

SANDRA CRISTINA GENARO**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO AMENIZA A AGRESSIVIDADE DO
TUMOR COLORRETAL INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATOS**

SANDRA CRISTINA GENARO**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO AMENIZA A AGRESSIVIDADE DO
TUMOR COLORRETAL INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador:
Prof. Dr. Luís Souza Lima de Souza Reis

Presidente Prudente - SP

2018

636.208 51 Genaro, Sandra Cristina.
G324s Suplementação com probiótico ameniza a
 agressividade do tumor colorretal induzido quimicamente
 em ratos / Sandra Cristina Genaro. – Presidente
 Prudente, 2018.
 72 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.
Orientador: Luís Souza Lima de Souza Reis.

1. Câncer Colorretal. 2. Alimento Funcional. 3.
Quimioterapia. 4. Focos de Criptas Aberrantes. 5.
Microflora Intestinal. I. Título.

SANDRA CRISTINA GENARO

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO AMENIZA A AGRESSIVIDADE DO
TUMOR COLORRETAL INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 23 de novembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis - Orientador
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Titular Dra. Eunice Oba
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp
Botucatu-SP

Prof. Dr. Antônio Cláudio Goulart Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro-RJ

DEDICATÓRIA

*A honra e a glória sejam a Deus.
Aos meus pais, meu filho, meus irmãos
e meu companheiro, por todo incentivo,
amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pelo financiamento desta pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis, pela oportunidade, apoio e ensinamentos;

A todos funcionários e professores do programa de doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, em especial à Keid Ribeiro Kruger por toda paciência, carinho e atenção;

Ao amigo Wilson Romero Nakagaki, por estar no local e hora certos, responsável por ser a chave principal deste trabalho e pelo início de uma parceria de pesquisas;

Ao Prof. Dr. Wagner José Fávaro que me acolheu e abriu a porta de seu laboratório na UNICAMP, permitindo a realização deste sonho;

Ao Eduardo Augusto Rabelo Socca, pela parceria e paciência;

À colega e amiga Sabrina Karen Reis, pela amizade, força e companheirismo;

À colega e amiga Sabrina Lenquiste pelo socorro nas horas de tribulação;

Aos professores do curso de Nutrição pelo companheirismo e amizade;

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

E principalmente aos cafés das tardes de domingo com a família, quando possível, que me sustentavam a alma e nutriam o coração.

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu”.*
(Fernando Pessoa)

RESUMO

Suplementação com probiótico ameniza a agressividade do tumor colorretal induzido quimicamente em ratos

O câncer colorretal (CCR) acomete aproximadamente um milhão de pessoas por ano, considerado a segunda causa de morte mais comum entre mulheres e a terceira mais prevalente em homens. Os fatores de risco incluem as síndromes genéticas; doenças inflamatórias intestinais; história familiar; sedentarismo; obesidade, alimentação pobre em fibras, rica em gorduras saturadas, alimentos defumados ou embutidos, carne vermelha em excesso ($>300\text{g/sem}$), modo de preparação em altas temperaturas e na brasa; medicamentos; tabagismo e bebida alcoólica em excesso. Esses fatores levam a alteração da microbiota intestinal a qual é colonizada por bactérias patogênicas capazes de provocar uma resposta inflamatória local que, em casos crônicos, ativam componentes cancerígenos. Os probióticos têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores com o intuito de compreender a sua ação na microbiota intestinal, auxiliando na prevenção e tratamento do câncer colorretal. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um probiótico na agressividade do tumor colorretal induzido quimicamente em ratos. Vinte e cinco ratos machos Fisher 344, 250 g, recebendo ração e água *ad libitum*, foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (5 ratos/grupo): $G_{Controle}$, sem tratamento; G_{Tumor} , indução do tumor; $G_{Tumor+5FU}$, indução do tumor, aplicado 5-Fluorouracil; $G_{Tumor+Prob}$, indução do tumor, suplementado com probiótico; $G_{Tumor+5-FU+Prob}$, indução do tumor, aplicado 5-Fluorouracil, suplementado com probiótico. Para indução do tumor colorretal, os animais receberam quatro injeções intraperitoneais do carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) na dose de 20 mg/kg de peso corporal, sendo duas aplicações por semana, durante quatro semanas consecutivas. Deu-se um intervalo de 15 dias e as aplicações de DMH foram repetidas por mais quatro semanas. Após 5 semanas da última dose do carcinógeno, iniciou-se o tratamento por dez semanas consecutivas, com 5-Fluorouracil: uma dose de 15 mg/kg por semana, via intraperitoneal e probiótico comercial: 1×10^9 UFC, diariamente, por gavagem. Os dados foram analisados pela Análise de Variância One Way e as médias comparadas pelo teste de *Dunnett*. Utilizado software estatístico *GraphPad Prism*. As análises histopatológicas avaliadas pelo teste de proporção Qui-quadrado. Foi considerado erro tipo-I de 5% como estatisticamente significante. Comparados com o G_{Tumor} , o $G_{Tumor+Prob}$ ($p<0,0373$) e $G_{Tumor+5-FU+Prob}$ ($p<0,0003$) exibiram efeito atenuante na agressividade do tumor colorretal observando redução na contagem de Focos de Criptas Aberrantes; e menor porcentagem de lesões neoplásicas malignas no $G_{Tumor+Prob}$ (40% de adenoma tubular de baixo grau, 40% de carcinoma *in situ*, 20% de adenocarcinoma de baixo grau) e $G_{Tumor+5-FU+Prob}$ (40% de adenoma tubular de baixo grau e 60% de carcinoma *in situ*). Concluimos que a suplementação com probiótico tem potencial para diminuir a formação de criptas aberrantes e amenizar a progressão da malignidade do tumor, potencializando o efeito antitumoral da quimioterapia com 5-Fluorouracil nos segmentos côlicos.

Palavras-chave: Câncer Colorretal. Alimento Funcional. Quimioterapia. Focos de Criptas Aberrantes. Microflora Intestinal.

ABSTRACT

Probiotic supplementation attenuates the aggressiveness of chemically induced colorectal tumor in rats

Among the existing types, colorectal cancer (CRC) affects approximately one million people per year, considered the second most common cause of death among women and the third most prevalent in men. Risk factors are genetic syndromes; inflammatory bowel diseases; family history; sedentary lifestyle; obesity, low fiber, high saturated fats, smoked foods or built-in food, excess red meat (> 300g/week), preparation mode in high temperatures and on the ember; medications; smoking, and excessive alcohol. These factors alter the intestinal microbiome which is colonized by pathogenic bacteria capable of provoking a local inflammatory response that, in chronic cases, activates carcinogenic components. Probiotics have increasingly attracted the attention of researchers in order to understand their action in the intestinal microbiota, aiding in the prevention and treatment of colorectal cancer. The objective of this study was to evaluate the effect of a probiotic In aggressiveness of the chemically induced colorectal tumor in rats. Twenty-five male Fisher 344 rats, 250 g, receiving ration and water *ad libitum*, were randomly divided into 5 groups (5 rats/group): $G_{Control}$, without treatment; G_{Tumor} , tumor induction; $G_{Tumor + 5FU}$, tumor induction, 5-fluorouracil applied; $G_{Tumor + prob}$, tumor induction, supplemented with probiotic; $G_{Tumor + 5-FU + prob}$, tumor induction, applied 5-fluorouracil, supplemented with probiotic. For tumor induction, the animals received four intraperitoneal injections of the carcinogen 1,2-dimethylhidrazine (DMH) at the dose of 20 mg/kg body weight, being two applications per week, for four consecutive week. A 15-day interval was given and DMH applications were repeated for another four week. After 5 weeks of the last dose of the carcinogen, the treatment was initiated for ten consecutive weeks, applying a weekly dose of 15 mg/kg body weight of 5-fluorouracil, Intraperitoneal route and commercial probiotic containing Lactobacillus and Bifidobacterium at the dose of 1x10⁹ UFC, administered by gavage, daily. Datas were analyzed by the analysis of variance One Way and the averages compared by the test of *Dunnett*. Used Software Statistical *GraphPad Prism*. The histopathologic analyses evaluated by the Chi-square ratio test. It was considered type-I error of 5% as statistically significant. Compared to the G_{Tumor} , the $G_{Tumor + prob}$ ($P < 0,0373$) and $G_{Tumor + 5-FU + prob}$ ($P < 0,0003$) showed attenuating effect on the aggressiveness of the colorectal tumor, with a reduction in the count of Aberrant Crypts Foci; and lower percentage of malignant neoplastic lesions in the $G_{Tumor + prob}$ (40% of low-grade tubular adenoma, 40% of carcinoma *in situ*, 20% of low-grade adenocarcinoma) and $G_{Tumor + 5-FU + prob}$ (40% of low-grade tubular adenoma and 60% of carcinoma *in situ*). The suplementation with probiotic has the potential to decrease the formation of aberrant crypts and mitigate the progression of tumor malignancy, potentializing the antitumor effect of 5-fluorouracil chemotherapy in the colic segments.

Keywords: Colorectal cancer. Functional food. Chemotherapy. Aberrant crypt foci. Intestinal microflora.

LISTA DE SIGLAS

CCR	– Câncer Colorretal
FCA	– Focos de Criptas Aberrantes
UICC	– União Internacional Contra o Câncer
T	– Extensão do tumor primário
N	– Metástase em linfonodo regional
M	– Metástase à distância
5-FU	– 5-Fluorouracil
TGI	– Trato gastrointestinal
AGCC	– Ácidos graxos de cadeia curta
NF-Kb	– Fator nuclear kappa B
OMS	– Organização Mundial de Saúde
FAO	– Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
ISAPP	– Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UFC	– Unidades Formadoras de Colônias
CLA	– Ácido linoleico conjugado
CCR	– Câncer Colorretal

SUMÁRIO

1	ARTIGO A: CÂNCER COLORRETAL E A MICROBIOTA INTESTINAL, UMA REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2	ARTIGO B: SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO AMENIZA A AGRESSIVIDADE DO TUMOR COLORRETAL INDUZIDO QUÍMICAMENTE EM RATOS.....	25
	APÊNDICE 1- LINHA DO TEMPO PARA O TRATAMENTO DOS RATOS.....	45
	APÊNDICE 2- ANÁLISE NUTRICIONAL DA RAÇÃO DOS RATOS.....	46
	ANEXO 1 - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: SÊMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS.....	47
	ANEXO 2 - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: NUTRITION – JOURNAL – ELSEVIER.....	52
	ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	66
	ANEXO 4 – CERTIFICADO DE SEGUNDO LUGAR DO PRÊMIO GANEPÃO ABBOTT 40 ANOS.....	67

1 ARTIGO A

CÂNCER COLORRETAL E A MICROBIOTA INTESTINAL, UMA REVISÃO DE LITERATURA

COLORECTAL CANCER AND INTESTINAL MICROBIOTA, A LITERATURE REVIEW

RESUMO

O câncer faz parte do grupo de doenças crônicas não transmissíveis, apresentando altas taxas de mortalidade mundial. Dentre os tipos existentes, o câncer colorretal (CCR) acomete aproximadamente um milhão de pessoas por ano, considerado a segunda causa de morte mais comum entre mulheres e a terceira mais prevalente em homens. Os fatores de risco incluem as síndromes genéticas; doenças inflamatórias intestinais; história familiar; sedentarismo; obesidade, alimentação pobre em fibras, rica em gorduras saturadas, alimentos defumados ou embutidos, carne vermelha em excesso ($>300\text{g/sem}$), modo de preparação em altas temperaturas e na brasa; medicamentos, tabagismo e bebida alcoólica em excesso. Esses fatores alteram a microbiota intestinal a qual é colonizada por bactérias patogênicas capazes de provocar uma resposta inflamatória local que, em casos crônicos, ativam componentes cancerígenos. O tratamento do CCR é principalmente cirúrgico, podendo ser realizado radioterapia e/ou quimioterapia. Os quimioterápicos causam efeitos colaterais como náuseas, vômitos, mucosite, diarreia, anemia, leucopenia e neutropenia. Associado ao tratamento convencional, a utilização de probióticos tem o propósito de restaurar a microbiota intestinal, atuando em mecanismos celulares e moleculares. A microbiota intestinal exerce enorme impacto sobre a função e saúde do organismo, interagindo com o sistema imune, resistindo a agentes infecciosos, impedindo a estruturação de resposta alérgica e translocação de patógenos. Age também como barreira, sintetizando citocinas pelas células imunes da mucosa intestinal, aumentando a resposta inata; aproveita energia a partir de componentes da dieta através dos ácidos graxos de cadeia curta; possui atividade anti-inflamatória, suprimindo a ativação do fator nuclear kappa B; e reduz o risco de câncer de cólon devido a sua habilidade em inibir a atividade genotóxica das nitrosaminas e do peróxido de hidrogênio, além de induzir diferentes níveis de apoptose, diferenciação e estagnação do ciclo celular no câncer de cólon observados em estudos utilizando modelos de animais. Ao ingerir probióticos, as bactérias saudáveis que sobrevivem às secreções digestivas, chegam ao intestino grosso capazes de colonizar este ambiente, favorecendo o equilíbrio microbiano, diminuindo a população de bactérias associadas a doenças colônicas e através de mecanismos não totalmente conhecidos, inibem a formação de tumores colorretais. Os probióticos têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores com o intuito de compreender a sua ação na microbiota intestinal, auxiliando na prevenção e tratamento do câncer colorretal.

