

**Figura 16** – Efeito agudo (3 h) dos prebióticos na proliferação celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. **(A)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 1 mg/ml (n=8), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9) ou 20 mg/ml (n=9); **(B)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 1 mg/ml (n=8), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9) ou 20 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como absorvância (% do controle) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.....42

**Figura 17** - Efeito crônico (48 h) dos prebióticos na proliferação celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. **(A)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 10 mg/ml (n=6), 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 10 mg/ml (n=6), 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Resultados são apresentados como absorvância (% do controle) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.....43

**Figura 18** - Efeito da exposição crónica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose® FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose® FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) (n=21) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose® P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose® P95 20 mg/ml (BT + Raftilose) (n=24), na viabilidade celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética ± SEM). \*Significativamente diferente do controlo, #Significativamente diferente do BT.....45

**Figura 19** - Efeito da exposição crónica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose® FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose® FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose® P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose® P95 20 mg/ml (BT + Raftilose), na proliferação celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como absorvância (% do controlo; n=12) (média aritmética ± SEM). \*Significativamente diferente do controlo.....46

**Figura 20** - Efeito da exposição crónica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose® FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose® FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose® P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose® P95 20 mg/ml (BT + Raftilose), na diferenciação celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP), como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como nmol *p*-nitrofenol<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>mg proteína (% do controlo; n=17) (média aritmética ± SEM). \*Significativamente diferente do controlo.....47

## Abreviaturas

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**AGCC** – ácido gordo de cadeia curta

**ALP** – fosfatase alcalina

**ARN** – ácido ribonucleico

**ARNm** – ARN mensageiro

**BT** – butirato

**BSA** - albumina de soro bovino

**CCR** – cancro colo-retal

**DNase** – desoxirribonuclease

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**GAPDH** – desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato

**GP** – grau de polimerização

**GPR41** – recetor 41 acoplado a proteínas G

**GPR109A** – recetor 109A acoplado a proteína G

**HDAC** – desacetilase das histonas

**HDACi** - inibidor da desacetilase das histonas

**HEPES** - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanessulfónico

**IEC-6** - linha celular do epitélio de intestino delgado normal de rato

**LDH** - desidrogénese do lactato

**MCT1** - transportador de monocarboxilatos electroneutro acoplado ao H<sup>+</sup> do tipo1

**NADH** - dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

**NPPB** - ácido 5-nitro-2-(3-fenil-propil-amino) benzoico

**OFS** - oligofrutose

**pCMB** - ácido 4-(hidroximercuri) benzóico

**pNPP** - *p*-nitrofenilfosfato

**pNP** – *p*-nitrofenol

**qRT-PCR** – reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa

*(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)*

**TCA** – ácido tricoloracético

**SMCT1** - transportador de monocarboxilatos electrogénico acoplado ao Na<sup>+</sup> do tipo 1

**SRB** - sulforodamina B



# Capítulo I

---

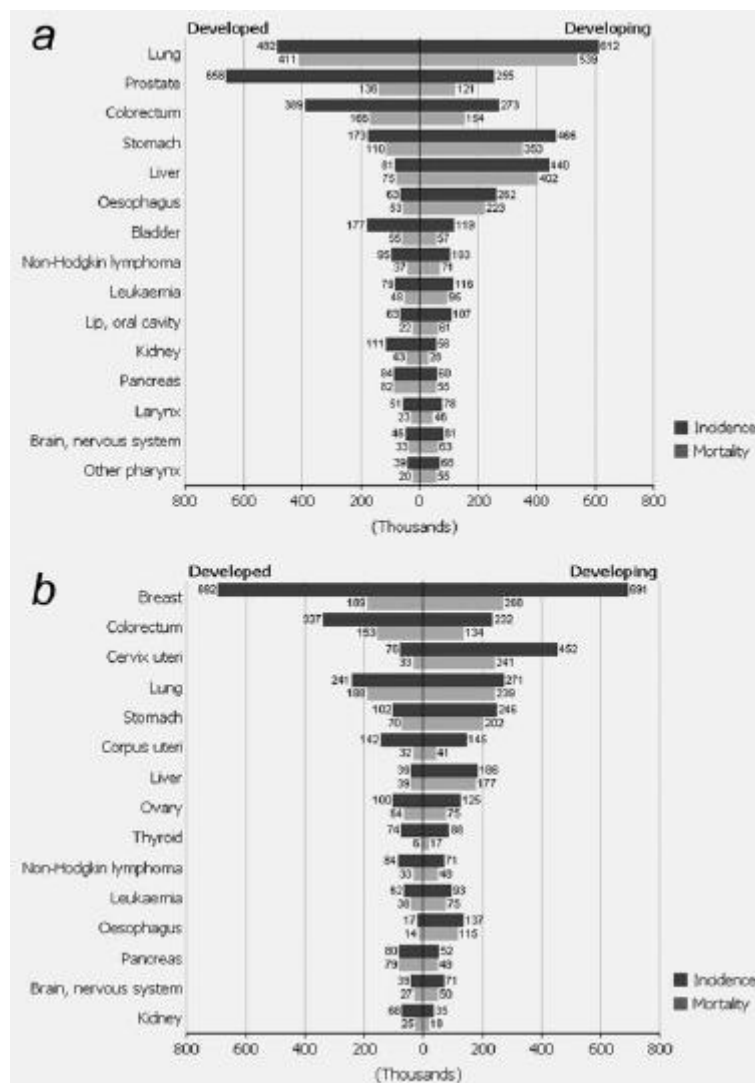
## Introdução



## 1. Cancro colo-retal

Estima-se que em 2008 ocorreram 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro em todo o mundo. O cancro colo-retal, CCR, é o terceiro tipo mais comum de cancro (antecedido pelo cancro do pulmão e mama), com 1,2 milhões de novos casos diagnosticados, representando cerca de 9,7% de todos os casos de cancro. É o terceiro cancro mais comum em homens (663.000 casos, 10,0% do total) e o segundo em mulheres (570.000 casos, 9,4% do total) em todo o mundo (1).

Os cancros do cólon e reto são raros em países em desenvolvimento, sendo que ocorrem em altas taxas de incidência em países desenvolvidos da Europa, América do Norte, Austrália e Japão (2). Em 2006, na Europa, o CCR foi o terceiro mais comum tipo de cancro tanto em homens como em mulheres, e a segunda principal causa de morte relacionada com cancro (Figura 2) (3).



**Figura 1 - (a)** Números estimados (milhares) de novos casos de cancro (incidência) e mortes (mortalidade) em homens em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento no mundo em 2008. **(b)** Números estimados (milhares) de novos casos de cancro (incidência) e mortes (mortalidade) em mulheres em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento no mundo em 2008 (1).

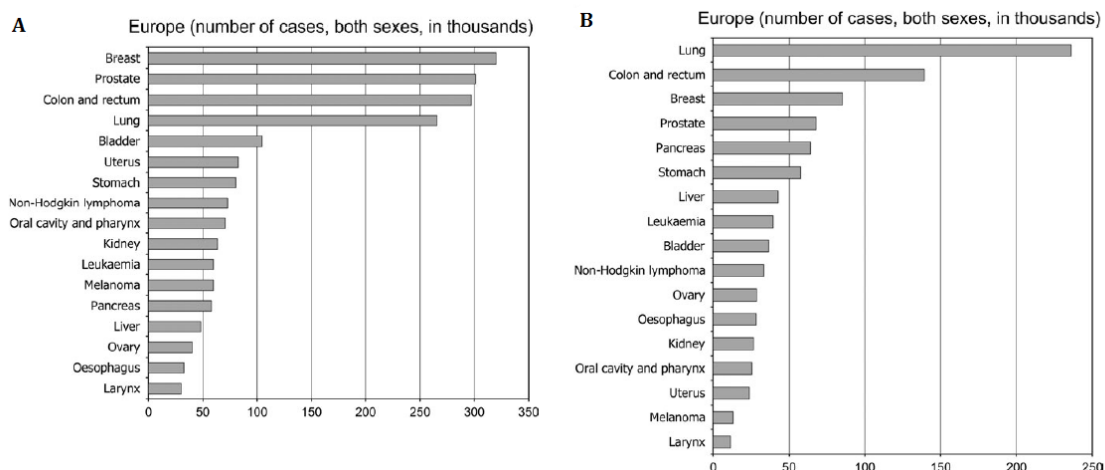


Figura 2 – Incidência (A) e mortalidade (B) estimados de cancro na Europa, 2006 (3).

### 1.1 Carcinogénese colo-retal

O CCR inclui tumores malignos da mucosa do cólon, reto e apêndice; no entanto, a maioria dos tumores aparece no lado esquerdo do cólon e do reto, Figura 3.

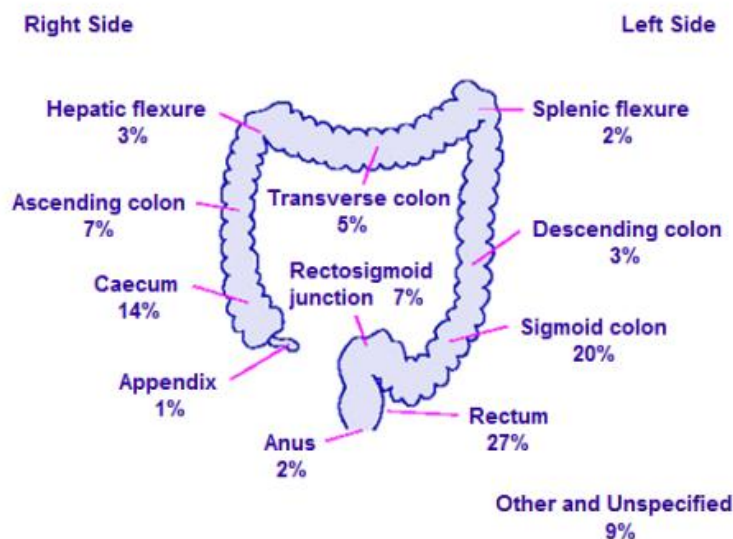


Figura 3 - Percentagem de distribuição de casos de cancro colo-retal dentro do intestino grosso, Grã-Bretanha, 2006-2008; Cancer Research UK.

O desenvolvimento de CCR envolve várias alterações genéticas e moleculares na proliferação celular, sobrevivência celular, diferenciação, resistência à apoptose, metástase e angiogénese tumoral. Estas alterações que surgem no epitélio normal vão-

se acumulando ao longo do tempo constituindo a sequência adenoma-carcinoma (Figura 4). O passo inicial na tumorigênese é a da formação de focos de criptas colônicas aberrantes, ACF (*aberrante crypt foci*), associada com a perda ou mutação do gene supressor tumoral *adenomatous polyposis coli* (APC). Os carcinomas precoces acumulam adicionalmente mutações em oncogenes ou em genes supressores tumorais, tais como K-ras, p53. As vias de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e EGFR/PI3K/Akt também desempenham um papel central no desenvolvimento de CCR (4).

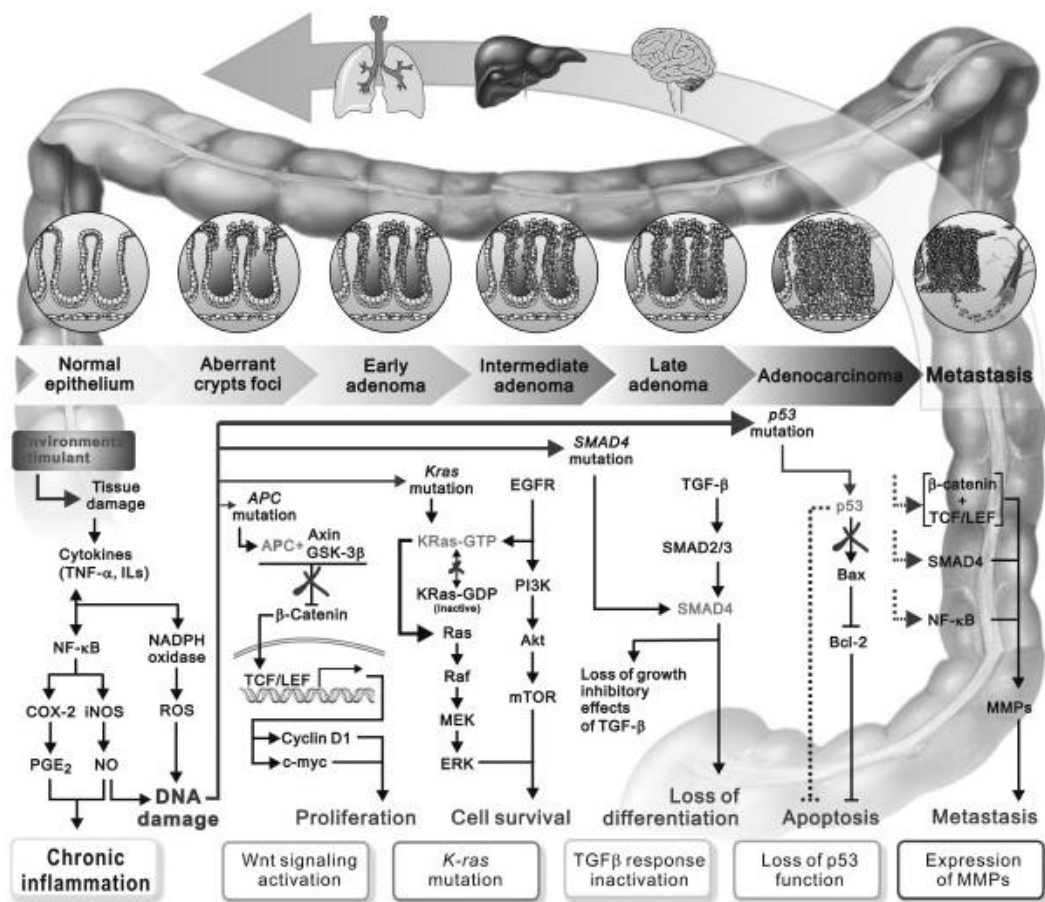


Figura 4 - Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a transição para CCR (4).

## 1.2 Fatores de risco do cancro colo-retal

O CCR representa uma doença complexa, cujo desenvolvimento é determinado pela interação complexa entre fatores genéticos, ambientais específicos e fatores de estilo de vida com diferentes graus de envolvimento (5). Os fatores de risco de CCR incluem a idade, história familiar, doenças inflamatórias intestinais (incluindo colite ulcerosa e doença de Crohn) e pró-carcinogêneos ambientais e alimentares (6). Estudos de evidência ecológica, estudos de migrantes e estudos de tendência secular sugerem que os fatores de risco ambientais são da maior importância para o desenvolvimento do CCR. Os fatores dietéticos têm sido presumidos como importantes, mas só a ingestão de carne vermelha confeccionada e álcool são considerados como fatores alimentares de risco bem convincentes para CCR (7). Por outro lado, estudos sugerem que o consumo de frutos e vegetais está correlacionado com a diminuição do risco de CCR (8) e uma alta ingestão de fibra alimentar, particularmente a partir de cereais e grãos integrais, está associado a um risco reduzido de desenvolver CCR (9).

## 1.3 Rastreio, tratamento e quimioprevenção

O diagnóstico precoce, quer pela imediata investigação de sintomas suspeitos quer pelo rastreio da população e de grupos de risco, permitiu diminuir a mortalidade associada ao CCR. Assim, o CCR pode ser tratado após deteção numa fase inicial e até prevenido através da remoção de possíveis precursores, tais como adenomas (10).

O exame de primeira linha para o diagnóstico ou estudo de uma suspeita de CCR é a colonoscopia (11), uma vez que é o que permite uma maior triagem, e é o mais rentável, tem uma elevada precisão e é possível remover a maioria dos precursores de CCR durante o exame (10, 12). O tratamento para o CCR é largamente dependente da fase da doença. Os tratamentos padrão para CCR incluem cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia antineoplásica, assim como novos fármacos antiangiogénicos (13).

Apesar da compreensão do processo e mecanismo na carcinogénese do cólon, as terapias atuais, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia molecular alvo ainda são limitados para tumores avançados. Assim, uma quantidade crescente de atenção científica tem sido focada na investigação do potencial de substâncias da dieta para a prevenção e controlo do CCR através de estratégias quimiopreventivas (14). A quimioprevenção do cancro caracteriza-se pelo uso de substâncias naturais, sintéticas ou

biológicas (a partir de uma fonte viva) para inverter, suprimir ou prevenir o desenvolvimento de cancro (15).

Têm vindo a ser demonstradas propriedades promotoras da saúde para muitos compostos naturais da dieta isolados de frutas e vegetais, incluindo as fibras, ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), folato, metionina, selénio, vitamina D, cálcio e fitoquímicos (16, 17).

