



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Rita Manuela Rodrigues Vieira
Butirato e cancro colo-retal

março, 2012

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Rita Manuela Rodrigues Vieira
Butirato e cancro colo-retal

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Bioquímica

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Professora Doutora Maria de Fátima Moreira Martel**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Arquivos de Medicina**

março, 2012

FMUP

Eu, Rita Manuela Rodrigues Vieira, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801118, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/03/2012

Assinatura: _____

Nome: _____

Endereço electrónico: _____ **Telefone ou Telemóvel:** _____

Número do Bilhete de Identidade: _____

Título da Dissertação/Monografia (cortar o que não interessa):

Orientador:

Ano de conclusão: _____

Designação da área do projecto:

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (cortar o que não interessar) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, ___/___/_____

Assinatura: _____

Butirato e cancro colo-retal

Butirato e cancro colo-retal

Rita Manuela Rodrigues Vieira

Filiação

Departamento de Bioquímica

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Porto

Portugal

Correspondência

Rita Manuela Rodrigues Vieira

Departamento de Bioquímica

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Al. Professor Hernâni Monteiro

4200-319 Porto

Telefone: 00351 939559502

E-mail: med06118@med.up.pt

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a orientação da Professora Doutora Fátima Martel pelo esforço, dedicação, apoio e pela disponibilização de bibliografia que consta nesta monografia.

Contagem de Palavras

Abstract: 134

Resumo: 148

Texto Principal: 4710

Butirato e cancro colo-retal

Resumo

O cancro colo-retal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e a sua incidência tem aumentado nos últimos anos. A sua etiologia é multifatorial estando cerca de 80% destes carcinomas associados a fatores ambientais. Múltiplos estudos epidemiológicos e experimentais mostraram que a ingestão de uma dieta rica em fibras diminui a incidência de cancro colo-retal e este efeito protetor foi associado à produção de butirato.

O butirato é um ácido gordo de cadeia curta produzido pela degradação das fibras alimentares no cólon humano pelas bactérias intestinais. A sua produção está associada à diminuição da incidência de cancro colo-retal devido à sua capacidade de promover a diferenciação das células neoplásicas, inibir a proliferação celular, estimular a apoptose e regular a expressão de genes. O objetivo desta revisão é descrever a ação do butirato na mucosa do cólon saudável e no cancro colo-retal.

Palavras-chave: Butirato, cancro colo-retal, doença inflamatória intestinal, fibras

Abstract

Colorectal cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide and its incidence has increased in recent years. Its etiology is multifactorial with around 80% of these cancers associated with environmental factors. Multiple epidemiological and experimental studies have shown that eating a diet high in fiber reduces the incidence of colorectal cancer and this protective effect was associated with the production of butyrate.

Butyrate is a short-chain fatty acid produced by the degradation of dietary fiber in human colon by intestinal bacteria. Its production is associated with reduced incidence of colorectal cancer because of its ability to promote the differentiation of neoplastic cells, inhibit cell proliferation, stimulate apoptosis and regulate gene expression. The purpose of this revision is to describe the action of butyrate in the healthy colon mucosa and in colorectal cancer.

Keywords: butyrate, colorectal cancer, inflammatory bowel disease, fiber

Índice

1. Lista de Abreviaturas.....	5
2. Introdução.....	6
3. Métodos.....	7
4. CCR – Epidemiologia, fatores de risco e patogenia.....	8
5. Fibras e CCR.....	10
6. Butirato.....	12
6.1 Produção, destino e metabolismo.....	12
6.2 Absorção intestinal.....	12
6.2.1 MCT1 e SMCT1.....	13
6.2.2 Efeito de fármacos, alimentos e drogas de abuso.....	14
6.3 Mucosa normal vs CCR.....	16
6.4 Efeitos celulares do butirato.....	16
6.4.1 Ciclo celular.....	16
6.4.2 Apoptose.....	17
6.4.3 Viabilidade, proliferação e diferenciação celular.....	18
6.4.4 Outros efeitos celulares.....	19
7. Butirato e Doença Inflamatória Intestinal.....	22
8. Conclusão.....	24
Referências Bibliográficas.....	25
Anexo - Normas para apresentação de artigos aos Arquivos de Medicina	