Palavras Chave: Câncer. Focos de Criptas Aberrantes. Microflora Intestinal.

ABSTRACT

Cancer is part of the group of chronic noncommunicable diseases, with high mortality rates worldwide. Among the existing types, colorectal cancer (CRC) affects approximately one million people per year, considered the second most common cause of death among women and the third most prevalent in men. Risk factors include genetic syndromes; inflammatory bowel diseases; family history; sedentary lifestyle; obesity, low-fiber, diet rich in saturated fats, smoked or inlaid foods, excess red meat ($> 300\text{g/week}$), high-temperature and hot-heat preparation mode; medications, smoking, and excessive alcohol. These factors alter the gut microbiota which is colonized by pathogenic bacteria capable of provoking a local inflammatory response that, in chronic cases, activates carcinogenic components. The treatment of CRC is especially surgical, and radiotherapy and / or chemotherapy may be performed. Chemotherapeutics cause side effects such as nausea, vomiting, mucositis and diarrhea, anemia, leukopenia and neutropenia. Associated with conventional treatment, the use of probiotics has the purpose of restoring the gut microbiota, acting in cellular and molecular mechanisms. The gut microbiota exerts enormous impact on the function and health of the organism, interacting with the immune system, resisting infectious agents, preventing the structuring of allergic response and translocation of pathogens. The microbiota acts as a barrier, synthesizing cytokines by the immune cells of the intestinal mucosa, increasing the innate response, harnessing energy from dietary components through short chain fatty acids, has anti-inflammatory activity, suppressing the activation of nuclear factor kappa B ; and reduces the risk of colon cancer due to its ability to inhibit the genotoxic activity of nitrosamines and hydrogen peroxide, as well as induce different levels of apoptosis, differentiation and cell cycle stagnation in colon cancer in animal models. By ingesting probiotics, healthy bacteria that survive digestive secretions reach the large intestine capable of colonizing this environment, favoring the microbial balance, decreasing the population of bacteria associated with colonic diseases and through mechanisms not fully known, inhibit the formation of tumors of colorectal cancer. Probiotics have increasingly attracted the attention of researchers in order to understand their action in the gut microbiota, aiding in the prevention and treatment of colorectal cancer.

Keywords: Cancer. Foci Aberrant Crypts. Intestinal Microflora.

Desenvolvimento

Câncer Colorretal

O câncer faz parte do grupo de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), sendo considerado um grave problema de saúde pública (RODRIGUES; LIGEIRO; SILVA, 2015) apresentando altas taxas de mortalidade mundial (DUNCAN et al., 2012). A estimativa para o Brasil é de 634.880 novos casos de câncer no biênio 2018/2019 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018) e para 2040, a Organização Mundial da Saúde calcula que a estimativa de novos casos ultrapassará 25 milhões (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

O processo pelo qual as células normais transformam-se em células cancerígenas é complexo, multifásico, com alterações celulares, moleculares e morfológicas, sustentadas por modificações na expressão de genes que coordenam atividades essenciais celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015).

Dentre os tipos existentes, o câncer colorretal (CCR) acomete aproximadamente um milhão de pessoas por ano (ARAUJO, 2013), considerado a segunda causa de morte mais comum entre mulheres e a terceira mais prevalente em homens (ZHU et al., 2015). Sendo os fatores de risco, as síndromes genéticas; doenças inflamatórias intestinais; história familiar; sedentarismo; obesidade, alimentação pobre em fibras, rica em gorduras saturadas, alimentos defumados ou embutidos, carne vermelha em excesso ($>300\text{g/sem}$), modo de preparação em altas temperaturas e na brasa; medicamentos (JONES-MCLEAN et al., 2015); tabagismo e bebida alcoólica em excesso (ERDRICH et al., 2015). Esses fatores alteram a microbiota intestinal (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010) a qual é colonizada, em grande parte, por bactérias patogênicas, capazes de provocar uma resposta inflamatória local que, em casos crônicos, ativam componentes cancerígenos (AZIZ et al. 2013).

No processo de evolução do câncer colorretal, as criptas de Lieberkühn, comumente encontradas no intestino delgado e grosso, sofrem alterações, apresentando tamanho aumentado, com maior espeçamento epitelial, contendo células hiperchromáticas, maior espaço peri-críptico, núcleos alongados e estratificados e depleção de mucina. A partir dessas modificações, passam a serem chamadas de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) (GUPTA et al., 2017). Os FCA são considerados importantes biomarcadores no diagnóstico do câncer colorretal por serem as primeiras lesões pré-cancerosas que surgem durante o processo de carcinogênese (CASTELLARIN et al., 2012), envolvidos na sequência FCA-adenoma-carcinoma (KOSTIC et al., 2012).

O crescimento do CCR ocorre intramuralmente envolvendo a circunferência intestinal; contiguamente aderido às estruturas adjacentes, ou invadindo tais estruturas por meio dos vasos linfáticos ou linfonodos pericólicos, progredindo centriptamente ao longo dos vasos linfáticos que acompanham os vasos sanguíneos. O reto localiza-se num espaço envolvido pela gordura peri-retal

com suprimento sanguíneo para o reto superior e médio a partir da artéria retal superior (circulação venosa portal). O suprimento sanguíneo adicional para o reto médio e inferior é feito a partir das artérias retais, média e inferior (circulação venosa sistêmica), causando uma disseminação direta do tumor através da parede retal, pela invasão da gordura peri-retal. No reto médio, a disseminação é feita pelo sistema linfático e no reto inferior, os canais linfáticos são acometidos acompanhado das artérias (ROEDIGER, 1999).

O estadiamento convencional mais utilizado que classifica tumores malignos é o Sistema TNM, recomendado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor (T), características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou não de metástases (M) (ROSSI et al., 2006; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2004), esta classificação é aplicável somente para carcinoma e deve haver confirmação histológica da doença, o qual os procedimentos para avaliação estão descritos nos quadros 1 e 2, e o grupamento por estádios, descrito no quadro 3.

Tratamento do Câncer Colorretal

O tratamento do CCR é baseado nas características anatomo-patológicas do tumor, bem como em seu estadiamento. O nível de infiltração da parede do órgão, assim como invasão de vasos, acometimento de nervos e metástases linfonodais ou em órgãos à distância, estão relacionados com pior prognóstico da doença (FONSECA, et al., 2011).

As colectomias segmentares segundo a localização do tumor, associadas à ressecção da drenagem linfática regional, constituem as cirurgias padrão (ROSSI et al., 2006), porém antes de uma cirurgia, pode ser requisitado o tratamento neoadjuvante com o intuito de reduzir o tamanho ou extensão do tumor. Neste caso, a radioterapia isolada ou acompanhada por quimioterapia, é recomendada para tumores com estádios II e III. Após a cirurgia, os pacientes de estádio III apresentam indicação de tratamento adjuvante, como quimioterapia. Os que se encontram em tratamento paliativo (estádio IV), é comum a utilização de quimioterápicos para o aumento da sobrevida do paciente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2011; HADDADIN; PAPAGEORGIO, 2012).

Responsável por causar grande impacto sobre a divisão das células tumorais, os quimioterápicos causam efeitos colaterais conforme a dose utilizada, estado clínico do paciente e via de administração. Dentre eles, destacam-se náuseas, vômitos, mucosite e diarreia, capazes de afetar a condição nutricional do paciente, equilíbrio hidroeletrolítico e sua qualidade de vida. Além disso, toxidades hematológicas como anemia, leucopenia e neutropenia também podem surgir, sendo considerados motivos de interrupção do tratamento por um período, fazendo com que este perdure por mais tempo do que o previsto (GOLKHALKHALI et al., 2018).

Associado ao tratamento convencional, estudos têm demonstrado benefícios com probióticos com o propósito de restaurar a microbiota intestinal, atuando em mecanismos celulares e moleculares (MIQUEL et al., 2013) e em extensas regiões do intestino, objetivando a restauração da homeostase (MASOOD et al., 2011; GOLKHALKHALI et al., 2018), reduzindo a população de bactérias associadas às doenças colônicas (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013), inibindo enzimas pró-carcinogênicas ou estimulando o sistema imunológico do hospedeiro (UCCELLO et al., 2012), além de promover a redução de efeitos colaterais causados pelo tratamento antineoplásico (LEVIT et al., 2018).

2

Microbiota Intestinal

A microbiota intestinal em mamíferos, representa o sítio ecológico na Terra com maior densidade de bactérias. Sendo considerado um complexo ecossistema, fornece estímulo primário para o estabelecimento de uma barreira adequada da mucosa e maturação de um sistema imune pós-natal equilibrado (JENMALM.; PRESCOTT, 2017).

O sistema digestório é o local de maior densidade e diversidade de comunidades bacterianas, composto pela microbiota intestinal, que exerce enorme impacto sobre a função e saúde do organismo humano como um todo (FIOCCHI; SOUZA, 2012). A colonização de bactérias do sistema digestório começa no nascimento e ao longo da vida vai sendo modificada por fatores genéticos, contato com o ambiente, dieta e presença de doenças (BEDANI; ROSSI, 2009; AZIZ et al., 2013).

O trato gastrointestinal (TGI) de um adulto humano é o lar de um ecossistema único, constituído por 400 a 1000 espécies de microrganismos heterogêneos (NOVERR; HUFFNAGLE, 2004; AZIZ et al., 2013). Composto por aproximadamente 10 trilhões de células microbianas, possui uma microbiota intestinal que pesa aproximadamente 2% do peso corporal, estimando que sua capacidade gênica seja até 150 vezes maior que a do ser humano (URSEL et al., 2012).

A composição e concentrações de espécies microbianas dominantes também diferem de acordo com as regiões do trato digestório, sendo de predominância, com 64% dos filos Firmicutes e 23% Bacteroidetes. O restante encontra-se distribuído entre os filos Proteobacteria e Actinobacteria, apresentando variações entre as proporções e espécies (MADIGAN et al., 2006).

Em função da ação dos ácidos, bile e secreções pancreáticas que não permitem uma maior colonização, o estômago e o duodeno possuem uma menor concentração em sua microbiota, com 10^1 a 10^3 bactérias por grama de conteúdo de estômago e duodeno. Com o distanciamento destes locais, a densidade de bactérias aumenta, progredindo para 10^4 a 10^7 bactérias por grama de conteúdo de jejuno e íleo, alcançando 10^{11} a 10^{12} células por grama de conteúdo de cólon, ou seja, 10 a 100 vezes mais bactérias do que as próprias células humanas (O'HARA; SHANAHAN, 2006).

Há diferenciação também em relação à utilização de oxigênio para obtenção de energia, ou seja, quanto mais próximo ao intestino grosso, maior a presença de bactérias anaeróbias,

no qual a energia (ATP) é obtida através do processo de fermentação. Assim como, quanto mais distante, próximo ao estômago, maior a presença de bactérias aeróbias (PRAKASH et al., 2011).

A microbiota intestinal exerce enorme impacto sobre a função e saúde do organismo humano como um todo, interagindo com o sistema imune, resistindo a agentes infecciosos, impedindo a estruturação de resposta alérgica e translocação de patógenos. Age como barreira, sintetizando citocinas pelas células imunes da mucosa intestinal, aumentando a resposta inata (FIOCCHI; SOUZA, 2012; LEITE et al., 2014). Uma de suas principais funções é o aproveitamento de energia a partir de componentes da dieta, como os polissacarídeos não digeridos no cólon, que são metabolizados por microrganismos resultando em vários produtos, dentre eles, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (MILES, 2007; BEDANI; ROSSI, 2009).

Os AGCC diminuem o pH do intestino grosso, criando um ambiente que impede o crescimento de bactérias nocivas. Além disso, aumentam o fluxo de sangue para o cólon e fornecem às células da parede do intestino, combustíveis metabólicos, principalmente sob a forma de ácido butírico (MILES, 2007; BEDANI; ROSSI, 2009). Este, quando oxidado, fornece cerca de 70% de energia para células epiteliais colônicas, além de atuar como fator trófico para células em tecidos intactos (HAMER et al., 2008); possui atividade anti-inflamatória, suprimindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B); e reduz o risco de câncer de cólon devido a sua habilidade em inibir a atividade genotóxica das nitrosaminas e do peróxido de hidrogênio, além de induzir diferentes níveis de apoptose, diferenciação e estagnação do ciclo celular no câncer de cólon observados em estudos utilizando modelos de animais (HOPE et al., 2005; HAMER et al., 2008; LEONEL; ALVAREZ-LEITE, 2012).

Outra função da microbiota intestinal está relacionada à maturação, indução, ativação e condicionamento do sistema imunológico (CASTELLARIN et al., 2012), abrangendo mais da metade das células imunologicamente ativas do organismo (KOSTIC et al., 2012). Em estudos com animais desprovidos de microrganismos (*germ free*), foi observada uma menor produção e atuação do sistema imune (principalmente das células B, T e CD4+). No entanto, quando inoculados com microrganismos, houve restauração da função imunológica (KOSTIC et al., 2012). Esse fato demonstra que os microrganismos fazem conexões complexas e abundantes com o epitélio intestinal e sistema imunológico, rompendo as células epiteliais do intestino, no qual as células do sistema imune inato são as primeiras a responder a essa injuria (OLIVEIRA; AARESTRUP, 2012; AZIZ et al., 2013).

