



AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO SOBRENADANTE OBTIDO DA FERMENTAÇÃO DOS GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS EM CÉLULAS HCT-116

Davi Guilherme Teixeira Firmino da Silva¹

davi.guilherme@upe.br

Luiza Rayanna Amorim de Lima¹

luiza.amorim@upe.br

Gisele Mendes da Silva¹

gisele.mendes@upe.br

¹Universidade de Pernambuco UPE *Campus* Garanhuns

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença que se origina a partir do crescimento descontrolado de células da porção final do intestino grosso, tendo o seu desenvolvimento a partir de pequenas formações anormais na parede interna do cólon, chamados de pólipos. No Brasil, de acordo com o INCA (2023), a neoplasia colorretal ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados. A incidência dessa neoplasia tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas, em grande parte, pela adoção de uma dieta pobre em fibras e rica em gorduras, e ao aumento da obesidade (Silva; Errante, 2017).

Os Galacto-oligosacarídeos (GOS) são substâncias que promovem a saúde do trato gastrointestinal (TGI), estimulando o crescimento e a atividade de bactérias que são benéficas no intestino, sendo considerados prebióticos. Desse modo, os GOS são produzidos a partir da lactose, por meio da ação enzimática de galactosidases, que adicionam moléculas de galactose a glicose final da lactose (Martins; Burkert, 2009; Rastall; Gibson, 2015).

Devido a essa conformação estrutural, o GOS apresenta uma resistência à digestão ácida no TGI, permitindo que cheguem até o intestino grosso intactos, e interajam com as bactérias de maneira benéfica. A partir dessa interação, os produtos da metabolização desses substratos pelo probiótico atuam na microbiota do cólon e em processos celulares, resultando em uma modulação positiva da flora intestinal (Martins; Burkert, 2009; Rastall; Gibson, 2015).

As bactérias intestinais durante o processo de interação metabolizam os GOS, gerando assim, metabólitos secundários, como por exemplo, os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), que possuem um papel de extrema relevância na modulação da microbiota intestinal. Por conseguinte, esses metabólitos vêm sendo associados a inibição da proliferação de células neoplásicas, a indução da apoptose, e ainda a redução da inflamação, fatores esses que são essenciais para o tratamento do câncer (Donohoe *et al.*, 2012; Louis; Flint, 2016).

Para tanto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade citotóxica do sobrenadante contendo os metabólitos obtidos da fermentação dos GOS (Met-GOS) pelos probióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção de metabólitos

Os probióticos (*Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium animalis* e *Saccharomyces cerevisiae*) foram mantidos em meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Biokar Diagnostics, França) e em meio yeast extract peptone dextrose-aga" (YEPD-agar), a - 80 ° C, suplementados com glicerol (30% v/v). Os microrganismos foram obtidos em farmácia de manipulação local. A mistura comercial de GOS (GNC, lote: 1537DW1826) foi escolhida após realização de um levantamento preliminar de mercado, onde foi observado que este prebiótico é um produto seguro e atóxico, sem necessidade específica de receituário e de fácil distribuição.

Para cultivo dos probióticos foram avaliadas diferentes condições de tempo (0, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas) e atmosfera (anaeróbica e aeróbica). Os probióticos foram incubados em erlenmeyers de 100 mL contendo 25 mL de meio de cultura MRS (*L. delbrueckii*, *B. animalis*) e YEPD (*S. cerevisiae*) por



48 horas, a 37 °C, 100 rpm e em condições de aerobiose e anaerobiose. Para geração da atmosfera anaeróbica foi utilizada a Jarra de Anaerobiose (Marca Permution, Modelo JA0400, 2,5 L), o gerador de atmosfera AnaeroGen e o sachê indicador de anaerobiose BR005B IVD, ambos da marca Thermo Scientific (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O crescimento bacteriano foi monitorado através de espectrofotometria, realizando leitura a 600 nm. Todas as culturas bacterianas após crescimento foram preservadas a - 20 ° C e a - 80 ° C no meio de cultura MRS, suplementado com glicerol (30% v/v).

A fermentação prebiótica nas condições ótimas determinadas (37°C, 150 rpm, pH 6,8 por 24 horas em anaerobiose), inoculando 25 mL contendo 6 x 10⁸ de cada probiótico (de acordo com a escala de turbidez de McFarland), em meio de cultura elaborado contendo GOS. O caldo fermentado foi centrifugado a 5000 rpm, por 5 minutos a 4 °C, para separação da biomassa. O sobrenadante contendo os metabólitos secundários provenientes da fermentação prebiótica foram liofilizados (Liofilizador L101 - Liotop), ressuspensos em Tampão Fosfato-Salino (PBS) 0,1 M, pH 7,2 e filtrados em filtro PVDF 0,22 µm para avaliação in vitro do seu potencial anticâncer.