## **2. Fibra alimentar e prebióticos**

Uma alta ingestão de fibra alimentar, particularmente de cereais e de grãos integral, está associada a um menor risco de desenvolvimento de CCR (9, 18). A fibra dietética pode ser considerada como consistindo de carboidratos complexos que não são hidrolisados pelas enzimas no intestino delgado humano e atingem o cólon onde são fermentados pela microflora, produzindo AGCC, incluindo butirato (BT), acetato e propionato (19, 20).

Prebiótico é definido como "um ingrediente seletivamente fermentado que permite alterações específicas, tanto na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal, que confere benefícios para o bem-estar e saúde do hospedeiro" (21, 22). Prebióticos são geralmente classificados nutricionalmente como fibras alimentares (21). A fim de que um ingrediente alimentar seja classificado como um prebiótico, deve satisfazer os seguintes critérios: 1) resistência à acidez gástrica, ao aparelho digestivo humano (por ausência de enzimas necessárias para metabolizar esses compostos) e à absorção gastrointestinal; 2) fermentação pela microflora intestinal; e 3) estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais que contribuem para saúde e bem-estar (21, 22).

Os prebióticos inulina e oligofrutose têm mostrado estimular seletivamente o crescimento de bifidobactérias (23, 24) e proporcionar proteção contra a CCR (25). A Nutriose<sup>®</sup> FB 06, uma dextrina (26, 27), e a Raftilose<sup>®</sup> P95, uma oligofrutose (OFS) (19), por satisfazer os critérios acima citados, são classificados como prebióticos.

## 2.1 Nutriose® FB 06:

A Nutriose® FB 06 é um polissacarídeo de glicose produzido pela cromatografia de uma dextrina derivada do milho, trigo ou outros amidos comestíveis. O produto final, Nutriose® FB, é uma mistura de polímeros de glicose com uma gama bastante estreita de peso molecular (28). Tem um teor de até 85% de fibra e um elevado número de ligações  $\alpha$ -1,6 e ligações glicosídicas não digeríveis tais como  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 (27). Esta possui um grau de polimerização (GP) de 12 a 15. A Nutriose® FB 06 foi tornada comercialmente disponível em 2004. Ela tem-se mostrado muito resistente à digestão no intestino delgado (15% é digerida enzimaticamente, 75% é lenta e progressivamente fermentada no cólon, produzindo AGCGs, e 10% é excretada) (29, 30).

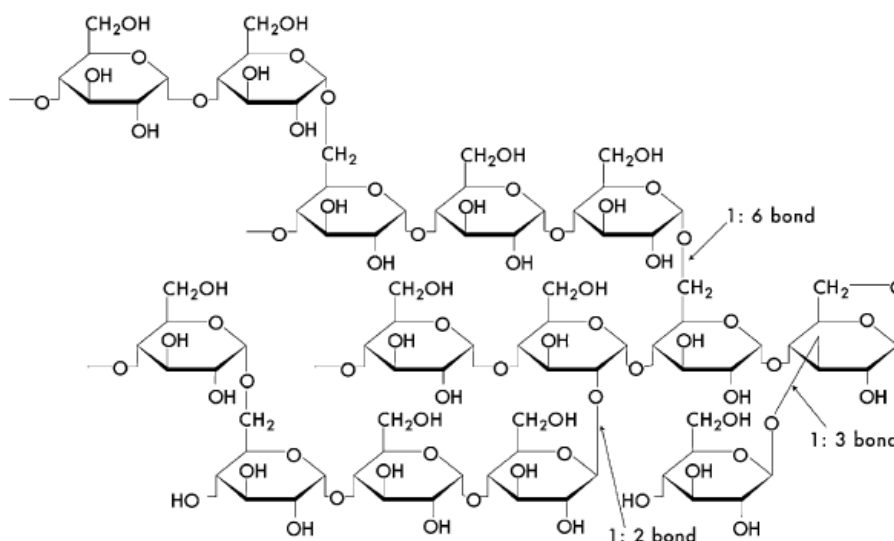


Figura 5 – Fórmula estrutural da Nutriose® FB 06 (27).

A Figura 5 mostra a fórmula estrutural e a ampla gama de ligações encontradas na Nutriose® FB 06 (27, 28).

A Nutriose® FB 06 demonstrou ter efeitos benéficos nos seres humanos, incluindo o aumento do número de lactobacilos, diminuição do pH fecal (6,6-6,1) e aumento da atividade de  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucosidase (enzima digestiva induzível) fecal após o consumo de 45 g/dia durante 35 dias. Estes resultados demonstraram o potencial prebiótico da Nutriose® (31).

## 2.2 Raftilose® P95

Do ponto de vista químico, a cadeia linear de inulina ou é um  $\alpha$ -D-glucopiranosil-[- $\beta$ -D-frutofuranosil] $_{n-1}$ - $\beta$ -D-frutofuranoside ( $G_{py}F_n$ ) ou um  $\beta$ -D-frutopiranosil-[- $\beta$ -D-frutofuranosil] $_{n-1}$ - $\beta$ -D-frutofuranoside (21). A inulina é um termo genérico que abrange todas as moléculas lineares  $\beta(1,2)$ . Em qualquer circunstância que justifique a identificação dos oligómeros vs polímeros, os termos oligofrutose e/ou inulina podem ser usados, respetivamente. Apesar da inulina hidrolisada e do composto sintético terem um  $GP_{médio}$  pouco diferente (4 e 3,6, respetivamente), o termo oligofrutose pode ser usado para identificar os dois. Com efeito, oligofrutose e frutooligossacáridos são considerados sinónimos para a mistura de oligómeros pequenos de inulina com GP máximo de menos de 10 (21).

A oligofrutose (OFS), uma mistura de frutooligossacáridos não digeríveis, é um ingrediente alimentar natural que pode ser preparado por hidrólise enzimática de inulina de chicória. Esta OFS disponível comercialmente é chamado de Raftilose. A Raftilose® P95 é composto por uma mistura de glucosil-(fructosil) $_n$ -fructose (64%) e (fructosil) $_n$ -fructose (36%) e tem um GP da gama de 2 a 8 (32, 33).

Ao contrário da Nutriose® FB 06, a Raftilose® P95 atinge o cólon praticamente intacto, onde é fermentado, levando à produção de SCFA (32, 33). A oligofrutose e a inulina aumentam a produção de BT no cólon por fermentação microbiana (19).

Commane *et al.* (2005) sugeriu que os produtos da fermentação da Raftilose podem ser eficazes na melhoria da função da barreira epitelial intestinal por impedir perturbações da função da mesma, induzidas por promotores de tumor (34). Estudos sugerem que a oligofrutose e a inulina da dieta inibem a formação de focos de criptas aberrantes (ACF), o que sugere que estes agentes podem suprimir a tumorigénese no cólon (35, 36). Estudos indicam que 10% de oligofrutose, possivelmente equivalente a uma dose de 40-60 g em termos humanos, reduz o desenvolvimento de ACF induzido quimicamente e o crescimento de tumores transplantados (37-39). Demonstrou-se também que a inulina e a oligofrutose reduzem a gravidade do CCR induzido pela 1,2-dimetil-hidrazina em ratos (40). Este efeito foi atribuído ao aumento da produção de butirato.

### 2.3 Mecanismos de proteção contra o cancro colo-retal

Tem sido sugerido que a dieta influencia a saúde do cólon por induzir mudanças no volume e conteúdo das fezes, na composição da microflora, no tempo total de trânsito intestinal e na pressão intraluminal (23). Os efeitos benéficos das fibras são muitas vezes atribuídos ao aumento da produção de BT; no entanto, estas podem também afetar outras características que influenciam a saúde intestinal, tais como o aumento da massa fecal, diminuição do tempo de trânsito no cólon, alterações na composição da microflora do intestino, diminuição do pH intraluminal e mudanças nos perfis de ácidos biliares (41).

O volume fecal bem como o tempo de trânsito reduzido têm sido associados a proteção contra CCR (23). Os mecanismos envolvidos têm sido postulados como sendo a diminuição da exposição do cólon a cancerígenos devido à diminuição do tempo de contacto com o cólon e da redução das concentrações de carcinogéneos (42).

A produção de AGCC é um dos mecanismos chave pelo qual os prebióticos podem transmitir efeitos benéficos, sendo o BT o principal mediador destes efeitos na mucosa do cólon (43). Tem sido sugerido que o BT tem funções ao nível da expressão de genes, prevenindo a transformação maligna por redução da proliferação celular e por indução da diferenciação e apoptose (44-46). Outro dos efeitos benéficos atribuídos ao BT é o fato de ter sido demonstrado que este induz enzimas metabolizadoras de xenobióticos (p.e. glutationa-S-transferase), que metabolizam compostos reativos para a excreção (47, 48). Para além disso, a produção de AGCC pode proteger contra o CCR através de acidificação do conteúdo do cólon (49, 50). A diminuição do pH no lúmen do cólon induzida pelos prebióticos pode melhorar a solubilidade e absorção de minerais, nomeadamente cálcio e magnésio (23), sendo que o cálcio é benéfico no CCR (51). Um ambiente do lúmen ácido também pode provocar um microambiente favorável a uma redução da atividade de enzimas pró-carcinogénicas, que convertem pró-carcinogéneos em carcinogéneos, tais como a 7 $\alpha$ -hidroxilase, a nitro-redutase e  $\beta$ -glucuronidase (52, 53).

### 3. Butirato

O butirato (BT) um produto da fermentação de fibra dietética pela flora intestinal, além de ser a principal fonte de energia para os colonócitos (54), também tem um papel protetor na prevenção e progressão da carcinogênese colo-retal, e influencia uma vasta gama de funções celulares que afetam a saúde do cólon (55). Assim, o BT desempenha um papel fundamental na homeostasia do epitélio do colon por ter múltiplos papéis reguladores a este nível, incluindo: 1) ser a principal fonte de energia para os colonócitos, 2) inibição da carcinogênese do cólon (por supressão do crescimento de células cancerígenas, indução da diferenciação e apoptose e inibição da proliferação celular), 3) promoção do crescimento e proliferação de células epiteliais normais de cólon, 4) estimulação da absorção de fluidos e eletrólito, 5) inibição da inflamação e stress oxidativo e 6) melhorar a função colónica de barreira de defesa (46, 56).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-carcinogénicos do BT não são conhecidos na totalidade, mas o BT influencia vários processos importantes na tumorigénese, incluindo a proliferação celular, apoptose, angiogénese, imuno-vigilância, stress oxidativo e inflamação (46). O efeito anti-carcinogénico do BT parece ser principalmente atribuído à sua capacidade para atuar como inibidor da desacetilase das histonas (HDACi), levando a hiperacetilação das histonas (57, 58), que conduz a uma estrutura de cromatina mais relaxada, aumentando a acessibilidade de fatores de transcrição para as regiões promotoras do ADN, permitindo então a transcrição de genes silenciados a nível epigenético (59, 60). Além disso, o BT também tem outros alvos intracelulares, incluindo hiperacetilação de proteínas não histonas, alteração da metilação do ADN, inibição seletiva da fosforilação de histonas e modulação da sinalização cinase intracelular (61).

Assim, o BT parece ter um papel protetor na prevenção e progressão do CCR. Nos tecidos normais, o efeito do BT sobre a apoptose e proliferação parece ser diferente do efeito do BT encontrado em tecidos tumorais, sendo este fenómeno referido como “paradoxo do BT” (46).

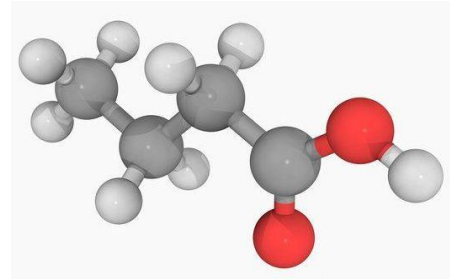


Figura 6 - Molécula de ácido butírico (Fonte: Science photo library).

### 3.1 Absorção intestinal de butirato

As concentrações molares totais e relativas dos principais AGCCs (acetato, propionato e butirato) produzidos no intestino humano dependem do local da fermentação, da dieta e da composição da microbiota intestinal (62). As concentrações absolutas de BT em fezes humanas podem variar entre 11-25 mM (63, 64).

Como os AGCCs são ácidos fracos ( $pK_a \approx 4.8$ ), mais de 90% encontra-se na forma aniônica, ionizado nas condições fisiológicas no cólon (65). Vários mecanismos de absorção de AGCCs através da membrana apical dos colonócitos têm sido propostos, incluindo difusão simples da forma não dissociada (através da membrana lipídica), transporte por troca com bicarbonato,  $AGCC/HCO_3^-$  (66, 67), e transporte da forma dissociada por transportadores de AGCCs (transportadores de monocarboxilatos) (46).

Assim, o BT é transportado para o interior das células epiteliais do cólon por dois sistemas de transporte específicos mediado por transportadores de monocarboxilatos, o transportador de monocarboxilatos electroneutro acoplado ao  $H^+$  do tipo 1 (MCT1, gene SLC16A1) (68) e o transportador de monocarboxilatos electrogénico acoplado ao  $Na^+$  do tipo 1 (SMCT1, gene SLC5A8) (69). O papel do BT no desenvolvimento do CCR é apoiado pela subexpressão dos transportadores do BT (MCT1 e SMCT1) no tecido de cancro de cólon humano (70, 71), a qual resulta numa baixa captação e metabolismo do BT nos colonócitos. Como mencionado, um dos efeitos benéficos do BT na saúde intestinal humana é a prevenção/inibição da carcinogénese do cólon e de acordo com esse fato, tanto o MCT1 (72) como o SMCT1 (69) foram recentemente propostos como genes supressores tumorais, muito provavelmente devido à sua capacidade de mediar a captação do BT para as células epiteliais do cólon.

Os mecanismos de transporte envolvidos no transporte basolateral de BT ainda não estão claros (46).

### 3.1.1 Transportador de monocarboxilatos do tipo 1, MCT1

Cuff *et al.* (2002) determinou que o gene SLC16A1 contém 5 exões e abrange cerca de 44 kb (73) e Garcia *et al.* (1994) mapearam o gene SLC16A1 no cromossoma 1p13.2-p12 (74).

Na família de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) foram identificados até à data 14 membros através da sequência de homologia, sendo codificados por genes da família SLC16 (75). Os MCTs possuem 12 hélices transmembranares, um terminal-N e um terminal-C voltado para o citosol e um grande *loop* citosólico entre as hélices 6 e 7 (76).

Para funcionar, o MCT transloca um próton e um monocarboxilato através da membrana plasmática por um mecanismo ordenado, na qual a ligação de H<sup>+</sup> é seguida pela ligação do monocarboxilato ao transportador protonado (77). A direção do fluxo de monocarboxilatos depende do gradiente químico de H<sup>+</sup> e monocarboxilatos através da membrana (78). Uma vez que o transportador funciona como um permutador, o transporte pode ocorrer bidirecionalmente (77). A distribuição de MCT1 nos tecidos é ubíqua e a sua localização subcelular pode ser na membrana basolateral e apical (75).

A função principal deste transportador tem sido associada com a absorção ou o efluxo de monocarboxilatos através da membrana plasmática, de acordo com necessidades metabólicas celulares (78). Cuff *et al.* (2002) descreveram que (i) a expressão de MCT1 no cólon humano é regulada pelo BT, (ii) que tal envolve mecanismos de transcrição e pós-transcrição e (iii) que é refletida funcionalmente como um aumento no transporte de BT (68).

O primeiro relato sobre a expressão da proteína MCT1 em amostras de tumores humanos descreveu uma diminuição da expressão de MCT1, na transição do cólon normal para maligno (70). A diminuição da expressão de MCT1 resulta numa redução na captação, metabolismo e dos efeitos do BT nos colonócitos. Assim, a captação de BT por células epiteliais intestinais é altamente dependente da expressão de MCT1; alterações nos níveis de expressão de MCT1 resultam em alterações na captação de BT (72).

### 3.1.2 Transportador de monocarboxilatos acoplado a sódio do tipo 1, SMCT1

Li *et al.* (2003) (71) determinaram que o gene SLC5A8 contém 15 exões e mapearam o gene SLC5A8 no cromossoma 12q22-q23 pela análise da sequência genómica. O SLC5A8 codifica uma proteína com 610 aminoácidos. A transcrição de SLC5A8 é regulada por hipermetilação das ilhas ricas em CpG ricas da região promotora (69).