Disbiose e Câncer Colorretal

O conceito de disbiose está relacionado ao desequilíbrio microbiano que pode ocorrer quando o ecossistema do sistema digestório se encontra alterado. Diversas bactérias oportunistas aumentam sua população podendo causar doenças (MIQUEL, 2013), inclusive o câncer colorretal (CCR) (DJALDETTI; BESSLER, 2017).

Embora não esteja totalmente esclarecido se a disbiose é uma causa ou uma consequência da doença intestinal, esse tipo de alteração é um fato comum em pacientes que são portadores de doenças inflamatórias intestinais (DII), no qual a proporção de Firmicutes, principalmente *Faecalibacterium prausnitzii*, encontra-se baixa (MIQUEL, 2013).

A inflamação crônica altera a composição da microbiota intestinal, aumentando o potencial genotóxico. Essa situação passa a refletir uma forte correlação entre a microbiota, sistema imunológico e o desenvolvimento do câncer colorretal (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; DJALDETTI; BESSLER, 2017). O aumento de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Streptococcus faecallis*, *Proteus* (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010) e *Fusobacterium nucleatum* (TOVEY et al., 2011; CASTELLARIN et al., 2012; KOSTIC et al., 2012), é considerado um dos fatores relacionados à formação do câncer colorretal (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010) pela capacidade de facilitar a evolução de processos inflamatórios, promovendo a ativação de componentes carcinogênicos e a produção de compostos mutagênicos (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; OLIVEIRA; AARESTRUP, 2012; AZIZ, et al., 2013; DEL COCO, 2015).

Uso de Probióticos na Terapia do Câncer Colorretal

De origem grega, a palavra probiótico significa “para a vida” (HILL et al., 2014) e foi sugerida pela primeira vez, a partir das observações de Metchnikoff, em 1907, correlacionando a utilização de leites fermentados com a prevenção e tratamento de doenças intestinais (DOSTA et al., 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP), definem probióticos como sendo microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (animais e seres humanos). Porém, sua eficácia é rigorosamente dependente da quantidade e características das cepas de microrganismos utilizados (HILL et al., 2014).

Os probióticos também podem ser definidos como ingredientes seletivamente fermentados, que possibilitam a ocorrência de alterações específicas, tanto na composição, quanto na atividade da microbiota intestinal, proporcionando benefícios para a saúde e bem estar dos indivíduos que os consomem. Metabolizados pela microbiota nativa de determinados órgãos, são capazes de darem origem à proliferação de determinadas espécies bacterianas e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Além dessas capacidades, diferentes tipos de probióticos possuem efeitos distintos sobre o sistema imunológico (FREI; AKDIS; O’MAHONY, 2015).

A grande quantidade de cepas, dosagens, esquemas de administração e variadas combinações, torna complexa a utilização de probióticos na prática clínica (FAINTUCH; FAINTUCH, 2017). Devido a essa complexidade, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

liberou a comercialização de algumas espécies bacterianas utilizadas como alimentos com alegações de propriedades funcionais. As que possuem efeito probiótico cientificamente comprovado são os *Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhanosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*. E para que possa ser considerado como promotor de saúde, a quantidade mínima viável da cultura deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por porção do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Ao ingerir probióticos, as bactérias saudáveis que sobrevivem às secreções digestivas, chegam ao intestino grosso capazes de colonizar este ambiente, favorecendo o equilíbrio microbiano (MILES, 2007), diminuindo a população de bactérias associadas a doenças colônicas (BEDANI; ROSSI, 2009).

Através de sua propriedade de resistência contra patógenos invasores, os probióticos competem com bactérias patogênicas por sítios de adesão aos receptores epiteliais de nutrientes e produzem substâncias antimicrobianas, como o ácido láctico e outros ácidos de cadeia curta, tais como peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (MILES, 2007; DOSTA et al., 2009; DEL COCO, 2015). As bacteriocinas são substâncias peptíticas com atividades antimicrobianas produzidas por síntese ribossomal, segregadas por um grande número de bactérias para inibir o crescimento de microrganismos competidores (CHEN; HUANG, 2009; DOSTA et al., 2009).

Além de diminuir as bactérias associadas às doenças colônicas (BEDANI; ROSSI, 2009), os probióticos possuem mecanismos que inibem a formação de tumores de colorretal (GOURBEYERE; DENERY; BODINIER, 2011; SERBAN, 2014).

Mecanismos Probióticos na Prevenção do Câncer Colorretal

Apesar de todos os mecanismos pelos quais os probióticos atuam na prevenção do CCR não serem totalmente elucidados, tudo indica que esse processo está relacionado com a modificação da composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal, pela ligação e degradação de componentes carcinogênicos no lúmen intestinal (GOURBEYERE; DENERY; BODINIER, 2011; UCCELLO et al., 2012).

A microbiota modificada produz componentes com atividade anti-carcinogênica como AGCC e ácido linoleico conjugado (CLA); através da melhora de sua integridade, dificultam a proliferação celular e induzem apoptose em células cancerígenas (SERBAN, 2014), aumentando a expressão da Bax, proteína pró-apoptótica, e diminuindo a expressão da Bcl2, proteína anti-apoptótica, inibindo o crescimento celular (CHEN et al., 2017).

Estudos com probióticos também têm sido realizados no intuito de comprovar sua eficácia no sistema imune (ERDRICH et al., 2015). Observou-se que quando administrados por via oral, podem interagir com a mucosa do trato digestório, com as células epiteliais do intestino, células

dendríticas e macrófagos; inclusive com o tecido linfóide do intestino, onde estão localizadas mais de 70% das células imunológica (KANG; IM, 2015).

Considerações Finais

Com tantas propriedades, os probióticos têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores com o intuito de compreender a sua ação na microbiota intestinal, auxiliando na prevenção e tratamento do câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos:** 9^a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Jul. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em: 12 nov. 2015.

ARAUJO, C. A. **Baixas doses de 5-fluorouracil aumentam a atividade antitumoral de células dendríticas transfetadas com RNA de células de câncer colorretal.** 2013. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104552>>. Acesso em: 17 out. 2015.

AZIZ, Q. ; DORÉ, J. ; EMMANUEL, A. ; GUARNER, F. ; QUIGLEY, E.M. Q. et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterol Motil**, v. 25, n. 1, p. 4-15, 2013. doi: 10.1111/nmo.12046

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastroenterologia**, Lisboa, v.16, n. 1, p. 19-28, nov. 2009.

CASTELLARIN, M.; WARREN, R.L.; FREEMAN, D.J.; DREOLINI, L.; KRZYWINSKI, M.; STRAUSS, J.; BARNES, R.; WATSON, P.; ALLEN-VERCOE, E.; MOORE, R.A.; HOLT, E.A. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. **Genome Research**, v. 22, n. 2, p. 299-306, 2012. doi: 10.1101/gr.126516.111

CHEN, J.; HUANG, X. F. Activation of p53 for the treatment of cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.107, n.4, p. 567-8, 2009. doi: 10.1002/jcb.22187

CHEN, Z.Y.; HSIEH, Y.M.; HUANG, C.C.; TSAI, C.C. Inhibitory effects of probiotic lactobacillus on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. **Molecules**, v. 22, n.1, p.107, 2017, doi: 10.3390 / molecules22010107

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n.1, jan./mar. 2010. doi: 10.1590/S0004-28032010000100016

DEL COCO, V. F. Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 3, p. 171–3, jul./set., 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000917>>. Acesso em: 17 out. 2015.
doi: 10.1016/j.ram.2015.08.001

DJALDETTI, H.; BESSLER, H. Probiotic strains modulate cytokine production and the immune interplay between human peripheral blood mononuclear cells and colon cancer cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 3, 2017. doi: 10.1093/femsle/fnx014.

DOSTA, M.D.C.M.; BARRERA, T.C.; PERRINO, F.J.F.; REYES, L.M. Revisión bibliográfica: bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contactos: Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería**, v. 3, n. 73, p. 63–72, jul./set. 2009.

DUNCAN, B.B.; CHOR, D.; AQUINO, E.M.L.; BENSENOR, I.M.; MILL, J.G.; SCHIMIDT, M. I.; LOTUFO, P.A.; VIGO, A.; BARRETO, S.M. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, supl., p.126-34, 2012. doi: 10.1590/S003489102012000700017

ERDRICH, J.; ZHANG, X.; GIOVANNUCCI, E.; WILLETT, W. Proportion of colon cancer attributable to lifestyle in a cohort of US women. **Cancer Causes & Control**, v. 26, n. 9, p.1271-9, 2015. doi: 10.1007/s10552-015-0619-z

FAINTUCH, J.; FAINTUCH, J. J. O conceito de disbiose: considerações quantitativas e qualitativas sobre a microbiota. In: FAINTUCH, J. **Microbiota, disbiose, probióticos e bacterioterapia**. Barueri, SP: Manole, 2017. Cap. 4.

FIOCCHI, C.; SOUZA, H. S. P. Microbiota intestinal: sua importância e função intestinal. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.100, n. 3. p. 30-8, jul./ago., 2012.

FONSECA, L.M.; QUITES, L.V.; CABRAL, M.M.D.A.; SILVA, R.G.; LUZ, M.M.P.; LACERDA, F.A. Câncer colorretal: resultados da avaliação patológica padronizada de 521 casos operados no Hospital das Clínicas da UFMG. **Revista brasileira de Coloproctologia**, v. 3, n. 1, p. 17-25, jan./mar., 2011. doi: 10.1590/S0101-98802011000100003. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/rbc/v31n1/v31n1a03.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

FREI, R.; AKDIS, M.; O'MAHONY, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, v. 2, p. 153-158., mar., 2015. doi: 10.1097/MOG.0000000000000151.

GOLKHALKHALI, B; PALIANY, A.S.; QUEIXO, K.F.; RAJANDRAM, R. The roles of adjuvant supplements in colorectal cancer patients on chemotherapy: reaping benefits from metabolic crosstalk. **Nutrition and Cancer**, v. 70, n. 2, p.184-91, 2018. doi: 10.1080/01635581.2018.1412470

GOURBEYERE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M. Probiotic, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 5, p. 685-95, 2011. doi: 10.1189/jlb.1109753

GUPTA, B.; DAS, P.; GHOSH, S.; MANHAS, J.; SEM, S.; PAL, S.; SAHNI, P.; A.D. UPADHYAY; PANDA, S.K.; GUPTA, S.D._Identification of high-risk aberrant crypt foci and mucin-depleted foci in the human colon with study of colon cancer stem cell markers. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 16, n. 3, p. 204-13, 2017. doi: 10.1016/j.clcc.2016.09.001

HADDADIN, S.; PAPAGEORGIO, C. Gastrointestinal cancer. In: PERRY, M. C. **The chemotherapy source book**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. v. 33, p. 450-3.

HAMER, H.M. ; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104-119, jan. 2008.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39-51, 2013. doi: 10.1177/1756283X12459294

COLINA, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, G.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, n. 11, p. 506-14, 2014.

ESPERO, M.E.; SEGURE, G.L.; KAIN, R.; EL-OMAR, E.M. Sporadic colorectal cancer: role of the commensal microbiota. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n.1, p. 1-7, mar. 2005. doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.029

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estadiamento**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54> Acesso em: 18 out. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf> Acesso em: 18 out. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 10 maio 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Tomorrow**. Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages. 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0>. Acesso em: 18 ago. 2015.

JENMALM, M. C.; PRESCOTT, S. L. The intestinal microbiota and the child's immune system. In: BROWNE, P. D.; CLAASSEN, E.; CABANA, M. D. **Microbiota in health and disease: from pregnancy to childhood**. 1^a Ed. Wageningen: Wageningen academic publishers. 2017. p. 121-139.

JONES-MCLEAN, E.; HU, J.; GREENE-FINESTONE, L.S.; GRO, M. A DASH dietary pattern and the risk of colorectal cancer in Canadian adults. **Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada: Research, Policy and Practice**, v. 35, n.1, p.12- 20, 2015. doi: 10.1155/2012/472396.

KANG, H. J; IM, S. H. Probiotics as an immune modulator. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 61, n. 1, p. 103-105, 2015. doi: 10.3177/jnsv.61.S103 .

KOSTIC, A.D.; GEVERS, D.; PEDAMALLU, C.S.; MICHAUD, M.; DUQUE, F.; EARL, A.M.; OJESINA; A.I.; JUNG, J.; BAIXO, A.J.; TABERNERO, J.; BASELGA, J.; LIU, C.; SHIVDASANI, R.A.; OGINO, S.; BIRREN, B.W.; HUTTENHOWER, C.; GARRETT, W.S.; MEYERSON, M. Genomic analysis identifies association of fusobacterium with colorectal carcinoma. **Genome Research**, v. 22, n. 2, p. 292-8, 2012. doi: 10.1101/gr.126573.111.

LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Papel da microbiota na manutenção da fisiologia gastrointestinal: uma revisão da literatura. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 54-61, abr./jun. 2014.

LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Butyrate: implications for intestinal function. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 15, n. 5, p. 474-9, jul. 2012. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835665fa.

LEVIT R.; SAVOY DE GIORI, G.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J.G._Protective effect of the riboflavin-overproducing strain Lactobacillus plantarum CRL2130 on intestinal mucositis in mice. **Nutrition**, n. 54, p.165-72, 2018. doi: 10.1016/j.nut.2018.03.056.

MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; BROCK, T.D. Brock Biology of Microorganisms. In: Madigan, T. M. et al. **Microbial Symbioses**, 13. Ed. Pearson, 2006. p. 766-823.

MASOOD, M.I.; QADIR, M.I.; SHIRAZI, J.H., KHAN, I.U. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 91–8, 2011. doi: 10.3109/1040841X.2010.536522

MILES, L. Are probiotics beneficial for health? **Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 2–5, 2007. doi: 10.1111/j.1467-3010.2007.00611.x

MIQUEL, S.; MARTIN, R.; ROSSI, S.; BERMUDEZ-HUMARÁN, L.G.; CHATEL, J.M.; SOKOL, H.; THOMAS, H.; WELLS, J.M.; LANGELLA, P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, n. 3, p. 255-61, 2013. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiology**, v. 12, n.12, p. 562-568, 2004. doi: 10.1016/j.tim.2004.10.008

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO Reports**, v. 7, n. 7, p. 688-93, 2006. doi: 10.1038/sj.embo.7400731

OLIVEIRA, A. L.; AARESTRUP, F. M. Avaliação nutricional e atividade inflamatória sistêmica de pacientes com câncer colorretal submetidos à suplementação com simbótico. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 25, n. 3, p. 147-153, 2012. doi: 10.1590/S0102-67202012000300003.

PRAKASH, S.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; CANTOR, U.M.A. The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol. 2011, p. 1, 2011. doi: 10.1155/2011/981214.

RODRIGUES, L. A.; LIGEIRO, C.; SILVA, M. Cuidados paliativos, diagnósticos e terminalidade: indicação e início do processo de palação. **CuidArte Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 1-102, jan./jun. 2015.

ROEDIGER, W. E. W. Câncer de cólon, reto e ânus. In: LOVE, R. R. **Manual de oncologia clínica**. 6. ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1999. Cap. 22, p. 347-359.

ROSSI, B. M.; FERREIRA, F.O.; AGUIAR JUNIOR, S. et al. Câncer colorretal. In: SANTOS, C. E. R.; MELLO, E. L. R. **Manual de cirurgia oncológica**. 1 ed. São Paulo: Tecmedd, 2006. Cap. 17, p. 293-304.

SERBAN, D. E. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer Letters**, 345, p. 258–70, 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.013

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. Câncer de cólon: tratamento quimioterápico. **Projeto diretrizes**: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, jan., 2011. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer_de_colon-tratamento_quimioterapico.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2015.

TOVEY, M.; RIZVI, F.A.; RAMAN, S.; WHEATLEY, K.E. Rectal cancer presenting as *Fusobacterium nucleatum* pyogenic liver abscess: a case report. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 2, n. 6, p.16-9, 2011. doi:10.5348/ijcri-2011-06-39-CR-4

UCCELLO, M.; MALAGUARNERA, G.; BASILE, F.; D'AGATA, V.; MALAGUARNERA, M.; BERTINO, G.; VACANTE, M.; DRAGO, F.; BIONDI, A. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**, v. 12, supl. 1, p. S35, 2012. doi: 10.1186 / 1471-2482-12-S1-S35

URSELL, L.K.; METCALF, J.L.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. Defining the human microbiome. **Nutrition Reviews**, v.70, n.13, p.838-44, ago. 2012. doi: 10.1111 / j.1753-4887.2012.00493.x

ZHU, B.; SUN, Y.; QI, L.; ZHONG, R.; MIAO, X. Dietary legume consumption reduces risk of colorectal cancer: evidence from a meta-analysis of cohort studies. **Scientific Reports**, v. 5, mar. 2015. doi: 10.1038/srep08797

Quadro 1: Procedimentos para avaliação das categorias do Sistema T, N e M

Categorias T	Exame físico, diagnóstico por imagem, endoscópica e/ou exploração cirúrgica.
Categorias N	Exame físico, diagnóstico por imagem e/ou exploração cirúrgica.
Categorias M	Exame físico, diagnóstico por imagem e/ou exploração cirúrgica.

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2004.

Quadro 2: Sistema TNM – Classificação Clínica

T – Tumor Primário	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos pericólicos ou perirretais, não peritonizados
T4	Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral
N – Linfonodos Regionais	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
M – Metástase à distância	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2004.

Quadro 3: Grupamento por Estadios do Sistema TNM

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1, T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T3, T4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2004.

2 ARTIGO B

Suplementação com probiótico ameniza a agressividade do tumor colorretal induzido quimicamente em ratos

Sandra Cristina Genaro M.^a a,b,2¹; Luis Souza Lima de Souza Reis Dr., Ph.D. a,d, 2; Sabrina Karen Reis M.^a c,3; Eduardo Augusto Rabelo Socca Dr.c,4; Wagner José Fávaro Dr., Ph.D.c,5

a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil.

b Faculdade de Nutrição, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil.

c Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

d Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Conflitos de interesse: Nenhum.

²Autor correspondente: Tel.: +55 18 99601-0705

Endereço de e-mail: sandragenaro@gmail.com (S. C. Genaro), luisreis@unoeste.br (L. S. L. S. Reis, reis.sabrinakaren@gmail.com (S. K. Reis), eduardo_socca@yahoo.com.br (E. A. R. Socca), wjfavaro@gmail.com (W. J. Fávaro)

RESUMO

Objetivos: Avaliar o efeito de um probiótico na agressividade do tumor colorretal induzido quimicamente em ratos.

Métodos: Vinte e cinco ratos machos Fisher 344, 250 g, recebendo ração e água *ad libitum*, distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (5 ratos/grupo): G_{Controle}, sem tratamento; G_{Tumor}, indução do tumor; G_{Tumor+5FU}, indução do tumor, aplicado 5-Fluorouracil; G_{Tumor+Prob}, indução do tumor, suplementado com probiótico; G_{Tumor+5-FU+Prob}, indução do tumor, aplicado 5-Fluorouracil, suplementado com probiótico. Para indução do tumor utilizou-se 20 mg/kg de 1,2-dimetilhidrazina, intraperitoneal durante quatro semanas, intervalo 15 dias e repetido por 4 semanas. Iniciou-se após 5 semanas da última dose do carcinógeno, o tratamento com 5-Fluorouracil (15 mg/kg, intraperitoneal/semana) e probiótico comercial (1×10^9 UFC, diariamente/gavagem). Dados analisados pela Análise de Variância One Way e médias comparadas pelo teste de Dunnett. Utilizado software estatístico GraphPad Prism. As análises histopatológicas avaliadas pelo teste de proporção Qui-quadrado. Considerado erro tipo-I de 5% como estatisticamente significante.

Resultados: Comparados com o G_{Tumor}, o G_{Tumor+Prob} ($p < 0,0373$) e G_{Tumor+5-FU+Prob} ($p < 0,0003$) exibiram efeito atenuante na agressividade do tumor colorretal observando redução na contagem de Focos de Criptas Aberrantes; e menor porcentagem de lesões neoplásicas malignas no GTumor+Prob (40% de adenoma tubular de baixo grau, 40% de carcinoma *in situ*, 20% de adenocarcinoma de baixo grau) e GTumor+5-FU+Prob (40% de adenoma tubular de baixo grau e 60% de carcinoma *in situ*).

Conclusão: Suplementação com probiótico tem potencial para diminuir a formação de criptas aberrantes e amenizar a progressão da malignidade do tumor, potencializando o efeito antitumoral da quimioterapia com 5-Fluorouracil nos segmentos côlicos.

Palavras-chave: Câncer Colorretal. Alimento Funcional. Quimioterapia. Focos de Criptas Aberrantes. Microflora Intestinal.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the effect of a probiotic on the aggressiveness of a chemically induced colorectal tumor in rats.

Methods: Twenty-five male Fisher 344 rats, 250 g, provided with feed and water ad libitum, were randomly distributed into 5 groups (5 rats/group): $G_{Control}$, no treatment; G_{Tumor} , tumor induction; $G_{Tumor+5FU}$, tumor induction, 5-Fluorouracil applied; $G_{Tumor+Prob}$, induction of the tumor, supplemented with probiotic; $G_{Tumor+5-FU+Prob}$, tumor induction, 5-Fluorouracil applied, supplemented with probiotic. For tumor induction 20 mg/kg of 1,2-dimethylhydrazine was applied intraperitoneally over 4 weeks, followed by an interval of 15 days, and then repeated for a further 4 weeks. Five weeks after the final dose of the carcinogen, treatment was initiated with 5-Fluorouracil (15 mg/kg, intraperitoneally/week) and a commercial probiotic (1×10^9 CFU, daily/gavage). Data were analyzed by One Way Variance Analysis and means compared by Dunnett's test. GraphPad Prism statistical software was used. The histopathological analyzes were evaluated by the chi-square test. A 5% type-I error was considered statistically significant.

Results: Compared with the G_{Tumor} , the $G_{Tumor+Prob}$ ($p < 0.0373$) and $G_{Tumor+5-FU+Prob}$ ($p < 0.0003$) demonstrated an attenuated effect on the aggressiveness of the colorectal tumor, with a reduction in the count of Aberrant Crypt foci; and a lower percentage of malignant neoplastic lesions in the $G_{Tumor+Prob}$ (40% low grade tubular adenoma, 40% carcinoma *in situ*, 20% low grade adenocarcinoma) and $G_{Tumor+5-FU+Prob}$ (40% low grade tubular adenoma and 60% carcinoma *in situ*).

Conclusion: Probiotic supplementation has the potential to decrease the formation of aberrant crypts and ameliorate tumor malignancy, enhancing the antitumor effect of 5-Fluorouracil chemotherapy in colic segments.

Key-words: Colorectal cancer; Functional food; Chemotherapy; Aberrant Crypt Foci; Intestinal Microbiota.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é considerado como terceira causa de morte no mundo [1], apresentando aumento em sua incidência de 60% até 2030, podendo resultar em 1,1 milhões de mortes [2].

Os fatores de risco incluem história familiar, síndromes genéticas, doenças inflamatórias, medicamentos [3], excesso de peso corporal, baixo nível de atividade física, alimentação [3,4], bebida alcoólica e tabagismo [4]. Esses fatores alteram a microbiota intestinal favorecendo o crescimento de agentes patogênicos [5-8], os quais colonizam o ambiente e provocam uma resposta inflamatória local. Em casos crônicos, ativam componentes cancerígenos produzindo compostos mutagênicos [3,4,9] pela proliferação celular, apoptose e autofagia, causando falha no controle da renovação e reparação normal da mucosa [10].

No processo evolutivo do câncer colorretal, é possível notar anomalias nas criptas de Lieberkühn [6], as quais apresentam tamanho aumentado, células hipercromáticas, espessamento epitelial, maior espaço peri-críptico, núcleos alongados e estratificados e depleção de mucina, sendo denominadas como Focos de Criptas Aberrantes (FCA) [11]. FCA são importantes biomarcadores no diagnóstico do CCR, pois são as primeiras lesões pré-cancerosas que aparecem durante a carcinogênese [7], envolvidos na sequência adenoma-carcinoma [8].

Um dos tratamentos realizados para o câncer colorretal é a quimioterapia [12] e o 5-Fluorouracil (5-FU) é o antineoplásico amplamente utilizado, responsável por causar grande impacto na divisão das células tumorais [13], porém, devido aos diversos efeitos colaterais torna-se necessário interromper o tratamento por um período, perdurando por mais tempo do que o previsto [14].

Aliado ao tratamento convencional, a suplementação com probióticos pode ser considerada uma ferramenta para a manutenção e restauração da microbiota intestinal. Estudos têm demonstrado benefícios na restauração da homeostase [15,16], reduzindo a população de bactérias associadas às doenças colônicas [17], inibindo enzimas pró-carcinogênicas ou estimulando o sistema imunológico do hospedeiro [18]. Sua ação também promove a redução de efeitos colaterais causados pelo tratamento antineoplásico como diarreia, mucosites [19], dor neuropática [20,21], dentre outros.

É provável que a ação dos probióticos possa minimizar o desenvolvimento e a progressão do câncer colorretal pela imunomodulação,

modificando a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal; ligação e degradação de componentes carcinogênicos no lúmen intestinal; produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido linoleico conjugado (CLA), os quais possuem atividade anti-carcinogênica; inibição da proliferação celular e indução da apoptose em células cancerígenas [22-24]. Estudos com probióticos também demonstraram serem capazes de diminuir o número e o tamanho de criptas aberrantes em modelos experimentais com câncer de cólon induzidos [1,25-27], mesmo que ainda não esteja totalmente esclarecido como isto ocorre.

Considerando os aspectos apresentados, o objetivo principal desse estudo foi avaliar o efeito de um probiótico comercial contendo *Lactobacillus acidophilus* NCFM[□], *Lactobacillus paracasei* Lpc 37TM, *Bifidobacterium lactis* BR-04TM, *Bifidobacterium lactis* Bi-07TM e *Bifidobacterium bifidum* Bb-02TM, na agressividade do tumor colorretal em ratos, induzido quimicamente.

Métodos

O experimento seguiu os princípios éticos em pesquisa animal com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) / UNICAMP (protocolo número 4431-1) e UNOESTE (protocolo número 3052), seguindo os critérios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2013) [28] e em conformidade com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) [29].