1. Lista de Abreviaturas

AGCC – ácidos gordos de cadeia curta

BCRP – proteína de resistência do cancro da mama

CCR – cancro colo-retal

CU – colite ulcerosa

DII – doença inflamatória intestinal

DR5 – *death receptor 5*

EGCG – epigallocatequina galato

HDAC- desacetilase das histonas

INF- γ – interferão- γ

MCT1 – transportador dos monocarboxilatos tipo 1

MDMA – metilenedioximetanfetamina

NFKB – fator de transcrição nuclear KB

SMCT1 – transportador dos monocarboxilatos tipo 1 acoplado com o sódio

TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa

TRAIL – *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

2. Introdução

Muitos tumores são resistentes aos protocolos de tratamento atuais e isto constitui um dos principais problemas na terapia do cancro colo-retal (CCR). O epitélio do cólon está em contacto direto com os alimentos ingeridos, o que pode influenciar o padrão de crescimento, diferenciação e morte celular. Assim, a eliminação de células pré-neoplásicas ou neoplásicas através da alimentação ou intervenções quimiopreventivas representa uma abordagem promissora para diminuir a incidência de CCR (citado em [1]).

A noção de que o consumo de fibras poderia estar associada à redução da incidência do CCR foi proposta por Burkitt que estabeleceu a associação entre a ingestão de uma dieta rica em fibras e a baixa incidência de CCR (citado em [2, 3]). Esta observação foi confirmada por vários estudos epidemiológicos que mostram que existe uma relação inversa entre a ingestão de fibras e a incidência de CCR [4], sendo que a ingestão diária de 30 g de fibras reduz em cerca de 50% o risco de desenvolver CCR (citado em [2, 5]). A inulina, uma fibra alimentar, e os produtos da sua fermentação diminuem o risco de CCR (citado em [6, 7]). Estes efeitos protetores foram associados à produção de butirato [8], que tem efeitos anticarcinogénicos devido à sua capacidade de induzir a apoptose [9], de inibir a proliferação e promover um fenótipo mais diferenciado nos colonócitos neoplásicos [10].

No entanto, nem todos os estudos *in vivo* mostram que o butirato tem uma ação protetora sobre a carcinogénese colo-retal. Quando se compara o resultado destes estudos é necessário ter em conta que o butirato exerce diferentes efeitos em células sob diferentes condições microambientais, que as mesmas células em diferentes estados respondem de maneiras diferentes ao butirato, que há heterogeneidade na exposição do butirato *in vivo* e o que meio intracelular das células neoplásicas pode modificar as ações do butirato [11].

3. Métodos

Em 28 de setembro de 2011 efetuou-se uma pesquisa na *PubMed* com a seguinte equação de pesquisa: (("butyrates"[MeSH Terms] OR "butyrates"[All Fields] OR "butyrate"[All Fields]) AND ("colorectal neoplasms"[MeSH Terms] OR ("colorectal"[All Fields] AND "neoplasms"[All Fields]) OR "colorectal neoplasms"[All Fields] OR ("colorectal"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "colorectal cancer"[All Fields])).

A pesquisa foi limitada a artigos publicados nos últimos 10 anos, sem limite de língua. Foram obtidos 313 artigos. Destes foram selecionados, pela leitura do título e do *abstract*, 64 que correspondiam ao objetivo desta monografia, bem como outros estudos que permitissem uma abordagem geral deste tema.

4. CCR – Epidemiologia, fatores de risco e patogenia

O CCR é uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo e a sua incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos. Em 2006, a taxa de incidência de cancro do cólon no Norte de Portugal foi de 40,5 novos casos por 100000 pessoas/ano, enquanto que a taxa de incidência de cancro do reto foi de 23,9 novos casos por 100000 pessoas/ano [12].