O SLC5A8 codifica para um transportador de sódio pertencente à família de genes de transportadores de solutos SLC5. A especificidade de substratos de SLC5A8 é muito semelhante ao previamente conhecido transportador de monocarboxilatos (MCTs), exceto que o transporte via SLC5A8 é acoplado ao transporte de Na<sup>+</sup> enquanto o transporte via MCTs é acoplado ao transporte de H<sup>+</sup>. Baseado na sua função de transporte, o SLC5A8 foi nomeado como *Sodium-coupled MonoCarboxylate Transporter* (SMCT) (69). No cólon, este transportador medeia a entrada de AGCC acoplado a Na<sup>+</sup> a partir do lúmen para os colonócitos (69).

Li *et al.* (2003) identificou o SLC5A8 como um gene candidato a supressor tumoral, uma vez que é silenciado em aproximadamente 60% dos CCRs primários. O SLC5A8 encontra-se subexpresso numa variedade de cancros, incluindo no CCR (69). O silenciamento ocorre por uma intensa metilação nas ilhas CpG no exão 1 de SLC5A8. Quando re-expresso em linhas celulares de CCR nas quais se encontrava silenciado, diminuiu até 75% a formação de colónias de células tumorais na presença de BT. O silenciamento do SLC5A8 ocorre como um evento precoce e frequente na progressão da mucosa colónica para neoplasia, detetável em mais de 50% dos focos de criptas colónicas aberrantes (ACF) e adenomas (71).

Quanto à distribuição deste transportador no intestino, tanto em humanos como em rato os níveis de proteína SMCT1 foram maiores no cólon distal, seguido do cólon proximal e íleo (79).

# Capítulo II

---

## Objetivo



Dado o importante papel desempenhado pelo BT na manutenção da homeostasia do epitélio do cólon e os seus múltiplos papéis reguladores ao nível intestinal, decidimos avaliar, numa linha celular do epitélio de intestino delgado normal de rato (células IEC-6), o efeito da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95 sobre:

- (a) a absorção do BT
- (b) os efeitos do BT na proliferação, viabilidade e diferenciação celular

Assim, neste trabalho pretende-se alcançar um melhor conhecimento sobre os efeitos biológicos dos prebióticos ao nível intestinal.



## **Capítulo III**

---

### **Materiais e Métodos**



## 1. Cultura celular das células IEC-6

A linha celular IEC-6 foi obtida a partir de *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (ACC-111; Braunschweig, Germany)* e usada entre as passagens 17 e 28. As células foram mantidas numa atmosfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> – 95% de ar e cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*: meio RPMI 1640 (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,1 U/ml de insulina, 5,96 g de HEPES, 2,2 g de NaHCO<sub>3</sub>, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (todos da *Sigma, St. Louis, MO*). O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias e a cultura foi replicada a cada 7 dias. Para plaqueamento, as células foram removidas enzimaticamente (0,05% de tripsina-EDTA, 5 min, 37°C), *split* 1:3 e subcultivadas em placas de cultura de plástico (21 cm<sup>2</sup>; ø 60 mm; Corning Costar, Corning, NY, USA). Para a utilização em experiências, as células IEC-6 foram semeadas em placas de plástico de 24 poços (2 cm<sup>2</sup>; ø 16 mm, Corning Costar). As células foram usadas nas experiências 7-9 dias após a cultura inicial (90-100% de confluência).

## 2. Tratamentos agudos e crônicos das células

As concentrações dos prebióticos a testar foram escolhidas com base em pesquisa bibliográfica (80-84). Assim, começou-se por testar as seguintes concentrações de prebióticos: 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml. Para cada uma das concentrações de cada um dos prebióticos fez-se controlos de osmolaridade com manitol.

O efeito agudo dos prebióticos foi testado tratando as células durante 1, 3 e 6 h com os prebióticos a testar, antes dos estudos de transporte, viabilidade e proliferação celular. Os prebióticos foram diluídos no meio de cultura.

Na maior parte das experiências foram feitos tratamentos crônicos (48 h) das células em cultura com os diferentes prebióticos, antes dos estudos de transporte e dos estudos de viabilidade, proliferação e diferenciação celular. Estes tratamentos eram iniciados quando as células em cultura em placas de 24 poços atingiam 90-100% de confluência (5-7 dias de cultura). Os prebióticos foram diluídos no meio de cultura. O meio era renovado após as primeiras 24 h (meio sem soro), e no final das 48 h realizavam-se as experiências.

Em algumas experiências, as células IEC-6 foram tratadas cronicamente com BT (5 mM) antes dos estudos de proliferação, viabilidade e diferenciação celular. Esta

concentração de BT encontra-se dentro da gama fisiológica de concentrações deste composto no cólon humano, pois a concentração de AGCC no cólon humano pode atingir 70-130 mM após a digestão de fibra dietética, com 20-30% destas concentrações correspondentes a BT e a concentração de BT encontrada em fezes humanas pode variar de 11-25 mM (55).

### 3. Determinação da captação de $^{14}\text{C}$ -butirato pelas células IEC-6

As experiências de captação apical de  $^{14}\text{C}$ -BT foram realizadas em meio tampão Krebs sem glicose (GFK) com a seguinte composição (em mM): 125 NaCl, 1,2  $\text{MgSO}_4$ , 1,2  $\text{CaCl}_2$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 1,6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 20 MES (pH 7,4) ou 20 HEPES (pH 6,5).

Em cada experiência, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 0,3 ml de meio GFK a 37°C. De seguida, as células foram incubadas com 0,3 ml de meio GFK a 37°C, pH 6,5 contendo  $^{14}\text{C}$ -BT 10  $\mu\text{M}$ . Gonçalves *et al.* (2011) demonstraram recentemente que a captação apical de  $^{14}\text{C}$ -BT em células IEC-6 é linear até aos 3 min (85). Assim, a incubação de  $^{14}\text{C}$ -BT foi realizada durante 3 min. No final, o meio de incubação foi removido e as células foram lavadas com 0,3 ml de meio GFK gelado (4°C). As células foram depois solubilizadas com 0,3 ml de Triton X-100 0,1% (em Tris HCL 5 mM, pH 7,4) e deixadas a 4°C durante a noite. A radioatividade captada pelas células foi depois medida por cintilometria líquida.

Nas experiências de caracterização dos transportadores envolvidos na captação apical de  $^{14}\text{C}$ -BT pelas células IEC-6, as células foram pré-incubadas durante 20 min na presença de GFK (presença de NaCl) ou GFK onde o NaCl foi isotonicamente substituído por LiCl (GFK-LiCl) juntamente com os prebióticos.

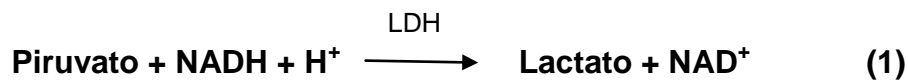
Quando testados, os prebióticos estavam presentes durante a incubação com  $^{14}\text{C}$ -BT.

### 4. Doseamento de proteínas

As proteínas existentes nas células em monocamada foram doseadas segundo o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA).

## 5. Determinação da viabilidade celular – atividade da desidrogenase do lactato (LDH)

O efeito das fibras na viabilidade celular das células IEC-6 foi avaliado através da medição da atividade da desidrogenase da lactato (LDH) como descrito por Bernt e Bergmeyer (1974) (86). A libertação da enzima intracelular LDH para o meio extracelular foi utilizada para calcular a viabilidade celular, sendo que é um marcador enzimático estável que se correlaciona linearmente com a morte celular. A atividade desta enzima foi determinada espectrofotometricamente pela taxa de oxidação do NADH, segundo a equação (1):



Brevemente, foram retirados os meios extracelulares das células IEC-6 cultivadas em placas de cultura de 24 poços sujeitas aos tratamentos para tubos de *ependorf*. Desses meios retirava-se 50 µl para tubos de *ependorf* que continham 1,5 ml de solução fosfato/piruvato (48 mM/0,6 mM, respetivamente) e por último adicionava-se 25 µl de solução de NADH (0,18 mM). Os valores de absorvância foram medidos durante 2 min a 340 nm, e foi calculada a sua taxa de redução durante a redução de piruvato a lactato.

O processo acima descrito foi repetido com o meio intracelular para determinar a atividade da LDH total. Para isso, as células provenientes dos controlos foram solubilizadas com 0,5 ml de 0,1% (v/v) Triton X -100 (em 5 mM tris.HCl, pH 7,4), e incubadas durante 30 min a 37°C. A atividade da LDH foi adicionada à atividade da LDH libertada a partir dos controlos, sendo que esta atividade total foi considerada representar 100% de morte celular. A atividade da LDH presente no meio extracelular em cada amostra foi calculada como percentagem da atividade total.

## 6. Determinação da proliferação celular – ensaio da sulforodamina B (SRB)

Após o período de tratamento, foi adicionado ao meio de cultura de cada poço (500 µl) 62,5 µl de ácido tricloroacético (TCA) 50% (w/v) gelado para fixar as células (1h, a 4°C no escuro). As placas foram então lavadas cinco vezes com água da torneira para remover TCA. De seguida as placas foram secas ao ar e coradas durante 15 minutos com 0,4% (w/v) SRB dissolvido em 1% (v/v) de ácido acético. O SRB foi removido e as culturas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% (v/v) para remover o corante residual. Posteriormente as placas foram novamente secas ao ar e o corante ligado foi então solubilizado com 375 µl de solução Tris.NaOH a 10 mM (pH 10,5). A absorvância de cada poço foi determinada a 540 nm; as amostras foram diluídas de modo a obter valores de absorvância inferiores a 0,7.

## 7. Determinação da diferenciação celular - atividade da fosfatase alcalina (ALP)

As células IEC-6, quando cultivadas até à confluência, diferenciam-se, ocorrendo polarização celular, desenvolvimento de microvilosidades apicais e o aparecimento de junções apertadas entre as células (87). Estas alterações na ultra-estrutura são acompanhadas de um aumento da atividade de enzimas como a fosfatase alcalina (ALP) na bordadura em escova (87). A atividade da ALP é um marcador de diferenciação de células epiteliais, porque a atividade da ALP é maior em células intestinais mais diferenciadas do que em células menos diferenciadas (88).

Assim, a diferenciação celular foi avaliada por quantificação da atividade da fosfatase alcalina como previamente descrito (89). Em síntese, a atividade da ALP total foi determinada do seguinte modo: as células previamente tratadas foram lavadas com 500 µl de PBS, sendo depois raspadas da placa e lavadas com 1,5 ml de PBS. Procedia-se de seguida à centrifugação e ressuspensão em 250 µl de solução de homogenização e eram lisadas.

O doseamento da atividade da ALP foi realizado à temperatura de 37°C, usando o *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) como substrato e com posterior quantificação do *p*-nitrofenol (*p*NP) libertado, que apresenta coloração amarela a pH alcalino (89). A incubação era realizada a pH 10,4 durante 1 h. A quantidade de *p*NP libertado foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm. A atividade da ALP foi expressa em nmol *p*NP/min/mg proteína, sendo que a atividade da ALP era convertida em % do controlo.

## 8. Extração de ARN e qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa de ARNm)

Para avaliar a natureza do efeito crônico das fibras na expressão dos transportadores MCT1 e SMCT1, foi necessário efetuar extração de ARN, síntese de ADN e qRT-PCR.

Imediatamente antes da extração, aspirou-se o meio de cultura, lavou-se as células com PBS (solução amortecedora de fosfatos) e ressuspendeu-se as mesmas em Tripure®. O ARN total das células tratadas cronicamente foi extraído pelo reagente de isolamento Tripure®, de acordo com as instruções do fabricante (*Roche Diagnostics*, Alemanha).

Antes da síntese de ADNc, o ARN total foi tratado com DNase I (Invitrogen Corporation, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de ADNc, incubou-se 10 µg de ARN com 200 U de transcriptase reversa (usando a Superscript Reverse Transcriptase II), 50 ng/µl de hexâmeros randomizados, 10 mM de dNTP, 0,1 M de DTT, 40 U de inibidor de RNase (RNaseOUT™) num volume final de 20 µl de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma). O ADNc resultante foi incubado com RNase H (Invitrogen®) durante 20 min a 37°C para degradação do ARN. Foram usados 2 µl dos 20 µl da mistura de reação da transcrição reversa para o qRT-PCR. Para a curva de calibração, foi usado ADNc de células IEC-6 não tratadas, diluído em 5 concentrações diferentes. Os *primers* usados estão apresentados na Tabela 1. O PCR em tempo real foi executado usando o LightCycler (Roche, Nutley, NJ, EUA). As reações (20 µl) foram feitas em tubos microcapilares usando 0,5 µM de cada primer e 4 µl de SYBR Green *master mix* (LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I, Roche). As condições do PCR foram as seguintes: desnaturação (95°C durante 5 min), amplificação e quantificação (95°C durante 10 s, temperatura de *annealing* (TA) durante 10 s e 72°C durante 10 s, com uma determinação de fluorescência simples no final do segmento de 72°C durante 10 s) repetindo 40 vezes, o programa de curva de melting ((TA + 10)°C durante 15 s a 95°C com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s, com determinação de fluorescência contínua) e passo de arrefecimento para 40°C. As TAs são 62°C para o GAPDH, 69°C para o MCT1 e 62°C para o SMCT1 (Tabela 1). Os dados foram analisados usando o *software* de análise do LightCycler.

Tabela 1 – Sequência de *primers* e temperaturas de *annealing* (TAs) usadas para qRT-PCR.

Nome do Gene	Sequência do primer (5´-3´)	TA (°C)
rGAPDH	F: GGC ATC GTG GAA GGG CTC ATG AC	62
	R: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC	
rMCT1	F: CAG TGC AAC GAC CAG TGA ATG TG	69
	R: ATC AAG CCA CAG CCA GAC AGG	
rSMCT1	F: CGG GAT CAC CAG CAC CTA C	62
	R: GCA GGG GCA TAA ATC ACA ATC	

rGAPDH – desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato de rato; rMCT1 – transportador de monocarboxilatos do tipo 1 de rato; rSMCT1 - Transportador de monocarboxilatos acoplado a sódio do tipo 1 de rato; F – *forward*; R - *reverse*

## 9. Cálculos e tratamento estatístico

Os valores são expressos como médias aritméticas com erro padrão da média (SEM), e a média geométrica é dada com intervalos de confiança 95%.

A análise estatística da diferença entre vários grupos foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste *Student–Newman–Keuls* (SRB, ALP, LDH).

A análise estatística da diferença entre dois grupos foi avaliada com o teste t de *Student* (estudos de transporte).

As diferenças são consideradas significativas sempre que  $P < 0,05$ .

## 10. Materiais

### Foram usados os seguintes materiais:

$^{14}\text{C}$ -BT ([1- $^{14}\text{C}$ ]-n-ácido butírico, sal de sódio; atividade específica 30-60 mCi/mmol; Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Alemanha); Nutriose<sup>®</sup> FB 06 (Roquette Frères, Lestrem, France); Raftilose<sup>®</sup> P95 (Raffinerie Tirlemontoise, Tienen, Belgium); manitol; Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany); soro bovino fetal (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA); etanol, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanesulfônico), MES (ácido N-2-hidromorfolino-etanesulfônico), pCMB (ácido 4-(hidroximercuri) benzoico), NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenil-propil-amino) benzoico), solução de antibiótico/antimicótico (100 unidades  $\text{ml}^{-1}$  penicilina, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  estreptomicina e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  anfotericina B), solução de tripsina-EDTA, NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reduzida), *p*-nitrofenilfosfato, butirato de sódio, piruvato de sódio, sulforodamina B, ácido tricloroacético (Sigma, St. Louis, MO, USA).



# **Capítulo IV**

---

## **Resultados**

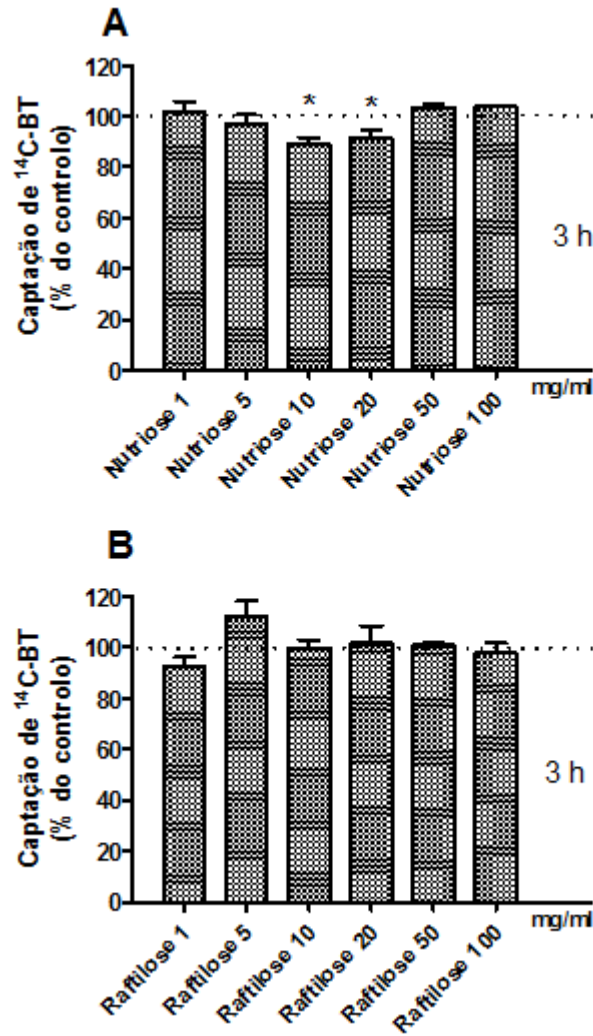


## 1. Efeito da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e da Raftilose<sup>®</sup> P95 sobre a captação apical de <sup>14</sup>C-BT em células IEC-6: dependência da concentração e do tempo

Como existe pouca informação, para iniciarmos este estudo tivemos de fazer uma prévia pesquisa para sabermos que concentrações de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e de Raftilose<sup>®</sup> P95 usar (80-84). As concentrações testadas de ambos os prebióticos foram 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml e começamos por estudar tratamentos agudos de 1, 3 e 6 h.