Desenho experimental

Foram utilizados 25 ratos machos da linhagem Fisher F344, com 8 semanas de idade, peso corporal médio de 250,0 g. Todos foram alimentados com ração comercial (Nuvilab[®], Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*, mantidos em temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 55 ± 10%, ciclo de claro e escuro de 12/12 horas e exaustão contínua do ar. Após sete dias de adaptação às condições experimentais, distribuiu-se os ratos randomicamente em cinco grupos experimentais (n=5 animais por grupo): *G_{Controle}*, sem indução e tratamento; *G_{Tumor}*, com indução do tumor colorretal; *G_{Tumor+5-FU}*, indução do tumor colorretal e aplicação do quimioterápico; *G_{Tumor+Prob}*, indução do tumor colorretal e suplementação com probiótico; *G_{Tumor+5-FU+Prob}*, indução do tumor

colorretal, aplicação do quimioterápico e suplementado simultaneamente com probiótico.

Para indução da carcinogênese colorretal, foi utilizado o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) preparado imediatamente antes do uso. Foram solubilizados 20 mg do carcinógeno em 1 mL solução de NaCl 0,9% com 1,5% de EDTA e pH ajustado para 6,5 com solução de NaOH 1N quando necessário [30] e aplicados duas doses semanais, em dias alternados [31], por via intraperitoneal, durante quatro semanas consecutivas. Deve-se um intervalo de 15 dias e as aplicações de DMH foram repetidas por mais 4 semanas.

Após cinco semanas da última administração do DMH, iniciaram-se as administrações de probiótico e quimioterapia por 10 semanas consecutivas.

O protocolo da quimioterapia foi adaptado de Bose, Elyagoby, Wong (2014) [32], aplicando-se uma dose semanal de 15 mg/kg de 5-FU de peso corporal (Fauldfluor®, Libbs), por via intraperitoneal.

O probiótico utilizado no experimento foi o 20 bi® (Eurofarma, Brasil), cuja cápsula de 435 mg é composta por 2×10^{10} UFC de microorganismos probióticos: *Lactobacillus acidophilus* (NCFM®), *Lactobacillus paracasei* (Lpc 37TM), *Bifidobacterium lactis* (BR-04TM), *Bifidobacterium lactis* (Bi-07TM) e *Bifidobacterium bifidum* (Bb-02TM), estabilizante celulose microcristalina e antiumectante dióxido de silício, o qual foi diluído em soro fisiológico para atingir a quantidade de 1×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e administrados diariamente por gavagem, durante 10 semanas consecutivas [33].

Eutanásia e colheita do cólon dos ratos

Os ratos foram mortos na 16ª semana após a última aplicação de DMH com intoxicação por barbitúrico aplicando a dose de 100 mg de thiopental sódico/Kg de peso corporal [28] e após a comprovação por ausência de batimentos cardíacos, foi realizada a laparotomia.

Detecção de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Logo após a morte, o cólon dos ratos foi ressecado, aberto longitudinalmente, lavado com solução fisiológica e estendido em papel tipo “craft”, para avaliação macroscópica da presença de alterações na superfície da mucosa.

Posteriormente, o cólon foi subdividido em três segmentos com tamanhos iguais, denominados segmentos proximal, médio e distal em relação ao ceco, que foram fixados em placas de parafina, por alfinetes, na parte superior da placa com a mucosa voltada para cima, fixados em solução de formalina 10% por 24 horas, seguido por lavagem com etanol a 70% para remoção do fixador e imergidos em solução de azul de metileno a 0,2% durante 10 minutos, seguido de lavagem em soro fisiológico para retirada de excesso do corante [34].

Imediatamente, após a coloração dos segmentos do cólon, foram observados e contados os focos de criptas aberrantes (FCA) com uso da microscopia óptica (Leica DM 2500M, acoplado com câmera Leica DFC 295, Munique, Alemanha) com magnitude de 100x. Para diferenciá-los de pólipos colônicos, estabeleceu-se características descritas na literatura como diâmetro maior que a mucosa circundante, revestimento epitelial mais espesso, lúmen dilatado ou uma aparência ligeiramente aumentada, apresentando uma altura menor do que 2 mm [35].

Análise Histopatológica

O tecido cólico de cada animal foi submetido a lavagens sequenciais em

etanol 70% para retirada do corante azul de metileno. Após completa remoção do corante, os tecidos foram processados em lavagens sequenciais de álcoois para desidratação, seguidos de lavagens em xilol por duas horas para serem diafanizados e por fim foram inclusos em polímero plástico (Paraplast Plus® Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os materiais foram seccionados em micrótomo (Microtome CUT5062 SLEE MAINZ, Munique, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros (μm) e corados com hematoxilina e eosina (HE), para avaliação histopatológica.

A leitura das lâminas foi realizada com fotomicroscópio óptico (Leica DM 2500M com câmera Leica DFC 295 acoplada), em magnitudes de 100x e 400x para identificação das lesões neoplásicas.

Análise estatística

Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de *Shapiro-Wilk*,

assim, foram analisados pela Análise de Variância *One Way* e as médias comparadas pelo teste de *Dunnett* utilizando o software estatístico *GraphPad Prism*. Em todas as análises considerou-se a significância de 5%. As análises histopatológicas foram avaliadas através do teste de proporção Qui-quadrado. Para essas análises, erro tipol de 5% foi considerado estatisticamente significante.

Resultados

O G_{Controle} foi utilizado como padrão normal para comparação de Criptas de Lieberkün, composto por inúmeras criptas de Lieberkün, não apresentando FCA no tecido cólico dos ratos (Figura 1 e Figura 2a, 2b, 2c) e diferindo significativamente dos demais grupos, os quais passaram pelo mesmo período de maturação do processo tumoral e apresentaram lesões, indicando que o protocolo utilizado foi capaz de desenvolver FCA.

A contagem de FCA nos seguimentos proximal, médio e distal foi maior em G_{Tumor} (39) quando comparados com G_{Tumor + Prob} (32) ($p < 0,0033$), G_{Tumor + 5-FU} (30) ($p < 0,0373$) e G_{Tumor+5-Fu+Prob} (23) ($p < 0,0003$), como demonstrado na Figura 1.

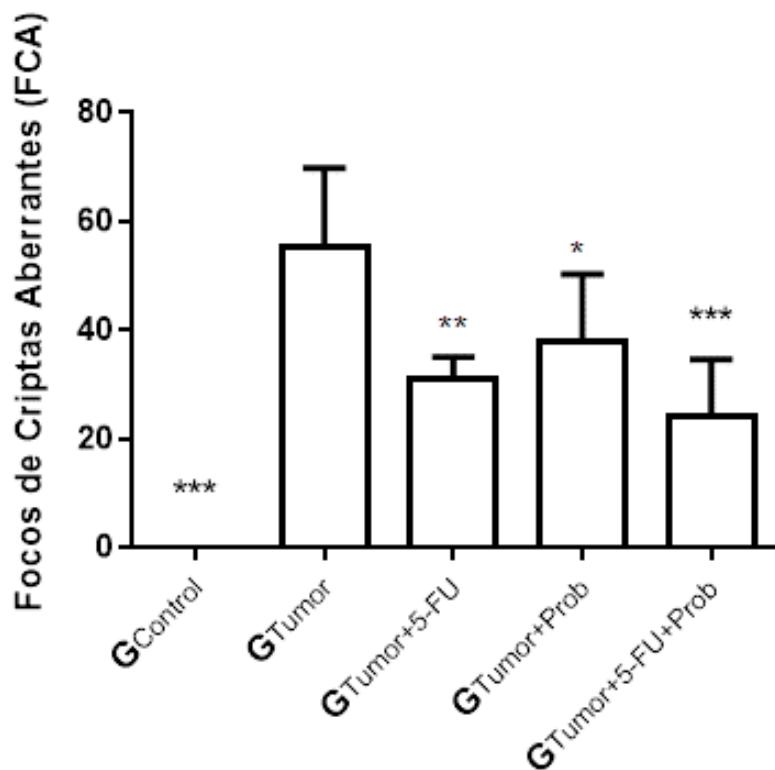


Figura 1- Contagem de Focos de Criptas Aberrantes (FCA).

* $p < 0,0373$. ** $p < 0,0033$, *** $p < 0,0003$ Anova
one way seguida de teste de Dunnet

A figura 2 ilustra os FCA detectados nas partes proximal, médio e distal do cólon dos ratos do G_{Tumor}, G_{Tumor+5-Fu} e G_{Tumor+Prob} e nas partes médio e distal em G_{Tumor+5-Fu+Prob}, identificados através de suas características peculiares

como células com maior intensidade de coloração, tamanho aumentado, espessamento epitelial, apresentando borda alargada [35].

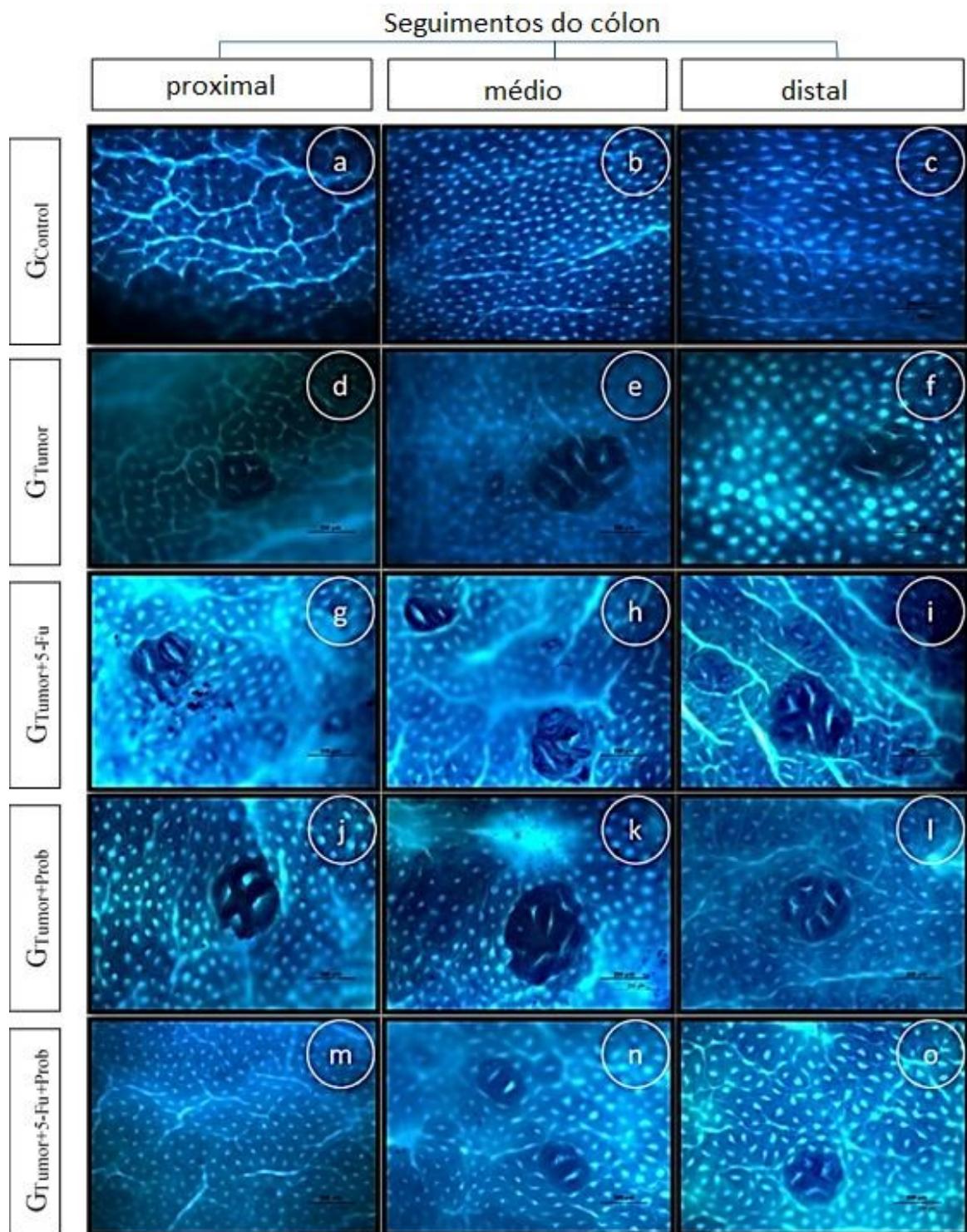


Figura 2- Focos de Criptas Aberrantes (FCA). Após laparotomia, o cólon dos ratos foi fixado em formalina tamponada por 24 horas e, em sequência, corados com azul de metileno 0,2%. Os segmentos côlicos proximal, médio e distal, de cada grupo está representado na figura acima. Em a, b, c observa-se o segmento proximal, médio e distal, respectivamente, dos animais sadios. Em d, e, f observa-se o segmento proximal, médio e distal dos animais induzidos com DMH e não tratados. Em g, h, i observa-se o segmento proximal, médio e distal, respectivamente, dos animais induzidos com DMH e tratados com 5-FU. Em j, k, l observa-se o segmento proximal, médio e distal, respectivamente, dos animais induzidos com DMH e tratados com probiótico. Em m, n, o observa-se os animais induzidos com DMH e tratados com 5-FU e Probiótico. Magnitude 100x.