A lesão neoplásica que se deteta mais precocemente no cólon são os focos de cripta aberrante, mas só uma pequena fração destas lesões evolui para cancro [13]. O desenvolvimento do CCR segue uma sequência de alterações patológicas bem definida, nomeadamente o desenvolvimento de células de cripta aberrantes seguido de hiperplasia epitelial, pólipos adenomatosos, carcinoma e por fim metástases (citado em [1]).

O CCR é mais comum nos países desenvolvidos do que nos países em desenvolvimento, sugerindo que o estilo de vida ocidental pode ser responsável pelo aumento do risco (citado em [14]). Fatores ambientais são responsáveis por cerca de 80% dos CCR e a dieta parece ser um dos fatores mais importantes [15, 16]. A ingestão de gorduras e os ácidos biliares secundários aumentam o risco enquanto que as fibras têm um papel protetor (citado em [9]). O consumo de ácido α -linoleico e ácidos gordos w-3 têm um efeito protetor sobre o aparecimento de CCR em mulheres, enquanto que o consumo de ácido araquidónico aumenta o risco [17]. Outros fatores de risco são os síndromes hereditários como a Polipose do cólon e o Síndrome de Lynch e a doença inflamatória intestinal (DII) [2].

O CCR resulta da acumulação de múltiplas alterações genéticas e a via de sinalização *Wnt* parece ter um papel importante na sua etiologia (citado em [13, 18]). Foi estabelecida uma relação entre a atividade da via *Wnt* e os níveis de apoptose nas células de CCR [19], sendo que a não ativação e a ativação em níveis elevados estimulam a apoptose [20]. Estudos *in vitro* sugerem que a ingestão de altos níveis de fibras resultam em

altas concentrações de butirato que induz marcadamente a ativação da via *Wnt* e a apoptose dos colonócitos anormais [3, 19].

5. Fibras e CCR

A maioria dos estudos epidemiológicos mostram que existe uma relação inversa entre a ingestão de fibras e a incidência de CCR [4, 21]. Em populações com um baixo consumo de fibras, a duplicação da ingestão pode reduzir o risco de CCR em 40% [22].

As fibras influenciam a fisiologia intestinal quer pela sua ação direta quer pelos produtos que resultam da sua fermentação intestinal [5]. As suas ações envolvem a diluição dos carcinogêneos, a redução do tempo de trânsito intestinal, a estimulação da absorção dos ácidos biliares secundários [2] e a produção dos ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), acetato, propionato e butirato, através da sua fermentação pelas bactérias intestinais [5, 23]. O butirato é o principal responsável pelos efeitos benéficos que a flora bacteriana tem na saúde intestinal [24]. Ao contrário das fibras solúveis, as fibras insolúveis têm maior capacidade de aumentar a concentração de butirato nas regiões mais distais do intestino, onde a sua concentração normalmente é mais baixa [5] e onde a incidência de carcinomas é maior.

O rácio da concentração dos AGCC é de cerca de 60% de acetato, 25% propionato e 15% butirato [23]. O butirato é o que desperta mais interesse porque inibe a desacetilase das histonas (HDAC) e induz a paragem do ciclo celular, diferenciação e/ou apoptose de colonócitos neoplásicos *in vitro* (citado em [3]), sendo também a principal fonte de energia dos colonócitos [25]. O butirato pode regular a expressão de genes quer por mecanismos epigenéticos quer por ação direta e tem um papel importante na reversão de mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogénese e na ativação da apoptose [2]. O butirato inibe a proliferação das células neoplásicas do cólon através da acetilação das histonas, da metilação do DNA e da modulação da atividade do fator de transcrição nuclear K_b (NF-KB)(citado em [26]).

A acetilação de algumas histonas específicas, através da inibição da HDAC, é considerado o mecanismo principal pelo qual o butirato inibe a proliferação e estimula a

apoptose e a diferenciação celular. O butirato causa hiperacetilação das histonas através da inibição não-competitiva e reversível da HDAC, aumentando a acessibilidade para a ligação dos fatores de transcrição aos seus promotores no DNA (citado em [27, 28]). Além disso, promove o crescimento e a proliferação dos colonócitos normais; estimula a absorção de fluidos e eletrólitos; estimula a secreção de muco; aumenta a vascularização e a motilidade; reduz a percepção e o desconforto intestinal e a dor; inibe a inflamação colônica e o stress oxidativo; e melhora as funções de defesa da barreira intestinal (citado em [29]).