Ensaio de viabilidade celular

A linhagem celular de carcinoma de cólon (HCT-116) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e mantida no Laboratório de Biologia Celular da Universidade de Pernambuco (UPE) – *Campus Garanhuns*. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 com L-Glutamina, suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C com 5% de CO₂.

Para avaliação da citotoxicidade dos MET-GOS, foi realizado o ensaio a partir do sal de tetrazólio MTT na linhagem HCT-116. Para isso, a linhagem foi semeada em placas de 96 poços (1 x 10⁴ de células/poço). Os MET-GOS, foram pesados e diluídos em PBS a 0,1 M em diferentes concentrações: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/mL, onde foram incubados nas células 24 h após o plaqueamento, passando posteriormente, por um tratamento de 72 h. Foi utilizado dois controles negativos, sendo um apenas com o meio, sem a presença das células, e o outro, incubado com PBS a 0,1 M. Ainda, foi utilizado um controle positivo, onde foi incubado DMSO 10%. Ao final das 72 h, foi aplicado 20 µL da solução de MTT. Após 3 h, foi adicionado o TRiton X-100 a 10%. A leitura da placa foi realizada 24 h após o TRiton ser incubado, utilizando um leitor de microplaca a 490 nm (*Thermo Scientific Multiskan GO*).

Análises Estatísticas

Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, para o ensaio. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DPM). Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

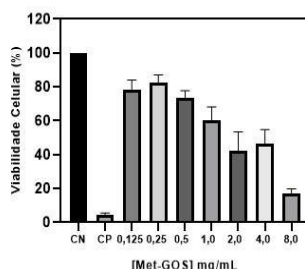
Para calcular a viabilidade das células da linhagem HCT-116, foi realizado um ensaio de citotoxicidade MTT do MET-GOS na linhagem supracitada. Para tanto, os metabólitos secundários foram capazes de inibir 58% da viabilidade celular na concentração de 2,0 mg/mL (IC₅₀ = 1,8 mg/mL) confirmando sua ação citotóxica em carcinoma do cólon retal.

A partir disso, os resultados obtidos reforçam o potencial anticâncer dos MET-GOS. A inibição de 58% da viabilidade das células HCT-116 indicam que esses metabólitos podem ser eficazes na supressão do crescimento de neoplasias de carcinoma colorretal. Ainda, o valor de IC₅₀ 1,8 mg/mL que foi encontrado, sugere que o MET-GOS infringe o efeito citotóxico em concentrações baixas, se destacando como um potencial terapêutico. Para tanto, esses resultados são condizentes com estudos anteriores, que comprovam a eficácia do GOS em CCR (Wu, *et al.*, 2020).

Ademais, por sua capacidade de resistência ao sistema digestivo interagindo assim com a microbiota intestinal, ele pode ser ainda benéfico, não apenas agindo como um supressor tumoral, mas também trazendo equilíbrio para o ambiente intestinal (Shrifteylik *et al.*, 2023).



Figura 1: Ensaio de citotoxicidade do MET-GOS frente às células de carcinoma colorretal por 72h, nas concentrações indicadas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes.



Fonte: O autor (2024).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, de acordo com o que foi observado no ensaio de viabilidade celular, os MET-GOS demonstraram efeito citotóxico na linhagem HCT-116, indicando uma promissora atividade anticâncer da solução. Porém, mais experimentos são necessários para validar as informações.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer colorretal. Metabólitos Secundário. Galacto-oligossacarídeos. Viabilidade celular. HCT 116.

Referências

- DONOHUE, D. R. *et al.* The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. **Molecular Cell**, v. 48, n. 4, p. 612–626, nov. 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2023.
- LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 8 dez. 2016.
- MARTINS, A.; BURKERT, C. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. (2009). **Brazilian Journal of Food Technology**. 12. 230-240. 10.4260/BJFT2009800900017.
- RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42–46, abr. 2015.
- SHRIFTEYLIK, A. *et al.* A Current Review on the Role of Prebiotics in Colorectal Cancer. **Biologics**, v. 3, n. 3, p. 209–231, 22 ago. 2023.
- SILVA, M.; ERRANTE, P. R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 33, p. 133-140, 2017.
- WU, Y. *et al.* Structural features, interaction with the gut microbiota and anti-tumor activity of oligosaccharides. **RSC Advances**, v. 10, n. 28, p. 16339–16348, 2020.