A histopatologia dos tecidos côlicos é ilustrada pela Figura 3 e o $G_{Controle}$, foi utilizado como padrão normal para comparação dos tecidos histológicos, apresentando padrão histológico normal para comparação dos demais grupos experimentais, com ausência de neoplasia, em que se nota a camada submucosa, composta por tecido conjuntivo fibroelástico e a camada muscular composta por fibras musculares circulares e longitudinais (Figuras 3A e 3B).

No G_{Tumor} é possível notar a interrupção da muscular da mucosa com invasão de células da camada mucosa na camada submucosa (seta), caracterizando um adenocarcinoma de baixo grau (Figura 3C). Nota-se a presença de carcinoma *in situ* em lesão polipoide (Figura 3D, 3E), com presença de células atípicas (asterisco) e aumento da concentração de tecido conjuntivo nas criptas de Lieberkün (asterisco).

No $G_{Tumor+5-FU}$, é possível observar (Figura 3F), projeção polipoide em sentido lúmen do órgão (asterisco) e (Figura 3G) aumento do volume celular na camada mucosa e alta concentração de atipias celulares (seta), comprometendo a arquitetura das criptas de Lieberkün, caracterizando focos de criptas atípicas (ponto).

O $G_{Tumor+Prob}$ é representado pelas figuras 3H, 3I, 3J. É possível observar

a presença de lesões intra-epiteliais com grande concentração de criptas de Lieberkün atípicas, evidenciando carcinoma *in situ* (seta) (Figura 3H). É ilustrado (Figura 3I) a formação de adenomas tubulares de baixo grau (asterisco), com aumento da população celular e aumento da frequência de atipias celulares (ponto) (Figura 3J).

As figuras 3K, 3L, 3M representam o $G_{Tumor+5-FU+Prob}$. É possível observar (Figura 3K) a presença de carcinoma *in situ* (seta). Observa-se (Figura 3L) a formação de adenoma tubular (asterisco) com aumento da frequência de criptas aberrantes (Figura 3M).

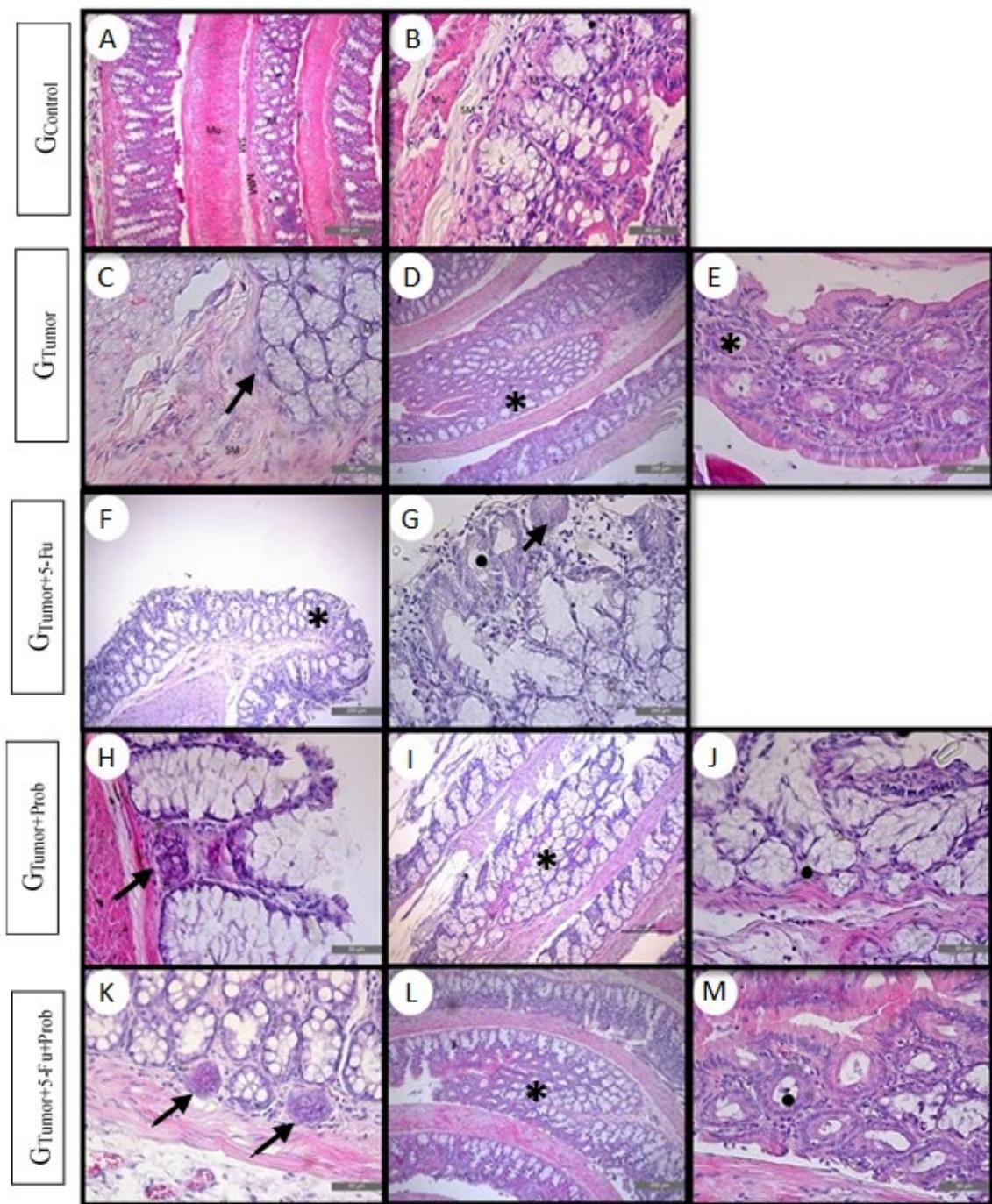


Figura 3- Avaliação histopatológica do cólon de ratos da linhagem Fisher 344. Em (A) e (B) é possível observar o tecido cólico de ratos sadios. Nesses cortes nota-se a arquitetura tecidual com o tecido epitelial (M) composto por inúmeras criptas de Lieberkün (c), a camada submucosa (SM) composta por tecido conjuntivo fibroelástico e a camada muscular (Mu) composta por fibras musculares circulares e longitudinais. G_{Tumor} (C): interrupção da camada muscular (mm) e células invasoras na camada submucosa (seta), caracterizando um adenocarcinoma de baixo grau; (D,E): células atípicas (asterisco) variadas (pleiomorfismo) e aumento da concentração de tecido conectivo nas criptas Lieberkün (ponto), caracterizando o carcinoma *in situ* em uma lesão de pólipos. $G_{Tumor+5-FU}$ (F,G): projeção de pólipos em direção ao lúmen do órgão (asterisco); O aumento do volume celular na mucosa e 1016 células altamente atípicas (seta) comprometeu a arquitetura das criptas Lieberkün, caracterizando um carcinoma *in situ* em uma lesão de pólipos (ponto). $G_{Tumor+Prob}$ (H): lesões intra-epiteliais e inúmeras criptas Lieberkün atípicas, indicando a formação de um carcinoma *in situ* (seta); e (I,J) formação de adenoma tubular de baixo grau (asterisco), com maior população celular e frequência de células atípicas (pontos). $G_{Tumor+Prob+5-FU}$ (K): Carcinoma *in situ* (seta); 1020 (L,M): adenoma tubular (asterisco) com aumento no número de criptas aberrantes (ponto). Lâminas coradas com HE. Magnitude: ACD/FIL, x100; BEGHJKM, x400.

A frequência de distribuição das análises histopatológicas está apresentada na Tabela 1. Os resultados demonstraram que a indução do CCR com DMH foi efetiva e levou à ocorrência de lesões neoplásicas como adenocarcinoma de baixo grau e carcinoma *in situ* em 60% e 40% dos animais do G_{Tumor} , respectivamente. Os animais do $G_{Tumor+5-Fu}$ apresentaram carcinoma *in situ* em 100% das lesões. Os grupos que utilizaram probiótico apresentaram eficácia em inibir a progressão tumoral, pois no $G_{Tumor+Prob}$, as lesões eram 40% adenoma tubular de baixo grau, 40% carcinoma *in situ* e 20% adenocarcinoma de baixo grau e no $G_{Tumor+5-FU+Prob}$, 40% de adenoma tubular de baixo grau e 60% de carcinoma *in situ*.

Tabela 1. Porcentagem de alterações histopatológicas.

Histopatologia	Grupos				
	$G_{Controle}$ (n=5)	G_{Tumor} (n=5)	$G_{Tumor+5-Fu}$ (n=5)	$G_{Tumor+Prob}$ (n=5)	$G_{Tumor+5-FU+Prob}$ (n=5)
Normal	5(100%)*	-	-	-	-
Adenoma Tubular	-	-	-	2(40%)*	2(40%)*
Carcinoma <i>in situ</i>	-	2(40%)	5(100%)*	2(40%)	3(60%)*
Adenocarcinoma de baixo grau	-	3(60%)*	-	1(20%)	-

*Significância estatística $p<0,0001$ (teste proporção Qui-quadrado).

Discussão

O câncer colorretal possui característica invasiva no epitélio glandular do cólon e do reto que se inicia com uma lesão precursora expansiva [36,37].

Atualmente há uma grande busca por alternativas que auxiliam no tratamento do câncer e os probióticos vêm ao longo do tempo, demonstrando mais do que a possibilidade de modular a microbiota intestinal [21]. Por ser de uso comprovadamente seguro, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de potencializar a ação de quimioterápicos no combate ao câncer, bem como atenuar efeitos colaterais que os tratamentos convencionais provocam [14], reforçando a hipótese de que também podem ser capazes de minimizar o desenvolvimento e a progressão do CCR, amenizando a agressividade do tumor.

O epitélio intestinal possui rápida renovação e sua homeostase é mantida pelo equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose [34]. No processo de formação do CCR no presente trabalho, foi possível observar por microscopia, pequenos aglomerados de criptas de Lieberkühn anormais, apresentando tamanho aumentado, espessamento epitelial, maior espaço peri-críptico, em tecidos cólicos de ratos expostos ao carcinógeno DMH. Essas criptas alteradas foram descritas inicialmente por Bird (1987) [38], como sendo focos de criptas aberrantes, as quais, posteriormente, foram relacionadas às lesões pré-neoplásicas precoces, por serem capazes de evoluir para adenoma precoce, adenoma avançado e finalmente, lesões neoplásicas malignas [39], sugerindo que a tradicional sequência adenoma-carcinoma na progressão tumoral do intestino grosso, passasse a ser denominada como FCAadenoma-carcinoma [34].

Todos os adenomas são considerados displásicos e possuem dois tipos

de classificação, a displasia de baixo grau (<25% de histologia vilosa) e displasia de alto grau (>25% de histologia vilosa) [40]. Os adenomas tubulares fazem parte da classificação de adenomas convencionais, os quais são compostos por glândulas displásicas apresentando criptas simples contendo menos de 25% de componente viloso [41], podendo sofrer alterações e adquirindo características malignas [42].

O carcinoma *in situ*, localiza-se na camada intraepitelial do cólon e do reto enquanto que o adenocarcinoma de baixo grau é definido pela invasão da camada muscular da mucosa, sem ultrapassá-la [41]. Ambos pertencem à categoria de displasia de alto grau devido ao seu baixo potencial de metástase, possuindo como protocolo de tratamento, a cirurgia com a retirada dos tumores e dos linfonodos regionais [43]. Se não detectados e tratados em tempo, podem apresentar capacidade de proliferação (metástase) em linfonodos locais ou órgãos distantes através de contínuas alterações genéticas, levando sua disseminação pela mucosa, envolvendo a parede colônica [42].

Apesar do mecanismo através do qual os probióticos possam inibir o desenvolvimento do CCR serem desconhecidos, supõe-se que mediante a modificação da composição e atividade metabólica da microbiota intestinal, ocorra ligação e degradação de compostos com potencial carcinogênico e produção de compostos antitumorigênicos ou antimutagênicos no cólon, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido linoleico conjugado (CLA); os quais participam do

processo de imunomodulação, melhora da integridade da barreira intestinal, dificultando a proliferação celular e induzindo apoptose em células cancerígenas [22,23].

Na literatura são encontradas inúmeras pesquisas experimentais, utilizando uma ou mais cepas probióticas, contendo diferentes dosagens, realizadas para investigar o efeito dos probióticos na redução da agressividade de lesões pré-cancerosas. Dentre esses estudos, Uccello et al. (2012) [18] constataram um efeito positivo na modulação do sistema imune, com melhora da integridade da mucosa intestinal, capaz ainda de inibir a proliferação celular. Irecta-Nájera et al. (2017) [39] mostraram que a administração preventiva de *Lactobacillus* ATCC 393 na dose de 10^6 UFC, administrados 2 vezes por semana, pode retardar o aparecimento de câncer de cólon induzidos em ratos, pela redução dos FCA. Chang et al. (2012) [44] demonstraram que o consumo de *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 diminuiu a incidência de FCA em ratos com tumor de cólon induzidos, na dose de 2×10^9 UFC, administrados 3 vezes por semana. Verma e Shukla (2013) [45], estudaram diferentes probióticos na dose de 10^9 UFC administrados diariamente em ratos, compararam seus efeitos protetores contra a carcinogênese do cólon induzido quimicamente e concluíram que os probióticos, *Lactobacillus GG* e *Lactobacillus acidophilus* podem ser utilizados como os melhores agentes profiláticos para a carcinogênese experimental do cólon. Em outro estudo utilizando probióticos, Asha e Devaraja Gayathri (2012) [30] induziram o CCR em ratos e os alimentaram com ração, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, na concentração de 2×10^8 UFC, isolados ou juntos com o quimioterápico Vincristina. Como resultado, observaram que o probiótico *Lactobacillus fermentum*, administrado com Vincristina, mostrou uma redução mais efetiva no número de FCA.