6. Butirato

6.1 Produção, destino e metabolismo

A concentração dos AGCC pode chegar aproximadamente aos 100 mM com cerca de 20-30% de butirato, variando portanto a sua concentração entre os 2 a 10 mM (citado em [25, 30]). Cerca de 95% dos AGCC produzidos no intestino grosso são absorvidos e metabolizados nos colonócitos [31] a nível mitocondrial através da β -oxidação e da via dos ácidos tricarbóxicos [32].

A concentração de butirato é maior no cego e diminui nas regiões mais distais do cólon, devido à sua absorção pela mucosa. A maioria dos CCR aparecem nos segmentos mais distais do cólon onde a concentração de butirato é mais baixa, o que permite estabelecer uma relação inversa entre os dois [11]. A concentração de butirato na veia porta é cerca de 1000 vezes inferior à concentração no lúmen do cólon, devido à sua grande metabolização no interior dos colonócitos (citado em [11, 33]). Posteriormente, o fígado metaboliza a maior parte do butirato resultando em concentrações sistémicas ainda mais baixas (citado em [33]).

O butirato é a principal fonte de energia dos colonócitos normais [34], mas com a transformação maligna as células passam a usar a glicose como principal fonte de energia. No entanto, o butirato tem a capacidade de alterar o metabolismo da glicose em alguns tipos celulares [28, 35], sendo que as células cancerígenas podem mudar para um fenótipo que usa preferencialmente o butirato como fonte de energia [28].

6.2 Absorção intestinal

Teoricamente, os AGCC podem ser transportados para os colonócitos por dois mecanismos diferentes: por difusão passiva da forma não dissociada e por um transportador específico para a forma aniónica [25]. No entanto, no lúmen do cólon quase todo o butirato se encontra na forma dissociada, que não consegue atravessar a membrana do colonócito por difusão simples e por isso requer um sistema de transporte específico. O transporte da

forma ionizada pode envolver o antiporte $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$, o transportador dos monocarboxilatos (MCT1 ou SLC16A1) que transporta o butirato acoplado com o H^+ ou o transportador dos monocarboxilatos (SMCT1 ou SLC5A8) que o transporta acoplado com o Na^+ [25]. O MCT1 tem uma distribuição ubiqüitária, sendo a isoforma mais expressa a nível intestinal; enquanto que o SMCT1 é expresso apenas no rim, no cólon, no íleo e na tiroide [36, 37].

O papel do butirato no desenvolvimento do CCR foi comprovado recentemente pela demonstração da diminuição da expressão dos seus transportadores (MCT1 e SMCT1) nos colonócitos neoplásicos, resultando em diminuição da sua captação e do seu metabolismo (citado em [33]). O seu transporte em células epiteliais intestinais não transformadas envolve principalmente o MCT1, com uma contribuição pequena do SMCT1 [38]; enquanto que a captação por células tumorais (Caco-2) é mediada apenas pelo MCT1 [4].

6.2.1 MCT1 e SMCT1

Os MCT's fazem o cotransporte dos monocarboxilatos com o H^+ , com uma estereoquímica de 1:1, sendo por isso o seu transporte electroneutro [39]. Existem 14 isoformas mas apenas o MCT1, MCT2, MCT3 e o MCT4 transportam monocarboxilatos acoplados com o H^+ [40]. Nos colonócitos humanos ocorre uma expressão polarizada das isoformas do MCT. O MCT1 é expresso na membrana apical dos colonócitos, enquanto que o MCT4 e o MCT5 são expressos na membrana basolateral (citado em [32]). A absorção do butirato mediada pelo MCT1 é aumentada pelo próprio butirato [41, 42].

A observação de que o butirato induz a expressão do MCT1 pode explicar porque o MCT1 é mais expresso no cólon (maior concentração de butirato) que no intestino delgado e sugere que o butirato pode regular o seu próprio transporte pelos colonócitos, de modo a aumentar a sua concentração intracelular [32].