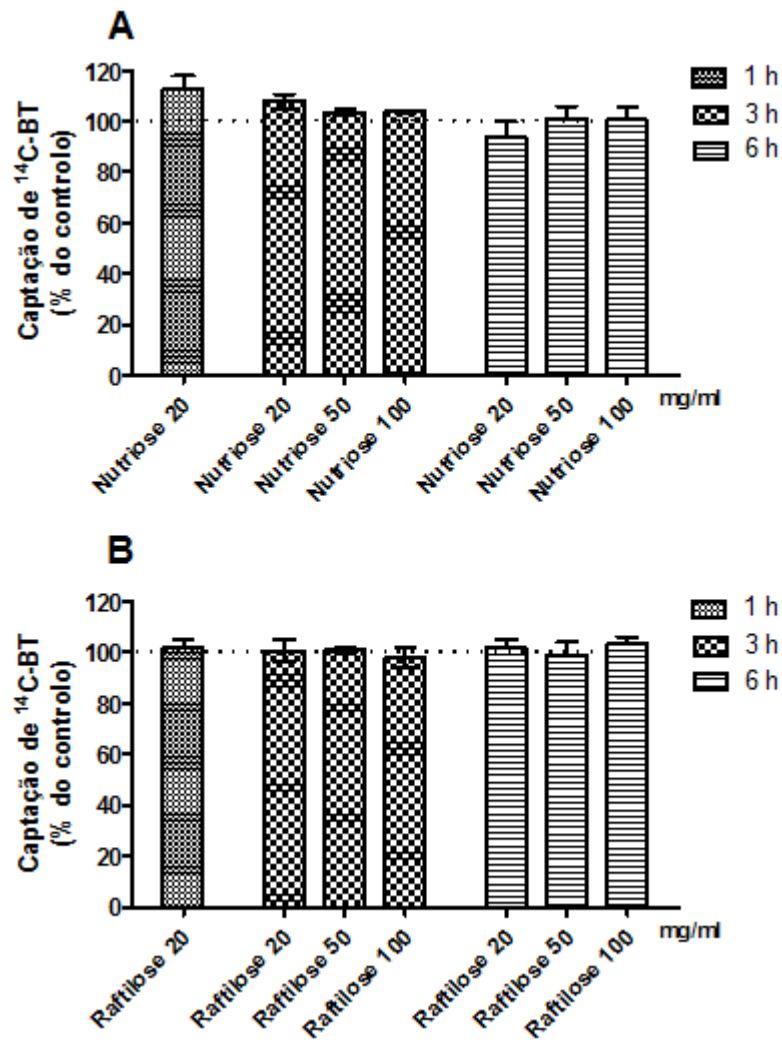
Inicialmente, testamos o efeito durante 3 h com diferentes concentrações dos prebióticos. Verificou-se uma diminuição da captação apical de <sup>14</sup>C-BT na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 nas concentrações de 10 e 20 mg/ml (Figura 7A). No caso da Raftilose<sup>®</sup> P95 não se verificou nenhum efeito na captação apical de <sup>14</sup>C-BT para as concentrações testadas (Figura 7B).

Posteriormente, estudou-se o efeito das concentrações mais altas (20, 50 e 100 mg/ml) destes prebióticos sobre a captação apical de <sup>14</sup>C-BT, em diversos tempos de exposição (1, 3 e 6 h).

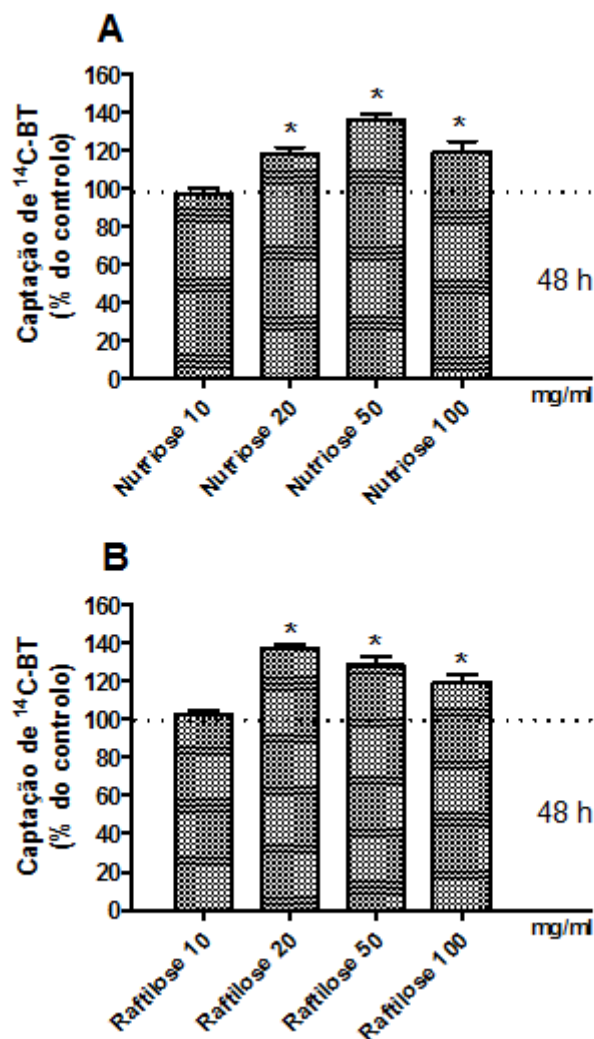


**Figura 7** - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 ou de Raftilose<sup>®</sup> P95 durante 3 h na captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C por 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM. **(A)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 1 mg/ml (n=13), 5 mg/ml (n=13), 10 mg/ml (n=13), 20 mg/ml (n=8), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). **(B)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 1 mg/ml (n=15), 5 mg/ml (n=15), 10 mg/ml (n=15), 20 mg/ml (n=15), 50 mg/ml (n=6), 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas ± SEM). \**P* <0,05, significativamente diferente do controle.

Como se pode verificar pela análise da Figura 8, não houve efeito nem da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 nem da Raftilose<sup>®</sup> P95 em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos de exposição.



**Figura 8** - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 ou de Raftilose<sup>®</sup> P95 durante 1 h, 3 h ou 6 h na captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10  $\mu$ M. **(A)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). **(B)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas  $\pm$  SEM). \**P* < 0,05, significativamente diferente do controle.



**Figura 9** - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 ou de Raftilose<sup>®</sup> P95 durante 48 h na captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM. **(A)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 10 mg/ml (n=8), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). **(B)** Captação de <sup>14</sup>C-BT na ausência (controle) ou na presença de Raftilose<sup>®</sup> P95 10 mg/ml (n=8), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas ± SEM). \**P* < 0,05, significativamente diferente do controle.

A Figura 9 mostra que após uma exposição crônica (48 h) das células IEC-6 a 20, 50 e 100 mg/ml de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 ou de Raftilose<sup>®</sup> P95 ocorreu um aumento da captação de <sup>14</sup>C-BT. Este efeito não é dependente da concentração. Como a captação máxima foi atingida com a concentração de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 de 50 mg/ml (≈ 135% em relação ao controle) e com a concentração de Raftilose<sup>®</sup> P95 de 20 mg/ml (≈ 137% em relação ao controle), foram estas as concentrações escolhidas para as experiências que se seguiram.

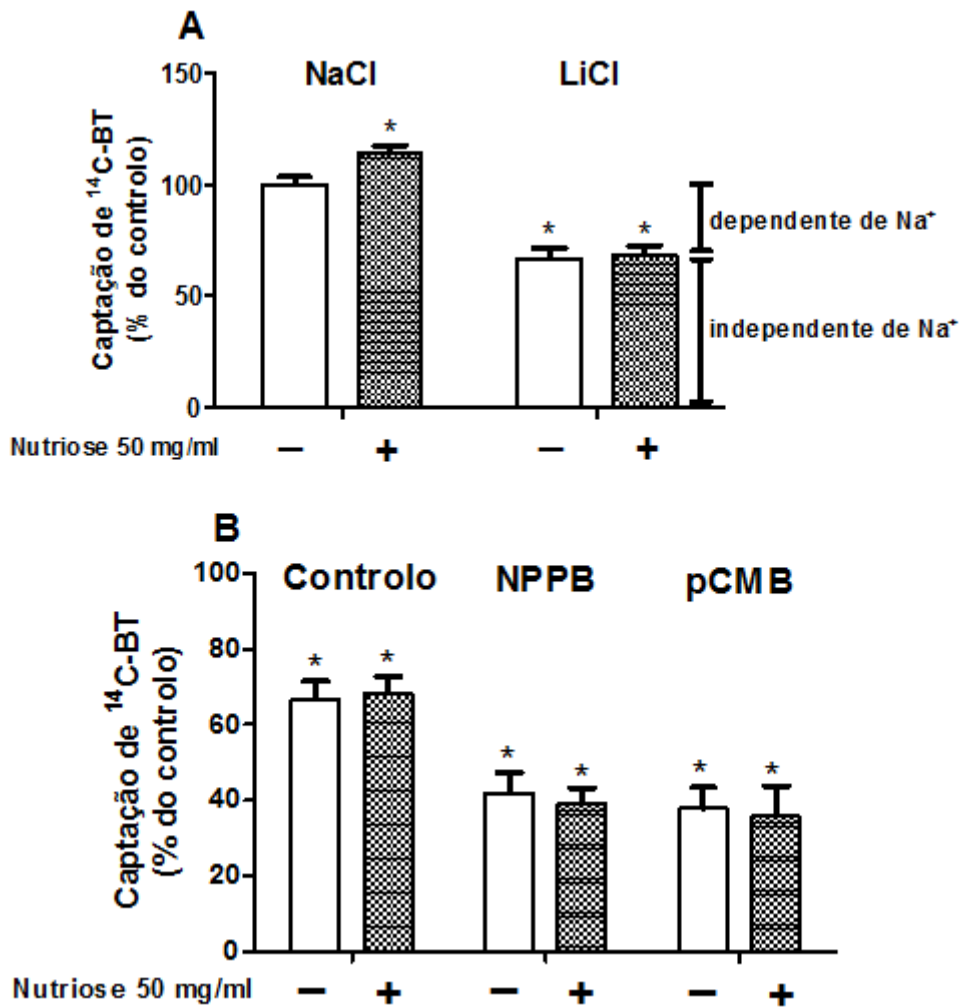
## 2. Efeito da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e da Raftilose<sup>®</sup> P95 sobre a captação apical de <sup>14</sup>C-BT mediada por SMCT1 e MCT1 em células IEC-6

Gonçalves *et al.* (2011) (85) caracterizaram a captação de BT em células IEC-6, tendo verificado que a captação de BT era parcialmente dependente do Na<sup>+</sup>, que as células IEC-6 tanto expressam ARNm do MCT1 como o do SMCT1, e concluíram que a captação de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6 é mediada pelo MCT1 e pelo SMCT1. No mesmo estudo também verificaram que a captação de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6 era inibida pelo pCMB e pelo NPPB, inibidores clássicos do MCT1.

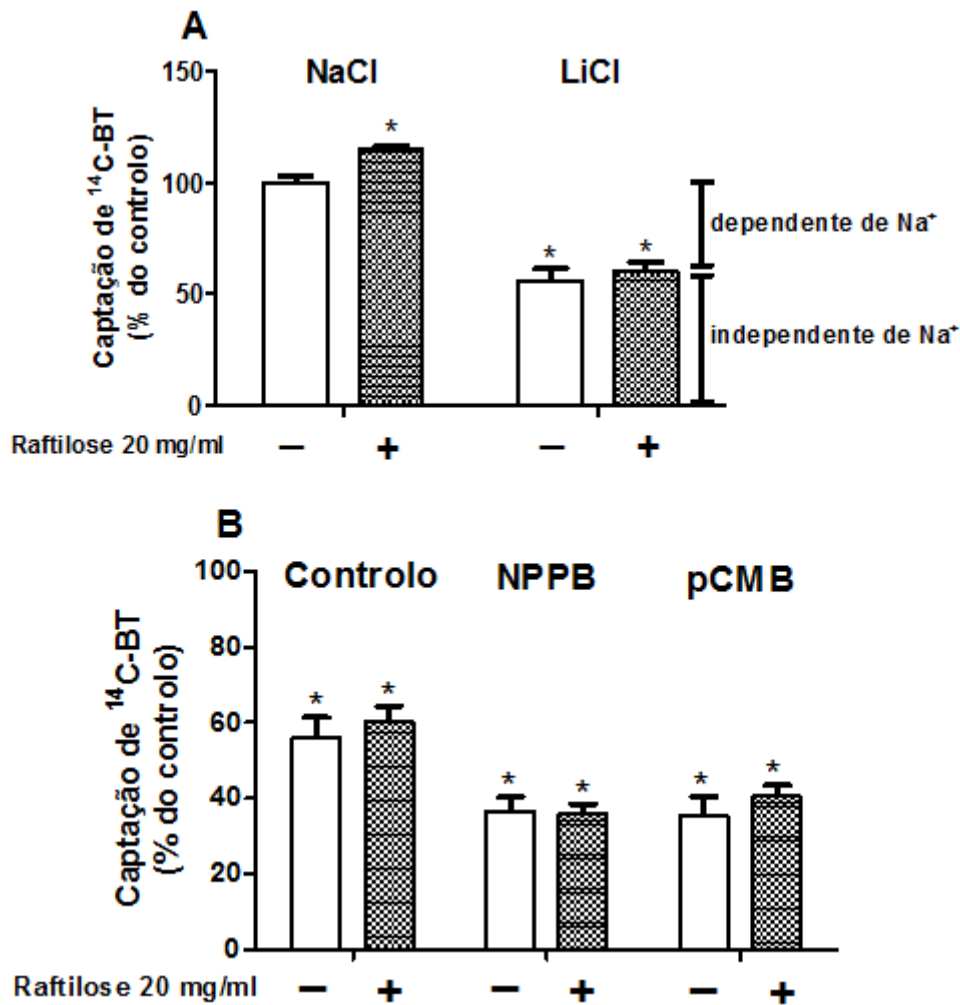
Para estudar o efeito do tratamento crónico (48 h) da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml e da Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml na captação apical de <sup>14</sup>C-BT dependente e independente do Na<sup>+</sup>, mediu-se a captação de <sup>14</sup>C-BT na presença e na ausência de NaCl (sendo este substituído por LiCl).

Como podemos ver na Figura 10A, a captação de <sup>14</sup>C-BT é parcialmente dependente do Na<sup>+</sup> (35%) e parcialmente independente de Na<sup>+</sup> (65%). A Nutriose<sup>®</sup> FB 06 aumenta a captação de <sup>14</sup>C-BT na presença de Na<sup>+</sup> extracelular, mas não tem efeito na captação independente do Na<sup>+</sup>.

Além disso, também foi testado o efeito de dois inibidores do MCT1, o NPPB e o pCMB. Tanto o NPPB como o pCMB causam uma diminuição na captação de <sup>14</sup>C-BT (≈ 25-30% e ≈ 30-33%, respetivamente) relativamente ao controlo, e esta diminuição não é modificada na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 (Figura 10B).



**Figura 10** - Características da captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 μM, na ausência (controle; -) ou presença (+) de tratamento de 48 h com Nutriose® FB 06 50 mg/ml. **(A)** Dependência iónica. O NaCl do GFK foi isotonicamente substituído por GFK-LiCl (n=9). **(B)** Efeito de inibidores. As células foram pré-incubadas (20 min) e incubadas (3 min) com GFK-LiCl na ausência (controle) ou presença de NPPB 0,5 mM (n= 9) ou pCMB 0,5 mM (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas ± SEM). \**P* < 0,05, significativamente diferente do controle.