Partindo do pressuposto de que diferentes cepas probióticas, em dosagens distintas, são capazes de reduzir FCA, o presente estudo demonstrou o efeito atenuante na agressividade do tumor colorretal, utilizando um mix de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* NCFM®, *Lactobacillus paracasei* Lpc 37™, *Bifidobacterium lactis* BR-04™, *Bifidobacterium lactis* Bi-07™ e *Bifidobacterium bifidum* Bb-02™) na dose diária de 1×10^9 UFC. Esse efeito foi observado através da redução, tanto na contagem de FCA, como no processo evolutivo do tumor colorretal, apresentando uma menor porcentagem de lesões neoplásicas malignas

nos grupos que utilizaram a suplementação com probiótico. Portanto, novos estudos devem ser realizados nesta linha de pesquisa para melhores esclarecimentos dos mecanismos de atuação dos microrganismos probióticos sobre a amenização da formação de criptas aberrantes e na progressão da malignidade do tumor colorretal, bem como para comprovar a sua eficácia em seres humanos.

Conclusão

A suplementação com probiótico diminuiu o número de focos de criptas aberrantes, reduziu a progressão da malignidade do tumor e potencializou o efeito antitumoral da quimioterapia com 5-Fluorouracil nos segmentos cólicos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos Laboratórios NANOBIOSS/UNICAMP, ao INOMAT/ UNICAMP, programa NANOREG-MCTIC e ao Programa de Ciências da Cirurgia/ UNICAMP e Universidade do Oeste Paulista pelo financiamento e apoio e viabilidade da pesquisa.

Referências

- [1] Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoui-Jamali M, Prakash S. The potential of *Lactobacillus* probiotic treatments in colorectal cancer (CRC). *Cancer Research* 2017;77(13 Suppl):254. doi: 10.1158 / 1538-7445.AM2017-254
- [2] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram L, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683–91. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912
- [3] Jones-Mclean E, Hu J, Greene-Finstone LS, Gro M. A DASH dietary pattern and the risk of colorectal cancer in Canadian adults. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada: Research, Policy and Practice* 2015;35(1):12- 20.
- [4] Erdrich, J. Zhang X, Giovannucci E, Willett W. Proportion of colon cancer attributable to lifestyle in a cohort of US women. *Cancer Causes & Control* 2015;26(9):1271-9. doi: 10.1007/s10552-015-0619-z
- [5] Jahani-Sherafat S, Alebouyeh M, Moghim S, Ahmadi Amoli H, Ghasemian-Safaei H. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer: a review article. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2018;11(2):101-9.

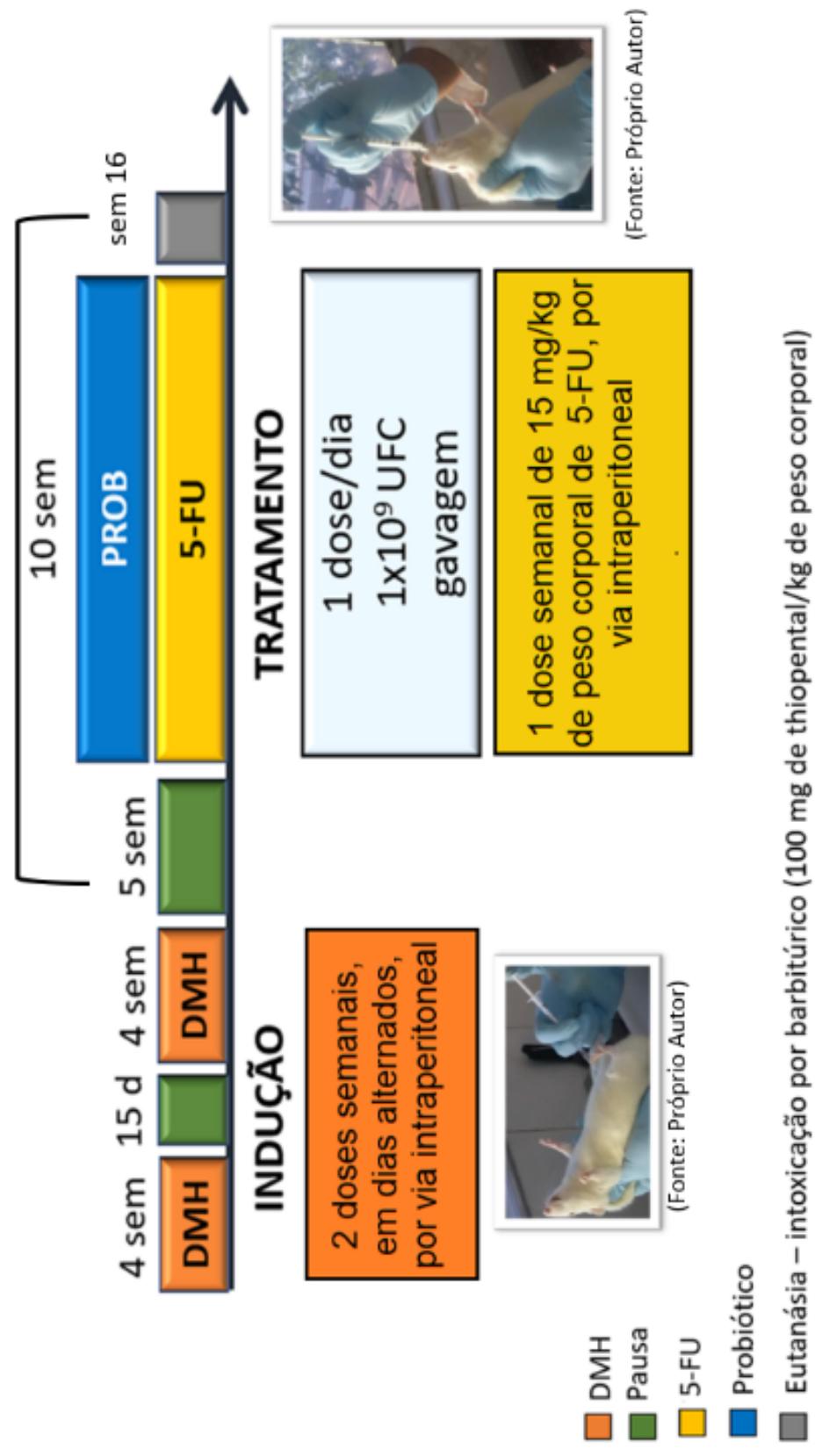
- [6] Tovey M, Rizvi FA, Raman S, Wheatley KE. Rectal cancer presenting as *Fusobacterium nucleatum*pyogenic liver abscess: a case report. *International Journal of Case Reports and Images* 2011; 2(6):16-9. doi:10.5348/ijcri-2011-06-39-CR-4
- [7] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):299-306. doi: 10.1101/gr.126516.111
- [8] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM et al. Genomic analysis identifies association of *fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research* 2012;22(2):292-8. doi: 10.1101/gr.126573.111
- [9] Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol and Motil* 2013;25(1):4-15. doi: 10.1111/nmo.12046
- [10] Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World Journal Gastroenterology* 2014; 20(29):971-31. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9716.
- [11] Gupta B, Das P, Ghosh S, Manhas J, Sen S, Pal S et al. Identification of high-risk aberrant crypt foci and mucin-depleted foci in the human colon with study of colon cancer stem cell markers. *Clinical Colorectal Cancer* 2017;16(3):204-13. doi: 10.1016/j.clcc.2016.09.001
- [12] Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Critical Reviews Oncology Hematology* 2013;86(3):232-50. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.09.014
- [13] Chabner BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas: agentes citotóxicos. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12.ed. Porto Alegre: AMGH; 2012, p.1695-8.
- [14] Golikhalkali B, Paliany AS, Chin KF, Rajandram R. The roles of adjuvant supplements in colorectal cancer patients on chemotherapy: reaping benefits from metabolic crosstalk. *NutritionCancer* 2018;70(2):184-91. doi: 10.1080/01635581.2018.1412470
- [15] Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran L, Chatel J, Sokol H et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion Microbiology* 2013;6(3):255-61. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003

- [16] Masood MI, Qadir MI, Shirazi JH, Khan IU. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Review Microbiology* 2011;37:91–8. doi: 10.3109/1040841X.2010.536522
- [17] Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2013;6(1):39-51. doi: 10.1177/1756283X12459294
- [18] Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery* 2012;12(Suppl 1):S35. doi: 10.1186 / 1471-2482-12-S1-S35
- [19] Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. *Nutrition* 2018;54:165-72. doi: 10.1016/j.nut.2018.03.056
- [20] Castelli V, Palumbo P, d'Angelo M, Moorthy NK, Antonosante A, Catanesi M. Probiotic DSF counteracts chemotherapy induced neuropathic pain. *Oncotarget* 2018;9(46):27998-28008. doi: 10.18632/oncotarget.25524
- [21] Chang CW, Liu CY, Lee HC, Huang YH, Li LH, Chiau JC et al. *Lactobacillus casei* variety *rhamnosus* probiotic preventively attenuates 5-fluorouracil/oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:983. doi: 10.3389/fmicb.2018.00983
- [22] Gourbeyere P, Denery S, Bodinier M. Probiotic, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology* 2011;89(5):685-95. doi: 10.1189/jlb.1109753
- [23] Serban DE. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters* 2014;345:258–70. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.013
- [24] Chen ZY, Hsieh YM, Huang CC, Tsai CC. Inhibitory effects of probiotic *lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. *Molecules* 2017; 22(1):E107. doi: 10.3390 / molecules22010107
- [25] Chong ES. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014;30(2):351-74. doi: 10.1007/s11274-013-1499-6
- [26] Desrouillères K, Millette M, Jamshidian M, Maherani B, Fortin O, Lacroix M. Cancer preventive effect of a specific probiotic fermented milk components and cell walls extracted from a biomass containing *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine.

- Journal of Functional Foods* 2016;26:373–84. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.005>
- [27] Djaldetti M, Bessler H. Probiotic strains modulate cytokine production and the immune interplay between human peripheral blood mononuclear cells and colon cancer cells. *FEMS Microbiology Letters* 2017;364(3). doi: 10.1093/femsle/fnx014
- [28] Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Brasil). Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA; 2013.
- [29] *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington: The National Academic Press; 2011.
- [30] Laranjeira L L S, Taha M O, Ferme A, Lemos R, Plapler H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira* 1998;13(3). doi: 10.1590/S0102-86501998000300008.
- [31] Rodrigues M A M, Silva L A G, Salvadori D M F, de Camargo J L V, Montenegro, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 2002; 35(3): 351-355. doi: 10.1590 / S0100-879X2002000300010
- [32] BoseA, ElyagobyA,Wong TW. Oral 5-fluorouracil colon-specific delivery through *in vivo* pellet coating for colon cancer and aberrant crypt foci treatment. *InternationalJournal of Pharmaceutics*2014;468(1–2): 178-86. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.006
- [33] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Probióticos. [Acesso em: 2018 jun 12]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>.
- [34] Dias M C, Vieiralves N F, Gomes M I, Salvadori D M, Rodrigues M A, Barbisan L F. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48(3):772-80. doi: 10.1016/j.fct.2009.12.003
- [35] Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Disease*. 2012;14(4):e157-64. doi: 10.1111/j.1463-1318.2011.02925.x
- [36] Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono Ket al.Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Digestive Endoscopy* 2012;24(5):353-7. doi: 10.1111/j.1443-1661.2012.01289.x

- [37] Liang JJ, Bissett I, Kalady M, Bennet A, Church JM . Importance of serrated polyps in colorectal carcinogenesis. *Anz Journal of Surgey* 2013;83(5):325-30. doi: 10.1111 / j.1445-2197.2012.06269.x
- [38] Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *CancerLetters* 1987; 37(2): 147-51.
- [39] Irecta-Nájera CA, Del RosarioHuizar-López M, Casas-Solís J, Castro-Félix P, Santerre A. Protectiveeffect of Lactobacillus casei on DMH-Inducedcoloncarcinogenesis in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2017;9(2):163-71. doi:10.1007/s12602-017-9253-2
- [40] Zandoná B, Carvalho LP, Schimedt J, Koppe DC, Koshimizu RT, Mallmann ACM. Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. *RevistaBrasileiraColoproctologia* 2011; 31(2). doi: 10.1590/S0101-98802011000200006
- [41] Matthew F, Sreelakshmi R, Sergei FT, Hanlin LW. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2012;3(3):153-73. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- [42] Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genetics of colorectal câncer. *Revista de Medicina (São Paulo)* 2000;79(2/4):45-64.
- [43] Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. Brasília; 2014. [acesso em 2018 jun 2]. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapeuticas_oncologia.pdf
- [44] Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJ, Chee KM. Effect of lactobacillus acidophilus KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *Journal of Medical Microbiology* 2012;61(Pt 3):361–68. doi 10.1099/jmm.0.035154-0
- [45] Verma A, Shukla G. Probiotics Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus suppresses DMH-Induced pro carcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in spraguedawley rats. *Nutrition and Cancer* 2013;65(1):84-91. doi:
<http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.741746>

APÊNDICE 1 - LINHA DO TEMPO PARA O TRATAMENTO DOS RATOS



APÊNDICE 2- ANÁLISE NUTRICIONAL DA RAÇÃO DOS RATOS

Ração comercial: Nuvilab[®], Nuvital

Informação nutricional Porção de 100g		%VCT*
Quantidade por porção		
Valor energético	339 kcal = 1418 kJ	100,0%
Carboidratos	54 g	63,4 %
Proteínas	22 g	25,9 %
Lípidos	4 g	10,6 %
* % do valor calórico total.		

$$\% \text{CHO} + \% \text{PTN} = 89,3\% > \% \text{LIP: } 10,6\%$$



Não é uma ração com potencial inflamatório



Relação Kcal não proteicas/gN
 $216 \text{ kcal (CHO)} + 36 \text{ kcal (Lip)} = 252 \text{ kcal}$
 $22g / 6,25 = 3,52 \text{ gN}$

Fermentativa

Relação Kcal não proteicas/gN: 71,59/1

Ração Hipernitrogenada – Favorece Anabolismo

(Fonte: Nuvital Nutrientes S/A)

ANEXO A - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: SÊMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês**.