O SMCT1 é um transportador de monocarboxilatos cujo transporte é dependente do Na^+ e é electrogénico (citado em [39]). O gene SLC5A8 pode ser silenciado através da metilação do DNA e a sua expressão encontra-se reduzida no CCR [37, 43]. A reexpressão do SLC5A8 no CCR induz apoptose apenas na presença de butirato. Assim, o SMCT1 medeia o efeito supressor tumoral do butirato, atuando como um gene supressor tumoral (citado em [18, 37, 43, 44]).

6.2.2 Efeito de fármacos, alimentos e drogas de abuso

O transporte do butirato é modulado pela dieta e pela exposição aguda ou crónica a alguns agentes farmacológicos, alimentos e drogas de abuso. A absorção do butirato mediada pelo MCT1 é aumentada pelo butirato, leptina, proteína cínase C, somatostatina, cafeína e ácido acetilsalicílico. É inibida pela *E.coli* enteropatogénica, interferão- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), teofilina, tetrahydrocannabinol, MDMA (ecstasy), acetaldeído, indometacina e compostos polifenólicos (citado em [29, 38]). Diferentes xenobióticos modulam de modo diferente a captação do butirato em células epiteliais não transformadas (IEC-6) e em células epiteliais transformadas (Caco-2), com exceção da exposição aguda ao acetaldeído, indometacina, resveratrol e quercetina que inibem a captação do butirato nas duas linhas celulares. Isto pode ser explicado pelo facto de o butirato ter efeitos opostos em células cancerígenas e em células não cancerígenas [38].

A captação do butirato em células tumorais (Caco-2) é inibida pela exposição aguda e crónica a vários xenobióticos (etanol, acetaldeído, indometacina, resveratrol e quercetina) [4]. A captação do butirato em baixa concentração (correspondente à concentração encontrada entre as refeições) é reduzida pela exposição aguda ao acetaldeído, ao ácido acetilsalicílico, à indometacina, à cafeína e à teofilina e aumentada pelo MDMA e é aumentada pela exposição crónica à cafeína e diminuída pelo tetrahydrocannabinol e MDMA. Por outro lado, a exposição aguda ao acetaldeído, à indometacina e ao MDMA reduzem a captação do butirato em alta concentração (correspondente à concentração obtida após

digestão de fibras da dieta), enquanto o ácido acetilsalicílico aumenta-a e a captação do butirato em alta concentração não é afetada pela exposição crónica a qualquer um destes agentes. A influência que estes compostos têm no desenvolvimento/defesa do CCR pode ser explicada pela alteração da captação do butirato que eles provocam, explicando porque os anti-inflamatórios não esteroides e o tetrahydrocannabinol têm um efeito protetor e o acetaldeído um papel promotor no aparecimento do CCR [4]. Adicionalmente em células não tumorais (IEC-6), a exposição aguda ao etanol e ao seu metabolito (acetaldeído) reduz a captação de butirato, podendo explicar o efeito promotor que estes agentes têm no CCR [38].

Recentemente, verificou-se que a modulação da atividade do MCT1 pode estar envolvida no efeito anticarcinogénico de alguns polifenóis. De facto, a captação do butirato em baixa concentração é diminuída pela exposição aguda ao resveratrol, quercetina, miricetina e crisina e aumentada pelo xanto-humulol, catequina e epicatequina e é diminuída por exposição crónica à miricetina, rutina, crisina e xantohumulol, mas aumentada pela quercetina e epigallocatequina galato (EGCG). Por outro lado, a captação do butirato em alta concentração é diminuída pela exposição aguda ao resveratrol, quercetina, miricetina, crisina, EGCG e epicatequina, e aumentada pela exposição crónica à catequina, quercetina, miricetina, rutina, EGCG e crisina. No entanto, a combinação de polifenóis com o butirato não modifica as ações do butirato sobre a viabilidade celular, proliferação celular, diferenciação e apoptose [45]. Este efeito dos polifenóis no transporte do butirato pode contribuir para o seu conhecido efeito anticarcinogénico. Nos últimos anos, vários estudos mostraram que os polifenóis e os alimentos ricos nestes compostos (frutas e vegetais) têm um papel protetor contra o desenvolvimento do CCR [46].