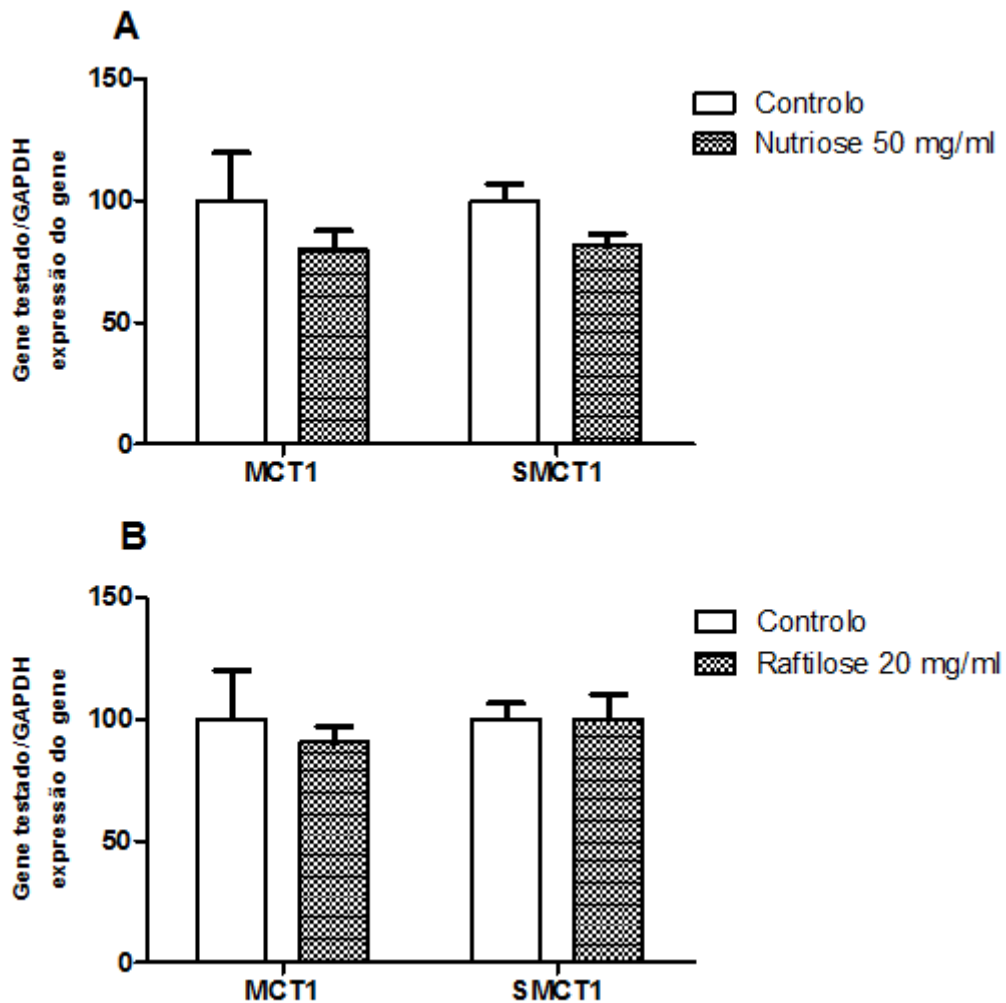
**Figura 11** – Características da captação apical de <sup>14</sup>C-BT pelas células IEC-6. A captação foi determinada em células incubadas a 37°C durante 3 min com <sup>14</sup>C-BT a 10 µM na ausência (controle; -) ou presença (+) de um tratamento de 48 h com Raftilose® P95 20 mg/ml. **(A)** Dependência iônica. O NaCl do GFK foi isotonicamente substituído por GFK-LiCl (n=9). **(B)** Efeito de inibidores. As células foram pré-incubadas (20 min) e incubadas (3 min) com GFK-LiCl (controle) na ausência (controle) ou presença de NPPB 0.5 mM (n=9) ou pCMB 0,5 mM (n=9). Os resultados são apresentados como nmol de <sup>14</sup>C-BT/mg proteínas/3 min (% do controle) (médias aritméticas ± SEM). \*P < 0,05, significativamente diferente do controle.

Como podemos ver na Figura 11A, a captação de <sup>14</sup>C-BT na presença de Na<sup>+</sup> extracelular aumenta na presença de Raftilose® P95 relativamente ao controlo. A substituição do Na<sup>+</sup> por Li<sup>+</sup> causa uma diminuição da captação de <sup>14</sup>C-BT (≈ 40% em relação ao controlo), semelhante na presença como na ausência de Raftilose® P95.

Relativamente ao efeito dos dois inibidores do MCT1, tanto o NPPB como o pCMB causam uma diminuição na captação de <sup>14</sup>C-BT (≈ 20-25% e ≈ 20% respetivamente) relativamente ao controlo (LiCl), e esta diminuição é semelhante para cada um dos inibidores tanto na presença como na ausência de Raftilose® P95 (Figura 11B).

### 3. PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa de ARNm (qRT-PCR) de MCT1 e SMCT1 em células IEC-6

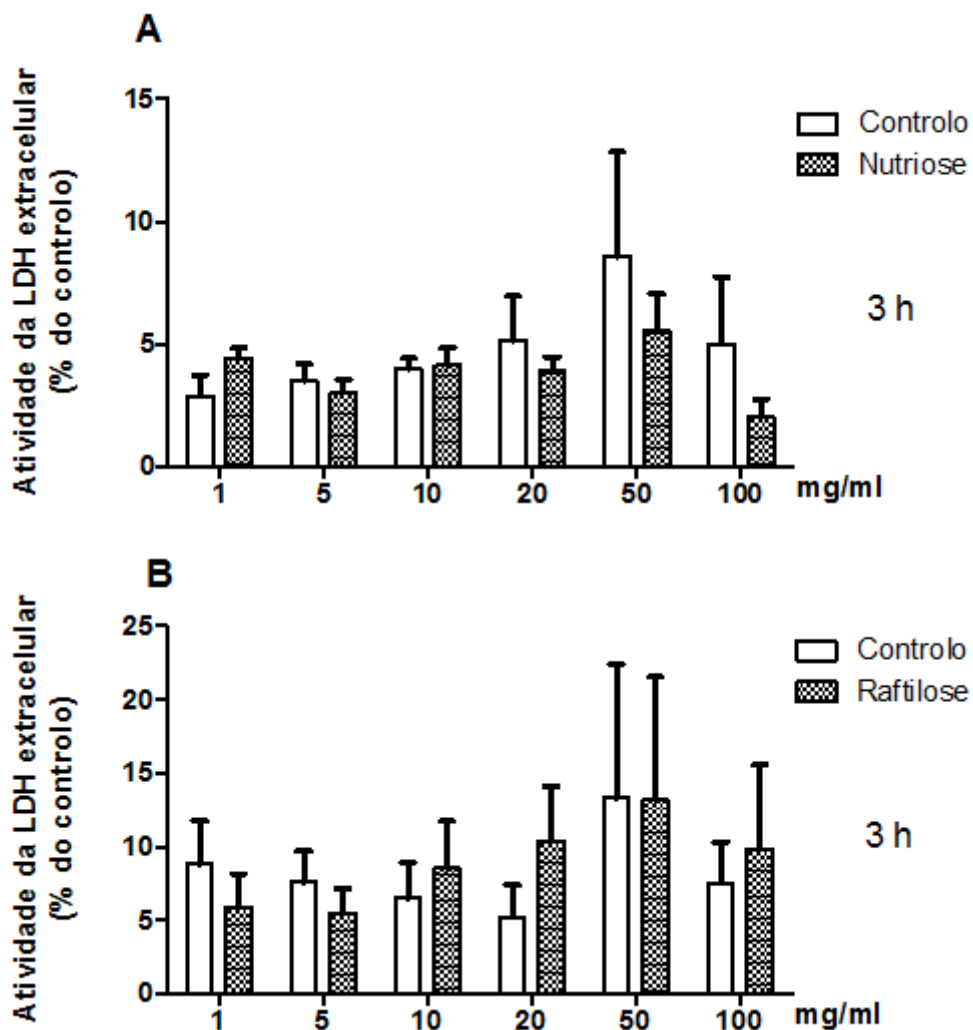
Nesta serie de experiências avaliou-se a expressão de ARNm do MCT1 e do SMCT1 nas células IEC-6. Verificou-se que quer a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 quer a Raftilose<sup>®</sup> P95 (48 h) não têm efeito ao nível da transcrição (Figura 12).



**Figura 12** - Níveis de expressão do ARNm do MCT1 e SMCT1 em células IEC-6 tratadas cronicamente durante 48 h com: **(A)** Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml; e **(B)** Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml. Os níveis de ARNm do MCT1 e do SMCT1 foram quantificados por qRT-PCR, como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como média aritmética correspondente à expressão de MCT1 ou SMCT1 relativamente ao GAPDH (n=6).

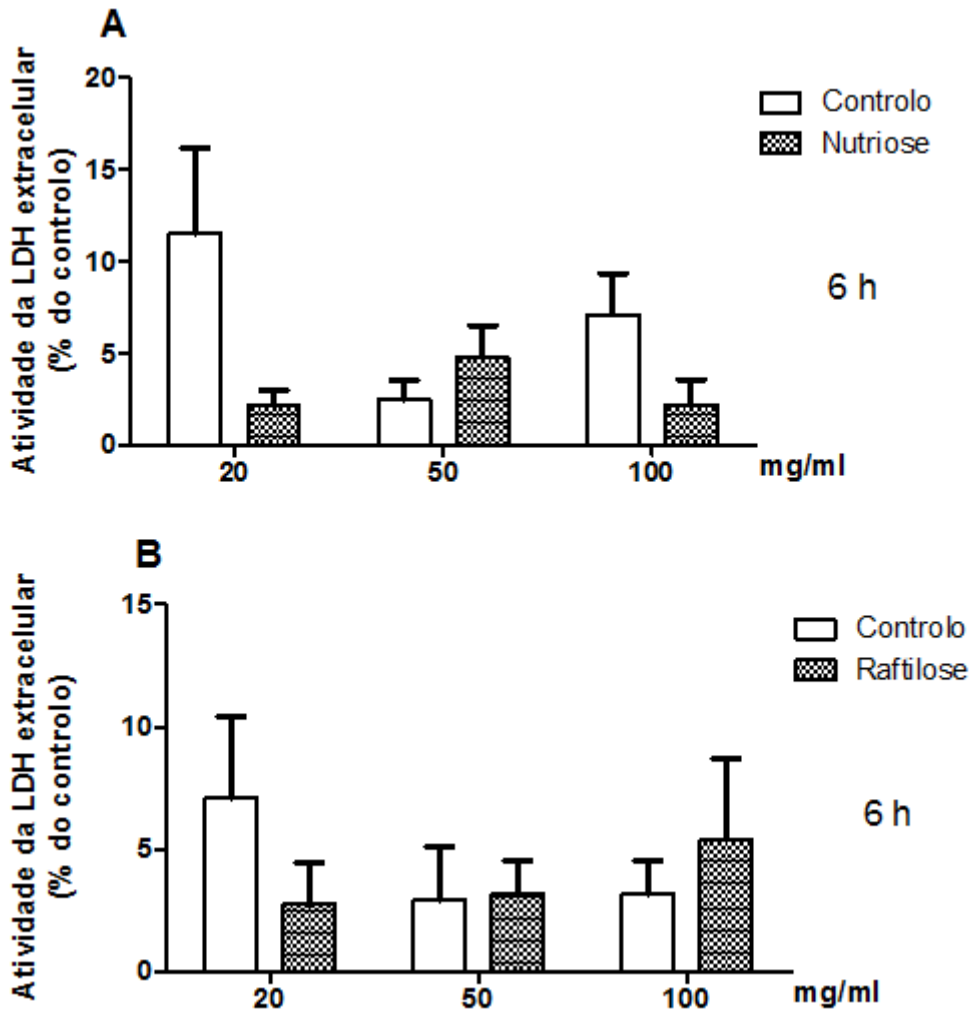
#### 4. Efeito da Nutriose® FB 06 e da Raftilose® P95 na viabilidade e proliferação celular em células IEC-6

Nesta série de experiências, foi analisado o efeito dos prebióticos Nutriose® FB 06 e Raftilose® P95 na viabilidade e proliferação celular. Para isso testamos o efeito de várias concentrações de cada um dos prebióticos, em tratamentos agudos de 3 e 6 h, sobre a viabilidade celular (Figura 13 e Figura 14), em tratamentos agudos de 3 h sobre proliferação celular (Figura 16), e em tratamentos crônicos de 48 h tanto sobre viabilidade como sobre a proliferação celular (Figura 15 e Figura 17, respetivamente).

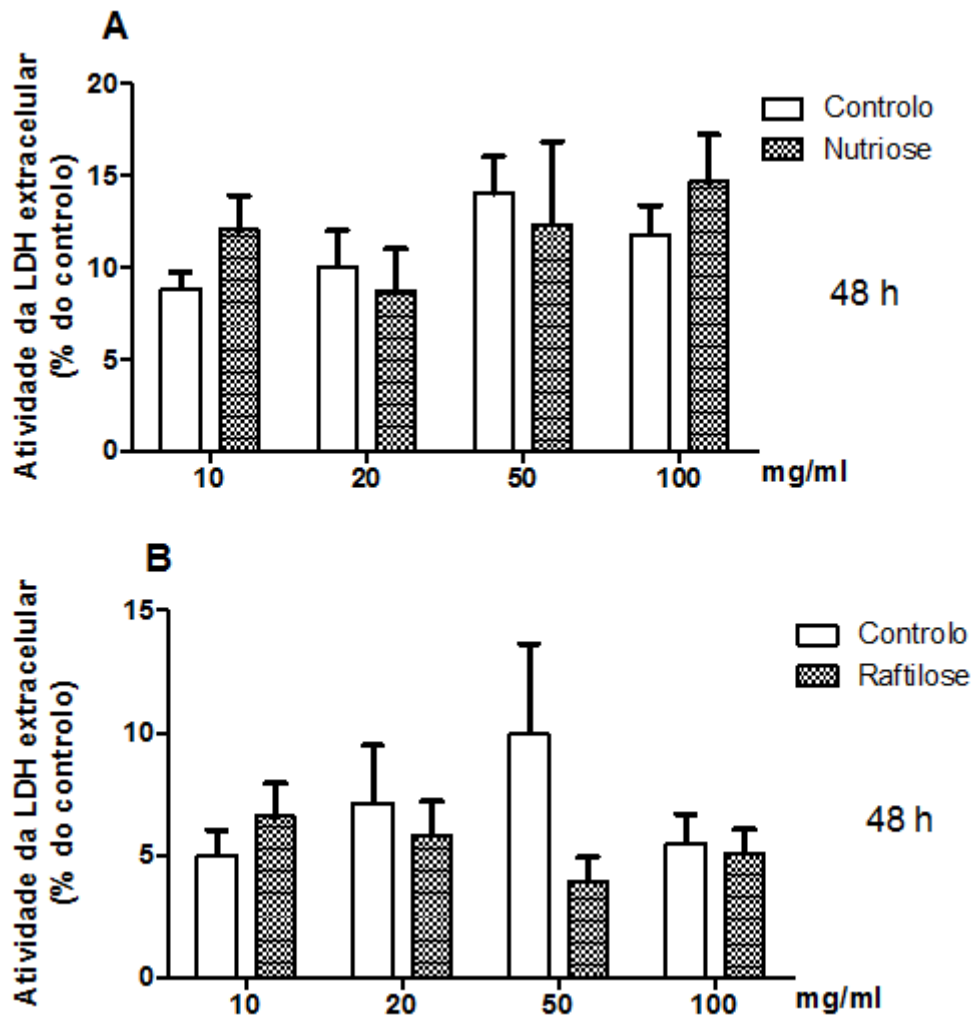


**Figura 13** - Efeito agudo (3 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Nutriose® FB 06 1 mg/ml (n=9), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Raftilose® P95 1 mg/ml (n=12), 5 mg/ml (n=11), 10 mg/ml (n=12), 20 mg/ml (n=12), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controlo.