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação. Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

American Journal Experts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em “**Docs. Sup.**”

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação;
- b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “**Docs. Sup.**” no ato da submissão;
- e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRICÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;
- b) Os experimentos de campo não incluem dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;
- d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;
- e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

- a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de edição haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2017), ou **Source:** IBGE (2017).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a

necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos... Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana**).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.

b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.

c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹. Não interrelacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.

d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.

e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

a) Os resultados de Dubey (2017) confirmaram que

b) De acordo com Santos et al. (2017), o efeito do nitrogênio.....

c) Beloti et al. (2017b) avaliaram a qualidade microbiológica.....

d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 2017).

e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 2017).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2017).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2017).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2017) ou Russo et al. (2017); (RUSSO et al., 2017; FELIX et al., 2017).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçoamento.

Ex: (SILVA, 2017a, 2017b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 2015, 2016, 2017).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2017; RODRIGUES, 2017).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agronômico, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.
2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).
4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
6. *Numero de autores:* Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como coautores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena

participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a **formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO.**
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.**

Utilize o botão "incluir autor"

1. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: titulo em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.
2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New Roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.
2. **Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar “Docs. Sup.”**

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA AUTORES: NUTRITION – JOURNAL – ELSEVIER**NUTRITION**

The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below. INTRODUCTION Nutrition provides an international forum for professionals interested in the applied and basic biomedical nutritional sciences, and publishes papers both of clinical interest and of scientific import. Investigators are encouraged to submit papers in the disciplines of nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Papers on nutrition-related plant or animal sciences which are not of direct relevance to man, whereas occasionally of interest are not the main focus of the Journal. Nutrition publishes a wide range of articles, which includes original investigations, review articles, rapid communications, research letters, case reports and special category manuscripts. Manuscripts must be prepared in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" developed by the International Committee of Medical Journal Editors (N Engl J Med 1991;324:424-428). All submissions are peer reviewed.

Original Investigation (3000-5000 words including tables, figures and references) Original investigations are considered full-length applied (human) or basic (bench work) research reports. They cover topics relevant to clinical and basic studies relevant to man in the following areas nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Studies in adult and pediatric populations are welcome. The work presented in the manuscript must be original; studies confirming previous observations will be considered. Other considerations of a paper's publishability are its importance to the science, the soundness of the experimental design, the validity of methods, the appropriateness of the conclusions and the quality of presentation.

Rapid Communication (1000-3000 words including tables, figures and references) Papers representing concise and original studies of scientific importance are considered. In the cover letter the author should justify the request for Rapid Communication. The review process is 10 days, authors are allowed one revision if accepted, and the final version of the paper appears in the next available issue of the journal.

Research Letter (up to 1000 words, including up to 10 references and 1 figure or table) A Research Letter contains new data or a clinical observation, in a format that allows for rapid publication.

Review Article (up to 5000 words including tables, figures and references) In-depth, comprehensive state of the art reviews on a nutritional topic are welcomed. Reviews may be invited by the Editor or may be unsolicited viewpoints.

Case Report (up to 2500 words including tables figures, and references) Case Reports include case studies of 4 or fewer patients that describe a novel situation or add important insights into mechanisms, diagnosis or treatment of a disease.

Editorial (up to 1000 words including tables, figures and references) Editorials express opinions on current topics of interest, or provide comments on papers published in Nutrition or other journals. Editorials are generally solicited by one of the Editors.

Correspondence (Letter to the Editor) (1000 words including tables, figures and references) Opinion pieces concerning papers published in Nutrition are particularly welcomed and all submissions are subject to editing. Letters commenting on past-published papers are sent to the corresponding author for a response. Letters are selected for their relevance and originality; not all letters submitted can be published.

Meeting Proceedings (up to 2500 words including tables, figures and references) Reports of meeting proceedings are synopses of scientific meetings of interest to Nutrition's audience. Authors should e-mail the Editor to solicit potential interest 8 weeks prior to conference.

Collections of abstracts representing the proceedings of organizational meetings are not subjected to customary peer review. It is the view of the Editorial Board that it is of service to the nutrition community to present such material as promptly as possible. Hypothesis (up to 3000 words including tables, figures and references) Novel insights into a significant questions or clinical issues are welcome, and will be peer reviewed. As the definition of "hypothesis" suggests, articles of this type should be, although they lack direct experimental evidence, closely tied to empirical data and lead to testable predictions.

Special Article (up to 5000 words including tables, figures and references) Associated with a particular special event, invitation or announcement; for example, the annual John M. Kinney Awards papers. SUBMISSION_CHECKLIST Ensure that the following information and files have been included. One author has been designated as the corresponding author with contact details: E-mail address Full postal address

Manuscript: Word doc or similar required. PDF is not suitable for review and production. Include keywords. Has been spell-checked and grammar checked. Has been edited by professional, preferably native-English-speaking editor.

Tables: Include titles, description, footnotes. Create tables in the document rather than inserting image files, so that changes can be made.

Figures: High quality and good resolution. Provide separate image files as well as in-manuscript. Include relevant captions. Indicate clearly if color should be used for any figures in print. Ensure all figure and table citations in the text match the files provided.

If applicable include as separate files: Graphical abstracts Highlights (3-5, document file) Supplemental files

References: All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa. Make sure reference style is consistent throughout.

Further considerations: Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet). Relevant declarations of interest have been made. Journal policies detailed in this guide have been reviewed. Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements. BEFORE

YOU BEGIN Ethics in publishing Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication. CONDITIONS OF PUBLICATION — ETHICAL AND LEGAL CONSIDERATIONS All material submitted to Nutrition, for any section of the journal, is considered for publication on the understanding that authors (including all coauthors) agree to Nutrition's publication policies as stated in this section of the Guidelines to Authors.

In the event of non-compliance with these conditions of publication, including issues that surface after a contribution is published, Nutrition's rights include: sending a notice of failure to comply to authors' employers and funding agencies; and/or informing readers via a published correction/retraction; the latter is linked to the original contribution via electronic indexing and becomes part of the formal published record.

Research/publication misconduct is a serious breach of ethics. Such misconduct includes:

- i) Redundant or duplicate publication by same author(s), ii) Publication in another source by the same author(s) without acknowledgement or permission from the publisher, or iii) Plagiarism or self-plagiarism (publication of material without acknowledging original author source). iv) Fabrication of data, not substantiable via review of research records.

Should such publications occur, editorial action would be taken. In certain cases, secondary publication is justifiable and even beneficial; however, such circumstances should be prospectively discussed with and agreed upon by the Editor-In-Chief.

Nutrition will not accept a submission of work previously reported in large part in a published article (duplicate) or that is contained in another paper submitted or accepted for publication in Nutrition or elsewhere. Declaration of interest All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information. Submission declaration and verification Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyrightholder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check. Preprints Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information). Authorship Corresponding Author: One author is designated the corresponding author (not necessarily the

senior author) who will be approached to clarify any issues, such as those pertaining to materials and methods, or technical comments. If Nutrition receives feedback from its readers concerning the published paper, the corresponding author will be contacted. It is this author's responsibility to inform all coauthors of such matters to ensure they are dealt with promptly.

The corresponding author must affirm in the cover letter at the time of submission that:

1. None of the material in the manuscript is included in another manuscript, has been published previously, or is currently under consideration for publication elsewhere. This includes symposia proceedings, transactions, books, articles published by invitation, and preliminary publications of any kind except an abstract of less than 250 words. If there is any question concerning potential overlap, the related material must be included for evaluation.
2. Ethical guidelines were followed by the investigator in performing studies on humans or animals and should be described in the paper. The approval of the institutional review board of either animal or human ethics committee must be cited in the Methods.
3. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content of the paper and must approve of the final version of the manuscript. Authorship should be based on substantive contributions to each of the following: conception and design of the study; generation, collection, assembly, analysis and/or interpretation of data; and drafting or revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript. Authors are required to include a statement in the Acknowledgements to specify the actual contribution of each coauthor under the above headings.
4. If requested, the authors will provide the data or will cooperate fully in obtaining and providing the data on which the manuscript is based for examination by the editors or their assignees Changes to Authorship This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Changes to author names after acceptance are strongly discouraged and can be accepted only in compelling circumstances.

Before the accepted manuscript is published in an online issue Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum. Reporting clinical trials Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including

recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs. • No open access publication fee payable by authors. • The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access** • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse. • A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and

copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The gold open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months. Elsevier Researcher Academy Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Submit your article All new manuscripts must be submitted through Nutrition's online submission and review Web site <https://www.evise.com/profile/#/NUT/login> Referees Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. PREPARATION NEW SUBMISSIONS Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. Authors please note: We please ask you to use line numbering throughout the manuscript text, to facilitate clear and rapid peer review References There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long

as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. **Formatting requirements** There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table. **Peer review** This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

AUTHOR INFORMATION PACK 5 Jun 2018 www.elsevier.com/locate/nut 11

Double-blind review This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

REVISED SUBMISSIONS Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure Subdivision - unnumbered sections Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. **Material and methods** Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In

contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. This should include 1) title of paper (use no abbreviations, limit: 120 characters with spaces), 2) running head of fewer than 55 characters with spaces, 3) full names of all authors with highest academic degree(s); 4) affiliations of all authors; 4) role of each author in the work (see Authorship); 5) a word count for the entire manuscript (including figures and tables), and the number of figures and tables, 4) the complete mailing address (including telephone, fax, and e-mail address of the corresponding author for e-mailing of proofs and reprint requests).

Abstracts should be no more than 250 words. The structured abstract for an original investigation should be organized as follows:

Objective: The abstract should begin with a clear statement of the precise objective or question addressed in the paper. If a hypothesis was tested, it should be stated.

Research Methods & Procedures: The basic design of the study and its duration should be described. The methods used should be stated, the statistical data/methods provided and referenced.

Results: The main results of the study should be given in narrative form. Measurements or other information that may require explanation should be defined. Levels of statistical significance should be indicated, including other factors crucial to the outcome of the study.

Conclusion(s): State only conclusions that are directly supported by the evidence and the implications of the findings. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements. Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site. Keywords 5—7 key words or phrases should be provided which should be selected from the body of the text and not duplicate title words. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations

throughout the article. Acknowledgments Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used.

Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

• Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

• Number the illustrations according to their sequence in the text.

• Use a logical naming convention for your artwork files.

• Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

• For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

• Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. Please do not:

• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

• Supply files that are too low in resolution.

• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS

Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork. Illustration services Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

AUTHOR INFORMATION PACK

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. Reference links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper. Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web

references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Data references This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/nutrition>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. Examples: Reference to a journal publication: [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. Reference to a book: [2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book: [3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website: [4] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003]. Reference to a dataset: [dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform

Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also Samples of Formatted References). Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations. Video Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AUTHOR INFORMATION PACK 5 Jun 2018 www.elsevier.com/locate/nut 16

AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Data visualization Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article. Supplementary material Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version. Research data This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References"

section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page. Data linking If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). Mendeley Data This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to Mendeley Data. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief. Data statement To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page. AFTER ACCEPTANCE Online proof correction Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for

checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO C – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA – UNOESTE

17/09/2018

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM RATOS WISTAR COM TUMOR DE CÓLON INDUZIDO, SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOURACIL**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3052 e tendo como participante(s) **LUÍS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS (responsável), MARCELO GEORGE MUNGAI CHACUR (docente), BIANCA DEPIERI BALMANT (discente), DENISE YABUKI (discente), SANDRA CRISTINA GENARO (discente), EDUARDO AUGUSTO RABELO SOCCA (externo), WAGNER JOSÉ FÁVARO (externo)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 16/03/2016.

Vigência do projeto: 01/2016 a 01/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
RATOS LINHAGEM FISHER F344	50	0			CENTRO DE BIOTERISMO UNICAMP

Presidente Prudente, 3 de Agosto de 2016.

Prof. Dr. Lair Rodriguez Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falcó de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

**ANEXO D - CERTIFICADO DE SEGUNDO LUGAR DO PRÊMIO GANEPÃO
ABBOTT 40 ANOS**