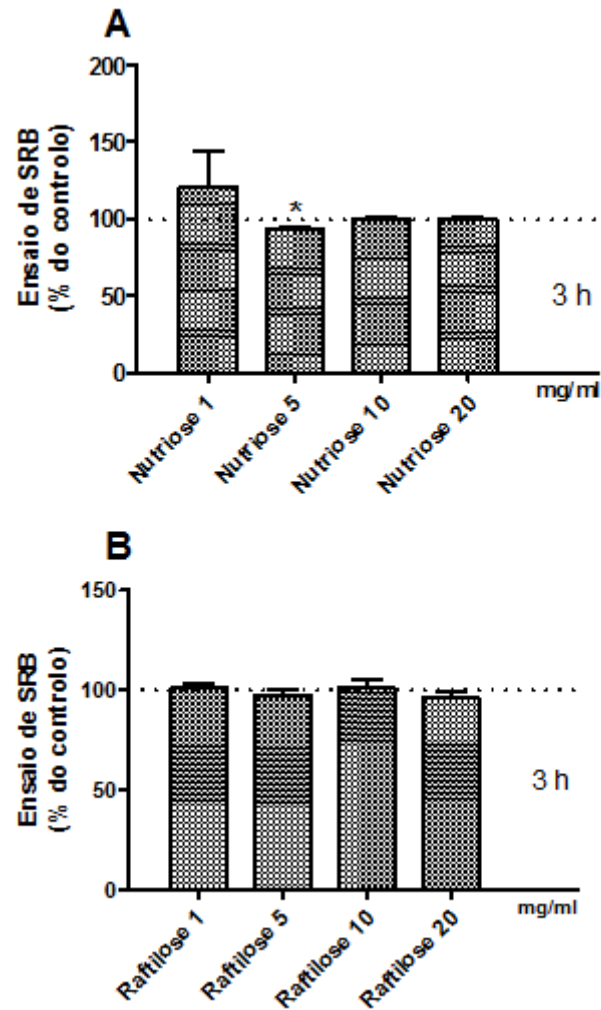
Exceto na proliferação celular, e para a Nutriose® FB 06 5 mg/ml (Figura 16), não houve efeito significativo destes compostos nem na viabilidade nem na viabilidade nem na proliferação celular.



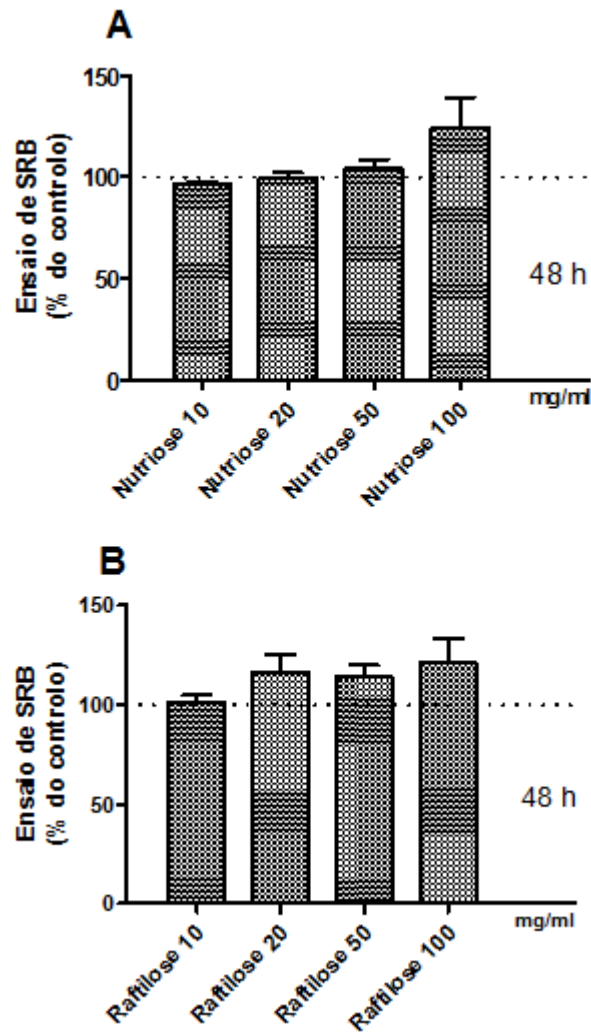
**Figura 14** - Efeito agudo (6 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Nutriose® FB 06 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Raftilose® P95 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controlo.



**Figura 15** - Efeito crónico (48 h) dos prebióticos na viabilidade celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. **(A)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Nutriose® FB 06 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9); **(B)** Atividade da LDH na ausência (controlo) ou na presença de Raftilose® P95 10 mg/ml (n=9), 20 mg/ml (n=9), 50 mg/ml (n=9) ou 100 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controlo.



**Figura 16** – Efeito agudo (3 h) dos prebióticos na proliferação celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. **(A)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Nutriose® FB 06 1 mg/ml (n=8), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9) ou 20 mg/ml (n=9); **(B)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Raftilose® P95 1 mg/ml (n=8), 5 mg/ml (n=9), 10 mg/ml (n=9) ou 20 mg/ml (n=9). Os resultados são apresentados como absorvância (% do controle) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle.



**Figura 17** - Efeito crônico (48 h) dos prebióticos na proliferação celular das células IEC-6, determinado pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. **(A)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Nutriose® FB 06 10 mg/ml (n=6), 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6); **(B)** Quantificação do SRB na ausência (controle) ou na presença de Raftilose® P95 10 mg/ml (n=6), 20 mg/ml (n=6), 50 mg/ml (n=6) ou 100 mg/ml (n=6). Resultados são apresentados como absorvância (% do controle) (média aritmética  $\pm$  SEM).

\*Significativamente diferente do controle.

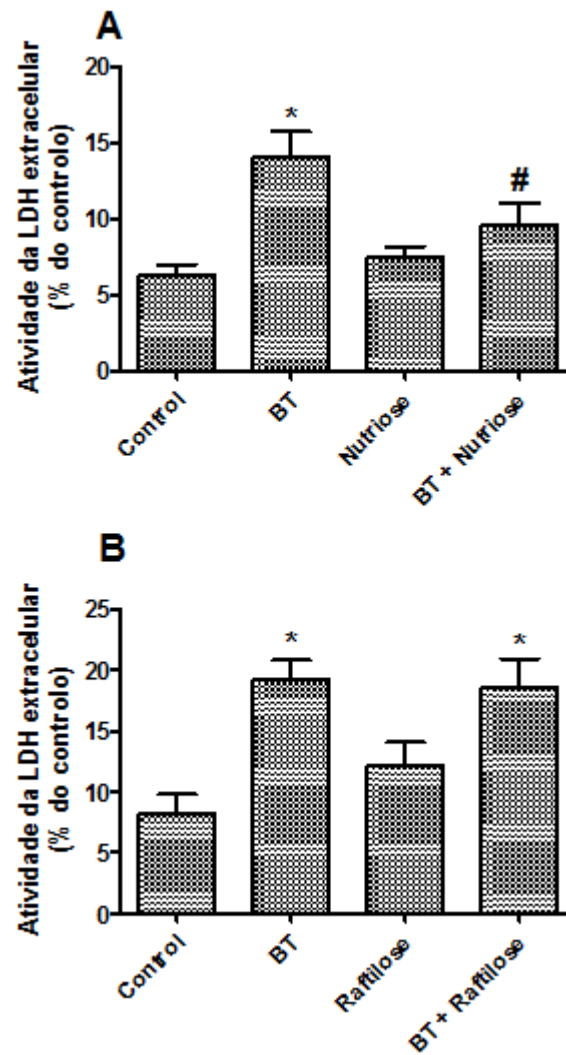
## 5. Efeito da interação entre o BT e Nutriose® FB 06 ou Raftilose® P95 na viabilidade celular, proliferação e diferenciação em células IEC-6

Os resultados anteriores mostraram que a Nutriose® FB 06 na concentração de 50 mg/ml e a Raftilose® P95 na concentração 20 mg/ml aumentaram a captação de <sup>14</sup>C-BT. Sabendo que o BT apresenta, ao nível do epitélio intestinal, e também nestas células, efeitos sobre a proliferação, viabilidade e diferenciação celular (55), pretendeu-se, nesta série de experiências, avaliar qual o efeito que o BT tem em conjunto com a Nutriose® FB 06 ou Raftilose® P95.

Como referido, experiências preliminares do nosso grupo em que se estudou o efeito de um tratamento de 48 h com concentrações crescentes de BT sobre a proliferação das células IEC-6, mostraram que o BT reduz a proliferação destas células de um modo dependente da concentração (55). Com base nesses resultados, foi selecionada a concentração de 5 mM. Como mencionado na secção de Métodos, esta concentração de BT está bem dentro da gama fisiológica de concentrações encontradas no lúmen do cólon humano (55). Foi ainda demonstrado, nesses estudo, que o BT (5 mM) reduz a viabilidade e aumenta o grau de diferenciação das células IEC-6 (55), embora Fukushima *et al.* (1998) (90) já tivesse demonstrado que o BT induzia a diferenciação celular em células IEC-6.

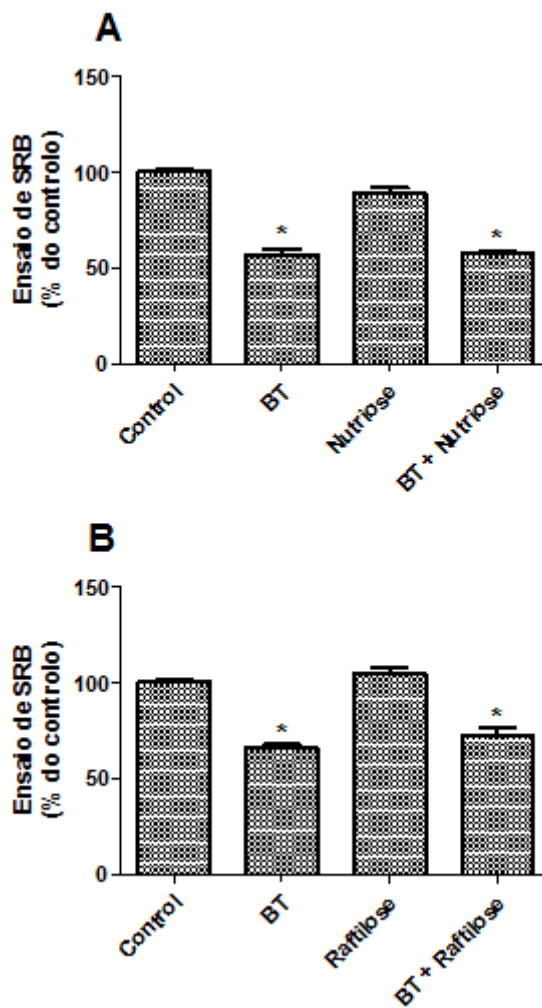
No presente estudo, o BT (5 mM) causou uma diminuição significativa da proliferação celular (Figura 19) e na viabilidade (Figura 18), e um aumento muito acentuado na diferenciação celular (Figura 20). Fomos então examinar o seu efeito quando combinado com a Nutriose® FB 06 50 mg/ml ou com a Raftilose® P95 (20 mg/ml) (48 h).

Relativamente à viabilidade celular, como mostra a Figura 18, o BT (5 mM) causou um aumento na morte celular. A Nutriose® FB 06 não teve um efeito significativo na viabilidade celular, mas quando combinada com o BT, reverteu um pouco o efeito do BT, baixando a percentagem de morte celular que este causava sozinho (Figura 18A). Relativamente à Raftilose® P95, nem teve efeito significativo na viabilidade celular, nem modificou o efeito que o BT apresentou neste parâmetro (Figura 18B).



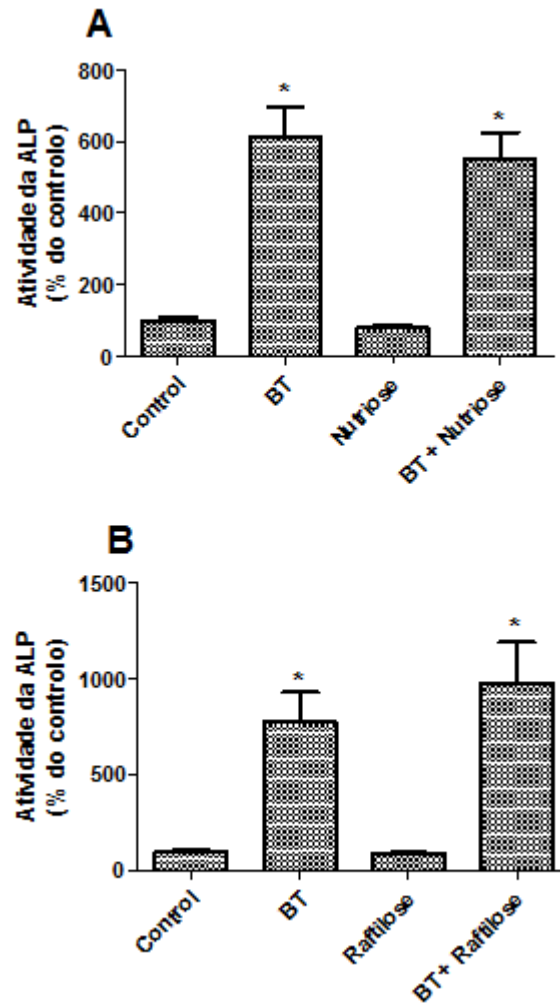
**Figura 18** - Efeito da exposição crônica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) (n=21) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (BT + Raftilose) (n=24), na viabilidade celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato extracelular (LDH), como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como atividade da LDH extracelular (% da atividade total) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controle, #Significativamente diferente do BT.

Na seguinte série de experiências, analisou-se o efeito do BT e dos prebióticos, isoladamente e em conjunto, sobre a proliferação celular das células IEC-6. O tratamento das células por 48 h com BT (5 mM) induziu uma diminuição significativa (40-45%) da proliferação celular (Figura 19). Por outro lado, nem a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 nem a Raftilose<sup>®</sup> P95 mostraram qualquer efeito na proliferação celular. Relativamente à combinação do BT com as fibras verificou-se que estas não mudam o efeito que o BT apresenta na proliferação celular (Figura 19).



**Figura 19** - Efeito da exposição crónica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (BT + Raftilose), na proliferação celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da proteína celular total com SRB, como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como absorvância (% do controlo; n=12) (média aritmética ± SEM). \*Significativamente diferente do controlo.

Por último, estudou-se o efeito do BT e dos prebióticos, isoladamente e em conjunto, sobre a diferenciação celular. O BT (5 mM) causou um aumento muito marcado na diferenciação celular (cerca de 6 vezes superior relativamente ao controlo) (Figura 20). Em contraste, nem a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 nem a Raftilose<sup>®</sup> P95 alteraram este parâmetro. A combinação dos prebióticos com o BT não mudou o efeito do BT na diferenciação celular (Figura 20).



**Figura 20** - Efeito da exposição crónica (48 h) **(A)** ao BT 5 mM (BT), à Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (Nutriose) e ao BT 5 mM + Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml (BT + Nutriose) e **(B)** ao BT 5 mM (BT), à Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (Raftilose) e ao BT 5 mM + Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml (BT + Raftilose), na diferenciação celular das células IEC-6, determinada pela quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP), como descrito nos Métodos. Os resultados são apresentados como  $\text{nmol } p\text{-nitrofenol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg proteína}$  (% do controlo; n=17) (média aritmética  $\pm$  SEM). \*Significativamente diferente do controlo.



# Capítulo V

---

## Discussão



A fibra alimentar é proveniente de uma ampla gama de alimentos vegetais, sendo que em termos simples, pode ser considerada como consistindo em carboidratos complexos que atingem o cólon (20). Estes carboidratos que não são degradados pelas enzimas no intestino delgado humano atingem o cólon onde são fermentados pela microflora, levando à produção de ácidos gordos de cadeia curta, AGCC, (acetato, propionato, BT) (20, 47). Os que estimulam a microflora de uma forma que é benéfico para o hospedeiro são denominados prebióticos (91).

A dieta está claramente ligada tanto ao risco como à incidência de CCR (20). A ingestão de fibra, particularmente de alimentos de grãos integrais, diminui o risco de desenvolvimento de CCR, sendo que vários mecanismos biológicos subjacentes a esta hipótese plausível têm sido propostos. Resumidamente, esses mecanismos incluem o fato da fibra aumentar o peso e o volume das fezes; diluir o conteúdo em substâncias cancerígenas no lúmen intestinal; reduzir o tempo de trânsito intestinal, o que reduz o contacto entre o conteúdo intestinal e a mucosa; e estimular a fermentação bacteriana das fibras, levando à produção de AGCC, o que reduz o pH do lúmen intestinal (44, 92).

A fonte alimentar é relevante, porque diferentes tipos de alimentos contêm diferentes tipos de fibra, sendo a sua fermentação distribuída ao longo do cólon (20). As fibras solúveis tendem a ser altamente fermentáveis no cólon proximal e portanto geram uma maior quantidade de AGCC no cólon (20, 93). A oligofrutose e a inulina são exemplos deste tipo de fibra, e estão associadas com uma maior produção de AGCC (19, 20, 93). Por outro lado, as fibras insolúveis, nomeadamente as celulosas e a lenhina, têm uma baixa fermentabilidade, mas estão associadas a um aumento da massa fecal e diminuição do tempo de trânsito no cólon, tendo um grande impacto na fermentação e produção de AGCC no cólon distal (93, 94).

Um importante AGCC produzido é o BT. A taxa e a quantidade de BT produzido ao longo do lúmen do cólon durante a suplementação com prebióticos dependem da estrutura química (por ex.: solubilidade e grau de polimerização) dos mesmos (46). O BT, além de ser uma fonte de energia para as células epiteliais, também influencia uma variedade de funções celulares que afetam a saúde do colón: por exemplo, tem um potencial anti-carcinogénico e anti-inflamatório, afeta a barreira intestinal e desempenha um papel na saciedade e stresse oxidativo (46).

Uma vez que o BT é um importante substrato metabólico, em condições normais, para as células epiteliais do cólon e muitos dos seus efeitos celulares são dependentes de sua concentração intracelular (por exemplo, a inibição da desacetilase das histonas) (58), o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no seu transporte membranar são particularmente importantes. No transporte do BT estão envolvidos um transportador de

alta afinidade e um de baixa afinidade para  $^{14}\text{C}$ -BT (95), correspondendo ao SMCT1 e MCT1, respectivamente (85). Fisiologicamente, o MCT1 é possivelmente mais ativo no cólon proximal (o  $K_m$  de MCT1 é cerca de 2,4-2,8 mM para o BT (96)), onde existe uma alta concentração de BT (na ordem do mM depois da digestão de fibras alimentares) e o pH é baixo (97). Porque o SMCT1 é mais expresso no colon distal (79), onde a fermentação de carboidratos e conseqüentemente a disponibilidade de AGCC, mais propriamente de BT, é menor (46) e pelo fato do SMCT1 ter um baixo  $K_m$  para o BT (50  $\mu\text{M}$ ) (98), o SMCT1 terá grande importância para baixas concentrações de BT (no cólon distal). No entanto, células epiteliais tumorais do cólon mostram uma redução na absorção de BT, associada a uma baixa expressão de MCT1 e SMCT1. De fato, estudos demonstraram que a expressão de MCT1 diminui na transição do cólon normal para maligno (70, 99) e que a expressão de SMCT1 é silenciada em carcinomas colo-retais e em linhas celulares de CCR, originando uma diminuição da captação e metabolismo de BT em colonócitos (71). O conhecimento dos mecanismos de transporte intestinal do BT e a sua regulação serão pois particularmente fundamentais para desvendar um pouco a patofisiologia do CCR.

Como, *in vivo*, tanto os prebióticos como o BT produzido por fermentação bacteriana estão comumente presentes juntos no cólon e podem assim influenciar a ação uns dos outros, direta ou indiretamente, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois prebióticos, Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95 (a) sobre a captação apical de  $^{14}\text{C}$ -BT e (b) sobre o efeito do BT na proliferação, viabilidade e diferenciação, no epitélio intestinal.

As experiências foram realizadas com a linha celular do epitélio de intestino delgado normal de rato, IEC-6, que foi estabelecida a partir das criptas das células do intestino delgado de rato por Quaroni *et al.* (1979) (100, 101). Quando as células IEC-6 são cultivadas em cultura pós-confluente, elas desenvolvem mudanças estruturais e diferenciam-se (101). As células IEC-6 têm sido utilizadas em numerosos estudos, incluindo estudos sobre absorção intestinal de nutrientes (102-107). Estas células expressam tanto ARNm do MCT1 e do SMCT1, e a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT pelas células IEC-6 parece ser mediada por estes dois transportadores (85).

Neste estudo, começamos por testar o efeito de várias concentrações dos prebióticos Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95, com diferentes tempos de exposição na captação de  $^{14}\text{C}$ -BT (10  $\mu\text{M}$ ) nas células IEC-6. Primeiro, estudamos o efeito de uma exposição aguda (1, 3 e 6 h) a concentrações crescentes dos prebióticos (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml) e verificou-se que, globalmente (com exceção da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 (20 mg/ml; 3 h)), não houve efeito nem da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 nem da Raftilose<sup>®</sup> P95. Apesar da Nutriose<sup>®</sup> FB06 e da Raftilose<sup>®</sup> P95 não alterarem a

captação de  $^{14}\text{C}$ -BT nestes tratamentos agudos de 1, 3 e 6 h, decidiu-se avaliar se estes dois prebióticos interferiam com a viabilidade e proliferação celular. Verificou-se que a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e a Raftilose<sup>®</sup> P95 não têm efeito quer na viabilidade quer na proliferação celular. Assim sendo, concluímos que, agudamente, as fibras testadas não interferem com a captação do BT, e podemos então especular que *in vivo*, no bolo fecal, a presença destes prebióticos não digeridos não vai afetar a absorção de BT ao nível do epitélio intestinal.

De seguida, estudamos o efeito dos prebióticos em exposição crónica (tratamentos crónicos de 48 h). Assim, verificou-se que, cronicamente, quer a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 quer a Raftilose<sup>®</sup> P95 aumentaram a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT pelas células IEC-6, sendo a captação máxima de  $^{14}\text{C}$ -BT obtida com a concentração de 50 mg/ml para a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 ( $\approx$  35% de aumento) e de 20 mg/ml para a Raftilose<sup>®</sup> P95 ( $\approx$  37% de aumento). Como a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e a Raftilose<sup>®</sup> P95 aumentaram a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT após exposição crónica de 48 h, avaliou-se o efeito destes compostos na viabilidade e proliferação celular. Verificou-se que quer a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 quer a Raftilose<sup>®</sup> P95 não alteraram a viabilidade e proliferação celular. Assim, concluímos que cronicamente, estas fibras aumentam a captação de BT, possivelmente por provocarem um aumento na quantidade de transportadores presentes na membrana celular e/ou na sua atividade intrínseca, e esse efeito não está relacionado com alterações na viabilidade e na proliferação celular. Tendo em conta estes resultados, em todas as séries de experiências realizadas posteriormente, as concentrações de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e de Raftilose<sup>®</sup> P95 usadas foram de 50 mg/ml e de 20 mg/ml, respetivamente. Para além disso, o tempo de exposição das células aos prebióticos foi de 48 h.

Gonçalves *et al.* (2011) demonstraram que a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT pelas células IEC-6 é mediada pelo MCT1 e pelo SMCT1 (85). Tendo isto em conta, as experiências seguintes tiveram como finalidade caracterizar o efeito dos prebióticos sobre os dois transportadores envolvidos na captação de  $^{14}\text{C}$ -BT pelas células IEC-6. Assim, o primeiro passo consistiu em determinar o efeito dos prebióticos na captação de  $^{14}\text{C}$ -BT na presença e na ausência de NaCl (o qual foi substituído por LiCl). Na presença de NaCl, em que ocorre tanto o transporte mediado pelo MCT1 como pelo SMCT1, tanto a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 como a Raftilose<sup>®</sup> P95 aumentaram a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT relativamente ao controlo. Quando se substituiu o NaCl pelo LiCl, para avaliar apenas o transporte mediado por MCT1, verificou-se uma diminuição da captação de  $^{14}\text{C}$ -BT relativamente ao controlo ( $\approx$  35%), pelo que se pode concluir que o transporte mediado pelo SMCT1 corresponde a 35% do total. Nestas condições, não houve diferença na captação na presença e na ausência de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 como a Raftilose<sup>®</sup> P95. Assim, podemos

concluir que há captação mediada pelo MCT1 e pelo SMCT1, mas que a presença dos prebióticos só aumenta a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT mediada pelo SMCT1 e não tem efeito no MCT1. O segundo passo consistiu em testar o efeito de dois inibidores clássicos do MCT1, NPPB e pCMB (85). Observou-se uma diminuição da captação de  $^{14}\text{C}$ -BT independente do  $\text{Na}^+$  na presença dos dois inibidores, confirmando assim o envolvimento do MCT1. Os resultados com os inibidores do MCT1 confirmaram que não há efeito dos prebióticos nem no MCT1 nem na captação de  $^{14}\text{C}$ -BT independente do  $\text{Na}^+$  mas distinta do MCT1, uma vez que quer na ausência, quer na presença dos inibidores, não há alteração da captação de  $^{14}\text{C}$ -BT na presença de Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95.

A regulação na atividade de transportadores pode ocorrer a vários níveis: ao nível da transcrição (ativadores e repressores), pós-transcrição (variantes de *splicing*), cromossômico (modificações epigenéticas), tradução (estabilidade do ARNm), e pós-tradução (alteração na proteína). Vários aspetos da regulação do MCT1 e do SMCT1 são pouco compreendidos. No entanto, sabe-se que estes transportadores são regulados a vários níveis, incluindo regulação da transcrição e pós-transcrição, que afetam a quantidade de proteína, e regulação da atividade de transportador. Assim, após investigar o efeito dos prebióticos na captação de  $^{14}\text{C}$ -BT mediada pelos transportadores MCT1 e SMCT1, fomos estudar o efeito dos prebióticos nos níveis de expressão génica do MCT1 e SMCT1. A partir dos resultados de qRT-PCR, concluímos que os prebióticos não causaram alterações na expressão do ARNm do MCT1 e SMCT1, os dois principais transportadores envolvidos na captação de BT pelas células IEC-6. Esta ausência de efeito dos prebióticos na quantidade de ARNm de SMCT1 sugere que os prebióticos afetam a função deste transportador a um nível pós-transcricional, isto é, por alteração nos níveis de proteínas SMCT1 funcionais, na atividade intrínseca deste transportador ou por outro mecanismo. Neste contexto, é importante referir que Kirat *et al.* (2009) verificaram que a pectina na dieta aumenta a expressão proteica de MCT1 ao longo do trato gastrointestinal de rato; com base neste estudo, sugerimos um efeito semelhante para os prebióticos que estudamos em relação ao SMCT1 (108).

Em resumo, os prebióticos aumentam a captação de BT mediada pelo SMCT1 e não têm efeito sobre o MCT1. Isto é interessante, uma vez que, como já referido, o SMCT1 tem um  $K_m$  baixo (maior afinidade para baixas concentrações de BT (98)), sendo que no estudo de captação foi usada uma baixa concentração de BT (10  $\mu\text{M}$ ), ou seja, nessas condições, alterações da expressão/atividade do SMCT1 repercutem-se em alterações na captação de BT. Além disso, existe uma relação inversa entre os níveis de BT no cólon humano e a incidência de tumores, que é maior no cólon distal, onde a concentração de BT é mais baixa (97). Recentemente foi demonstrado que ratinhos *knockout* para o gene SLC5A8 (SMCT1) têm maior incidência de cancro do cólon do que

ratinhos com SMCT1, em condições de baixo teor de fibra alimentar (109). Assim, os nossos resultados são duplamente interessantes no caso da Nutriose<sup>®</sup> FB 06, pois os resultados obtidos sugerem que a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 aumenta a captação de <sup>14</sup>C-BT mediada por SMCT1. Como as dextrinas são fermentadas no cólon lenta e progressivamente podem atingir o cólon distal sem terem sido ainda fermentadas (26, 110). Ao serem fermentadas no cólon distal, estas fibras vão originar uma quantidade maior de BT neste local e por outro lado, como este é o local onde existe uma maior localização de SMCT1 no cólon (79), poderá levar a uma maior captação de BT. Assim, como a localização predominante de CCR (e também de outros distúrbios gastrointestinais) ocorre no cólon distal (46), a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 poderá desempenhar um efeito protetor no desenvolvimento de CCR.

Seguidamente, utilizando a concentração dos dois prebióticos com maior efeito na captação de <sup>14</sup>C-BT (Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml e Raftilose<sup>®</sup> P95 20 mg/ml), fomos determinar se estes prebióticos são capazes de modular os efeitos celulares do BT. Em concordância com experiências recentes do nosso grupo (55), verificou-se que o tratamento das células IEC-6 com BT (5 mM) durante 48 h causa uma diminuição significativa na proliferação e viabilidade e um aumento marcado da diferenciação das células IEC-6. Como mencionado na secção de Materiais e Métodos, esta concentração de BT está bem dentro da gama fisiológica de concentrações no lúmen do cólon humano (55). Assim, de seguida, avaliou-se o efeito da interação entre o BT e os prebióticos na viabilidade, proliferação e diferenciação celular, tendo-se verificado que apenas a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml reverteu um pouco o efeito do BT, tendo reduzido a morte celular causada pelo BT. Assim, de um modo geral, concluímos que a combinação dos prebióticos com o BT não modificou as alterações na proliferação, viabilidade e diferenciação celular induzidas pelo BT. Com base no efeito dos prebióticos na captação de BT, seria de esperar que causassem uma potenciação dos efeitos celulares do BT. No entanto, tal não se verificou, em relação à proliferação, viabilidade e diferenciação celular. Esta ausência de interferência dos prebióticos nos efeitos celulares do BT pode ter várias possíveis justificações, que referimos de seguida.

A primeira está relacionada com o fato de que o BT induz uma sobre-expressão de MCT1 numa linha celular epitelial do cólon humano e que esta sobre-expressão envolve mecanismos de transcrição e de pós-transcrição sendo refletida funcionalmente como um aumento na captação de BT (68). Para além disso, outro estudo mostrou que o BT estimula marcadamente a atividade do promotor do MCT1 (111). Assim, a ausência de efeito aquando da junção de BT com os prebióticos pode dever-se ao fato de o BT por si só já levar ao aumento da atividade dos seus transportadores (MCT1 e SMCT1), e consequentemente a um aumento na sua própria captação. Assim, nessas condições, o

efeito estimulador dos prebióticos na captação do  $^{14}\text{C}$ -BT já não se faz sentir, e consequentemente os efeitos do BT não são potenciados pelos prebióticos.

A segunda está relacionada com o facto da concentração de BT usada nestes estudos (5 mM) ser elevada; de fato, o BT 5 mM teve efeitos celulares muito marcados (por exemplo potenciou muito a diferenciação celular (cerca de 6 vezes mais relativamente ao controlo)). Assim, é possível que os prebióticos não tenham sido capazes de modificar os efeitos celulares do BT por estes efeitos estarem já maximamente alterados pelo BT. Neste sentido, seria interessante estudar estes mesmos parâmetros com concentrações mais baixas de BT possivelmente os prebióticos poderiam potenciar o efeito do BT.

A terceira, está relacionada com o fato de que, para além dos diferentes alvos intracelulares do BT (por exemplo as desacetilase de histonas), foi recentemente demonstrado que o BT extracelular pode desencadear efeitos biológicos em células epiteliais do cólon por ligação a recetores membranares (112). O BT é ligando agonista para o GPR41 (recetor 41 acoplado a proteínas G) (113, 114) e para o GPR109A (112). A expressão de GPR109A é silenciada em cancro do cólon em humanos (112) e a sua re-expressão induz apoptose das células do cancro do cólon, mas apenas na presença do BT, funcionando o GPR109A como um gene supressor tumoral (112). Isto mostra um duplo efeito do BT como ligando do recetor e inibidor das HDACs. Foi demonstrado recentemente que a ativação de GPR41 modula negativamente os efeitos induzidos pelo BT intracelular, pois reduz a acetilação das histonas e tem um efeito inibitório sobre os efeitos anti-proliferativos e pro-apoptóticos do BT (115). Podemos portanto sugerir que o aumento da captação de  $^{14}\text{C}$ -BT (e consequente inibição das HDACs) provocado pelos prebióticos não potencia os efeitos do BT na proliferação, viabilidade e diferenciação das células IEC-6 porque esses efeitos do BT dependem da sua ligação a recetores membranares; é importante referir que as células IEC-6 expressam o recetor GPR109A (116).

Concluindo, agudamente os prebióticos não têm efeito sobre a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT nem sobre a proliferação e viabilidade celular das células IEC-6. Por outro lado, cronicamente (48 h) os prebióticos Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e Raftilose<sup>®</sup> P95 aumentam a captação de  $^{14}\text{C}$ -BT nas células IEC-6, sendo que este aumento não depende de alterações na viabilidade nem na proliferação celular. Este aumento parece envolver o transportador SMCT1 mas não o MCT1, mas não se relaciona com um aumento da transcrição (expressão de ARNm) do SMCT1. Por último, os prebióticos não potenciam o efeito do BT na proliferação, viabilidade e diferenciação celular, sendo que a Nutriose<sup>®</sup> FB 06 50 mg/ml diminuiu mesmo o efeito causado pelo BT na morte celular.

Tendo em conta estes resultados, pode-se especular que os prebióticos possam desempenhar um papel importante nos efeitos celulares do BT, pois apesar da Nutriose<sup>®</sup> FB 06 e da Raftilose<sup>®</sup> P95 não terem sido capazes de modificar os efeitos celulares do BT nos parâmetros estudados (viabilidade, proliferação e diferenciação celular) o fato de aumentarem a captação de BT, e conseqüentemente os níveis intracelular de BT, significa que pode haver interferência noutros mecanismos intracelulares influenciados pelo BT, tais como a apoptose e a inibição da ativação de NF-KB, o que contribui para a homeostasia do epitélio do cólon.

Por último, o efeito do BT em muitas células tumorais (um efeito anticancerígeno, que envolve a indução de diferenciação e apoptose e inibição da proliferação) e em células não carcinogénicas é oposto, sendo este fenómeno referido como "paradoxo do BT" (46). Tendo em conta o contexto da carcinogénese do cólon, seria interessante estudar o proposto neste estudo numa linha de células tumorais e fazer uma comparação dos efeitos dos prebióticos na captação de <sup>14</sup>C-BT.



## **Capítulo VI**

---

### **Referências Bibliográficas**



1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Khuhaprema T, Srivatanakul P. Colon and Rectum Cancer in Thailand: An Overview. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2008;38(4):237-43.
3. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. 2007;18(3):581-92.
4. Pan M-H, Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(1):32-45.
5. Potter JD. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(11):916-32.
6. Benson A.B. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. 2007;13(6 Suppl C):S5-18.
7. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research. 2007.
8. Michels KB, Giovannucci E, Chan AT, Singhania R, Fuchs CS, Willett WC. Fruit and Vegetable Consumption and Colorectal Adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Research*. 2006;66(7):3942-53.
9. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *British Medical Journal*. 2011;343.
10. Hakama M, Hoff G, Kronborg O, Páhlman L. Screening for colorectal cancer. *Acta Oncologica*. 2005;44(5):425-39.

11. Leslie A, Steele RJC. Management of colorectal cancer. *Postgraduate Medical Journal*. 2002;78(922):473-8.
12. Beata Kasztelan-Szczerbińska, Halina Cichoż-Lach, Maria Słomka. Colorectal cancer as a health care problem: evaluation of the current diagnostic options. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2008;118 (4):224-7.
13. Rowena N. Schwartz, Charles D. Blanke, Pesko LJ. Targeted Therapies in the Treatment of Colorectal Cancer: What Managed Care Needs to Know. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2004; 10(5)(suppl S-b):S2-S3.
14. Mathew A, Peters U, Chatterjee N, Kulldorff M, Sinha R. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. *International Journal of Cancer*. 2004;108(2):287-92.
15. Wattenberg LW. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Research*. 1985;45(1):1-8.
16. Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Digestion*. 2007;76(1):51-67.
17. Herszényi L, Farinati F, Miheller P, Tulassay Z. Chemoprevention of colorectal cancer: feasibility in everyday practice? *European Journal of Cancer Prevention*. 2008;17(6):502-14.
18. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1971;28(1):3-13.
19. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 1995;125(6):1401-12.
20. Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. Dietary fibre and colorectal cancer: A model for environment – gene interactions. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(6):571-84.

21. Roberfroid M. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(3):830S-7S.
22. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 2004;17(2):259-75.
23. Lim CC, Ferguson LR, Tannock GW. Dietary fibres as “prebiotics”: Implications for colorectal cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(6):609-19.
24. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, et al. Short-Chain Fructo-Oligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*. 1999;129(1):113-6.
25. Cummings JH. Dietary carbohydrates and the colonic microflora. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 1998;1(5):409-14.
26. Lefranc-Millot C, Gu, rin-Deremaux L, Wils D, Neut C, Miller LE, et al. Impact of a Resistant Dextrin on Intestinal Ecology: How Altering the Digestive Ecosystem with NUTRIOSE, a Soluble Fibre with Prebiotic Properties, May Be Beneficial for Health. *The Journal of International Medical Research*. 2012;40(1):211-24.
27. Lefranc-Millot C. NUTRIOSE® 06: a useful soluble dietary fibre for added nutritional value. *Nutrition Bulletin*. 2008;33(3):234-9.
28. Wils D, Scheuplein RJ, Deremaux L, Looten PH. Safety profile of a food dextrin: Acute oral, 90-day rat feeding and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(10):3254-61.
29. van den Heuvel EGHM, Wils D, Pasma WJ, Bakker M, Saniez MH, Kardinaal AFM. Short-term digestive tolerance of different doses of NUTRIOSE® FB, a food dextrin, in adult men. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(7):1046-55.

30. Guerin-Deremaux L, Ringard F, Desailly F, Wils D. Effects of a soluble dietary fibre NUTRIOSE<sup>®</sup> on colonic fermentation and excretion rates in rats. *Nutr Res Pract.* 2010;4(6):470-6.
31. Pasma W, Wils D, Saniez MH, Kardinaal A. Long-term gastrointestinal tolerance of NUTRIOSE<sup>®</sup> FB in healthy men. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60(8):1024-34.
32. Niness KR. Inulin and Oligofructose: What Are They? *The Journal of Nutrition.* 1999;129(7):1402S-6S.
33. Kozmus CEP, Moura E, Serrão MP, Real H, Guimarães JT, Guedes-de-Pinho P, et al. Influence of dietary supplementation with dextrin or oligofructose on the hepatic redox balance in rats. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2011;55(11):1735-9.
34. Commane DM, Shortt CT, Silvi S, Cresci A, Hughes RM, Rowland IR. Effects of Fermentation Products of Pro- and Prebiotics on Trans-Epithelial Electrical Resistance in an In Vitro Model of the Colon. *Nutrition and Cancer.* 2005;51(1):102-9.
35. Reddy BS, Hamid R, Rao CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis.* 1997;18(7):1371-4.
36. Reddy B S, A MJ, Marcel R. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *The Journal of Nutrition.* 1999;129(7):S1478-S82.
37. Koo M, Rao AV. Long-term effect of bifidobacteria and Neosugar on precursor lesions of colonic cancer in cf1 mice. *Nutrition and Cancer.* 1991;16(3-4):249-57.
38. Pierre F, Perrin P, Champ M, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. Short-Chain Fructo-oligosaccharides Reduce the Occurrence of Colon Tumors and Develop Gut-associated Lymphoid Tissue in Min Mice. *Cancer Research.* 1997;57(2):225-8.
39. Taper HS, Delzenne NM, Roberfroid MB. Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non-digestible carbohydrates. *International Journal of Cancer.* 1997;71(6):1109-12.

40. Hughes R, Rowland IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis*. 2001;22(1):43-7.
41. Tunglund BC, Meyer D. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002;1(3):90-109.
42. Harris PJ, Ferguson LR. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1993;290(1):97-110.
43. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: A role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5(10):1265-9.
44. Bingham SA. Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1990;49(2):153-71.
45. Hague A, Paraskeva C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *European Journal of Cancer Prevention*. 1995;4(5):359-64.
46. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008;27(2):104-19.
47. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009;682(1):39-53.
48. Kirilin WG, Cai J, DeLong MJ, Patten EJ, Jones DP. Dietary Compounds That Induce Cancer Preventive Phase 2 Enzymes Activate Apoptosis at Comparable Doses in HT29 Colon Carcinoma Cells. *The Journal of Nutrition*. 1999;129(10):1827-35.

49. Thornton JR. High colonic pH promotes colorectal cancer. *The Lancet*. 1981;317(8229):1081-3.
50. Topping DL, Clifton PM. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews*. 2001;81(3):1031-64.
51. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):601-14.
52. Kulkarni N, Reddy BS. Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* Cultures on the Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation and Fecal Bacterial  $\beta$ -Glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1994;207(3):278-83.
53. Ballongue J, Schumann C, Quignon P. Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1997;222:41-4.
54. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*. 1980;21(9):793-8.
55. Gonçalves P, Gregório I, Martel F. The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2011;301(5):C984-C94.
56. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006;40(3):235-43.
57. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):194-202.
58. Davie JR. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(7):2485S-93S.

59. Ito T. Role of Histone Modification in Chromatin Dynamics. *Journal of Biochemistry*. 2007;141(5):609-14.
60. Fang JY. Histone deacetylase inhibitors, anticancerous mechanism and therapy for gastrointestinal cancers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005;20(7):988-94.
61. Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray Analysis of Butyrate Regulated Genes in Colonic Epithelial Cells. *DNA and Cell Biology*. 2006;25:49-62.
62. Fredstrom SB, Lampe JW, Jung H-JG, Slavin JL. Apparent Fiber Digestibility and Fecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations With Ingestion of Two Types of Dietary Fiber. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1994;18(1):14-9.
63. Weaver GA, Tangel CT, Krause JA, Parfitt MM, Jenkins PL, Rader JM, et al. Acarbose Enhances Human Colonic Butyrate Production. *The Journal of Nutrition*. 1997;127(5):717-23.
64. Hallert C, Björck I, Nyman M, Pousette A, Grännö C, Svensson H. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: Controlled pilot study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2003;9(2):116-21.
65. Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997;427:123-34.
66. Kawamata K, Hayashi H, Suzuki Y. Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2007;454(2):253-62.
67. McNeil NI, Cummings JH, James WP. Rectal absorption of short chain fatty acids in the absence of chloride. *Gut*. 1979;20(5):400-3.

68. Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *The Journal of Physiology*. 2002;539(2):361-71.
69. Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences*. 2006;78(21):2419-25.
70. Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer*. 2002;86(8):1262-9.
71. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(14):8412-7.
72. Cuff M, Dyer J, Jones M, Shirazi-Beechey S. The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: Its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology*. 2005;128(3):676-86.
73. Cuff MA, Shirazi-Beechey SP. The Human Monocarboxylate Transporter, MCT1: Genomic Organization and Promoter Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;292(4):1048-56.
74. Garcia CK, Li X, Luna J, Francke U. cDNA Cloning of the Human Monocarboxylate Transporter 1 and Chromosomal Localization of the SLC16A1 Locus to 1p13.2-p12. *Genomics*. 1994;23(2):500-3.
75. Morris M, Felmlee M. Overview of the Proton-coupled MCT (SLC16A) Family of Transporters: Characterization, Function and Role in the Transport of the Drug of Abuse  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid. *The AAPS Journal*. 2008;10(2):311-21.
76. Poole RC, Sansom CE, Halestrap AP. Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H<sup>+</sup>/lactate cotransporter (MCT1). *Biochem J*. 1996;320(3):817-24.

77. Juel C, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle — role and regulation of the monocarboxylate transporter. *The Journal of Physiology*. 1999;517(3):633-42.
78. Halestrap A, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2004;447(5):619-28.
79. Borthakur A, Anbazhagan AN, Kumar A, Raheja G, Singh V, Ramaswamy K, et al. The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF- $\alpha$ -induced downregulation of SMCT1 expression and function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;299(4):G928-G34.
80. Quintero M, Maldonado M, Perez-Munoz M, Jimenez R, Fangman T, Rupnow J, et al. Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Prebiotic Oligosaccharides. *Current Microbiology*. 2011;62(5):1448-54.
81. Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic Galactooligosaccharides Reduce Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Tissue Culture Cells. *Infection and Immunity*. 2006;74(12):6920-8.
82. Burns AJ, Rowland IR. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004;551(1–2):233-43.
83. Leforestier G, Blais A, Blachier F, Marsset-Baglieri A, Davila-Gay A-M, Perrin E, et al. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *European Journal of Nutrition*. 2009;48(8):457-64.
84. Grimoud J, Durand H, de Souza S, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, et al. In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;144(1):42-50.

85. Gonçalves P, Araújo J, Martel F. Characterization of Butyrate Uptake by Nontransformed Intestinal Epithelial Cell Lines. *Journal of Membrane Biology*. 2011;240(1):35-46.
86. Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer HU. New York: Academic Press. 1974:574-9.
87. Orchel A, Dzierżewicz Z, Parfiniewicz B, Weglarz La, Wilczok T. Butyrate-Induced Differentiation of Colon Cancer Cells Is PKC and JNK Dependent. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005;50(3):490-8.
88. Chung YS, Song IS, Erickson RH, Sleisenger MH, Kim YS. Effect of Growth and Sodium Butyrate on Brush Border Membrane-associated Hydrolases in Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. 1985;45(7):2976-82.
89. Negrão MR, Keating E, Faria A, Azevedo I, Martins MJ. Acute Effect of Tea, Wine, Beer, and Polyphenols on ecto-Alkaline Phosphatase Activity in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(14):4982-8.
90. Fukushima K, Sasaki I, Takahashi Ki, Naito H, Ogawa H, Sato S, et al. Lipopolysaccharide Exhibits Synergistic Enhancement of Butyrate-Induced and Retinoic Acid-Mediated Alkaline Phosphatase Activity on Small Intestinal Epithelial Cell Line, IEC-6. *Digestion*. 1998;59(6):683-8.
91. Clark MJ, Robien K, Slavin JL. Effect of prebiotics on biomarkers of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Nutrition Reviews*. 2012;70(8):436-43.
92. Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary Factors In Human Colorectal Cancer. *Annual Review of Nutrition*. 1999;19(1):545-86.
93. Rose DJ, DeMeo MT, Keshavarzian A, Hamaker BR. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. *Nutrition Reviews*. 2007;65(2):51-62.

94. McIntyre A, Young GP, Taranto T, Gibson PR, Ward PB. Different fibers have different regional effects on luminal contents of rat colon. *Gastroenterology*. 1991;101(5):1274-81.
95. Gonçalves P, Catarino T, Gregório I, Martel F. Inhibition of butyrate uptake by the primary bile salt chenodeoxycholic acid in intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(9):2937-47.
96. Gonçalves P, Araújo J, Pinho M, Martel F. Modulation of butyrate transport in Caco-2 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2009;379(4):325-36.
97. Clausen MR, Bonnén H, Mortensen PB. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*. 1991;32(8):923-8.
98. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain J-P. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: A transport deficiency. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010;16(4):684-95.
99. Daly K, Cuff MA, Fung F, Shirazi-Beechey SP. The importance of colonic butyrate transport to the regulation of genes associated with colonic tissue homeostasis. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(4):733-5.
100. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of Cell Biology*. 1979;80(2):248-65.
101. Wood SR, Zhao Q, Smith LH, Daniels CK. Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. *Tissue and Cell*. 2003;35(1):47-58.
102. Inui K, Quaroni A, Tillotson LG, Isselbacher KJ. Amino acid and hexose transport by cultured crypt cells from rat small intestine. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1980;239(5):C190-C6.

103. Fraga S, Serrão MP, Soares-da-Silva P. I-Type Amino Acid Transporters in Two Intestinal Epithelial Cell Lines Function as Exchangers with Neutral Amino Acids. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(4):733-8.
104. Jakobs ES, Paterson AR. Sodium-dependent, concentrative nucleoside transport in cultured intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1986;140(3):1028-35.
105. Said HM, Ma TY, Ortiz A, Tapia A, Valerio CK. Intracellular regulation of intestinal folate uptake: studies with cultured IEC-6 epithelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1997;272(2):C729-C36.
106. Murota K, Matsui N, Kawada T, Takahashi N, Shintani T, Sasaki K, et al. Influence of fatty alcohol and other fatty acid derivatives on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells. *Lipids*. 2001;36(1):21-6.
107. Fujita I, Akagi Y, Hirano J, Nakanishi T, Itoh N, Muto N, et al. Distinct mechanisms of transport of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in intestinal epithelial cells (IEC-6). *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 2000;107(3-4):219-31.
108. Kirat D, Kondo K, Shimada R, Kato S. Dietary pectin up-regulates monocarboxylate transporter 1 in the rat gastrointestinal tract. *Experimental Physiology*. 2009;94(4):422-33.
109. Bhutia YD, Singh N, Ganapathy V. Deletion of Slc5a8 in mice promotes metabolic syndrome, colonic inflammation, and colon cancer: A phenomenon dependent on dietary fiber content. [Abstract 26]. In: *Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, IL Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2012;72(8 Suppl):Abstract nr 26 doi:1538-7445AM2012-26
110. Nilsson U, Nyman M. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerisation and solubility. *British Journal of Nutrition*. 2005;94(5):705-13.

111. Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: Involvement of NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;103(5):1452-63.
112. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A Is a G-protein–Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Research*. 2009;69(7):2826-32.
113. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(13):11312-9.
114. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, et al. Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):25481-9.
115. Wu J, Zhou Z, Hu Y, Dong S. Butyrate-induced GPR41 Activation Inhibits Histone Acetylation and Cell Growth. *Journal of Genetics and Genomics*. 2012;39(8):375-84.
116. Borthakur A, Priyamvada S, Kumar A, Natarajan AA, Gill RK, Alrefai WA, et al. A Novel Nutrient Sensing Mechanism Underlies Substrate-induced Regulation of Monocarboxylate Transporter 1. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012.