Por último, o ácido quenodesoxicólico é um inibidor competitivo da captação de butirato em células não tumorais, inibindo a captação mediada quer pelo MCT1 quer pelo SMCT1 apesar do efeito inibitório ser maior para o MCT1. Este mecanismo pode contribuir para o efeito pró-carcinogénico do ácido quenodesoxicólico a nível intestinal [29].

6.3 Mucosa normal vs CCR

O butirato tem ações diferentes nos colonócitos normais e nos colonócitos neoplásicos, pelo menos no que diz respeito à proliferação celular e à apoptose (citado em [16, 47, 48]) e este fenômeno foi designado pelo “Paradoxo do Butirato”. A ação do butirato depende pois do fenótipo celular (citado em [33]). Em células cancerígenas, não diferenciadas e muito proliferativas, o butirato inibe a proliferação, aumenta a diferenciação e a apoptose. Nas células normais ou em células diferenciadas, a proliferação e a regeneração do epitélio com lesão não é afetado pela exposição ao butirato. Isto demonstra que o butirato pode exercer um efeito antiproliferativo na progressão tumoral, mas a sua produção é segura e não tem consequências para o crescimento do epitélio normal [10].

No epitélio intestinal normal, o butirato aumenta a proliferação dos colonócitos da base da cripta intestinal onde a sua concentração é baixa e induz a diferenciação e apoptose das células no topo da cripta onde a sua concentração é alta (citado em [23, 49]). A perfusão da mucosa normal com uma solução de butirato com uma concentração semelhante à concentração fisiológica estimula a proliferação das células das criptas em ratos. Os AGCC têm um efeito trófico sobre a mucosa retal humana e a sua ausência está associada a atrofia da mucosa e morte dos colonócitos (citado em [25, 31]).

6.4 Efeitos Celulares do butirato

6.4.1 Ciclo Celular

A ciclina B1, a ciclina D1 e a p21 são reguladores do ciclo celular com um papel importante na carcinogênese colo-retal e cuja expressão pode ser alterada pela exposição ao butirato. O butirato induz paragem do ciclo celular via mecanismos dependentes e independentes da p21 [43]. A p21^(WAF1/CIP1) é um inibidor das cinases dependentes de ciclinas que regula a apoptose, a diferenciação celular e induz paragem do ciclo celular na fase G1. A sua expressão encontra-se reduzida no CCR [50]. O butirato induz a expressão

da p21 mediante a inibição da HDAC [9, 50], ativando o promotor da p21, num mecanismo que é independente da p53 [25, 51]. A administração de butirato aumenta os níveis do RNAm e da proteína p21 e reduz a incidência de CCR induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratinhos [52]. A atuação do butirato no ciclo celular por mecanismos independentes da p21 envolve a ativação de membros da família INK4 (inibidores CDK) ou a estabilização da p27^{KIP1} [43].

O butirato diminui a transcrição da ciclina D1 [53] e da ciclina B1 [9] que têm um papel importante na carcinogénese intestinal, induzindo a paragem do ciclo celular e a diferenciação das células neoplásicas [25, 27].

6.4.2 Apoptose

A apoptose pode ser ativada pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pelo recetor CD95 (Fas) e por alguns membros da superfamília do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). A via intrínseca é caracterizada pela ativação mitocondrial que leva à libertação de citocromo-c e à formação do apoptossoma. As duas vias convergem na ativação da cascata de caspases que clivam moléculas estruturais levando à morte celular (citado em [1]). O butirato estimula a apoptose através da ativação de mecanismos diferentes em duas linhas celulares distintas [54].

O TGF- β é um importante regulador da proliferação dos colonócitos. O TGF- β ao ligar-se ao seu recetor induz a fosforilação do Smad-2 e do Smad-3 que posteriormente formam um heterodímero com o Smad-4. Este complexo regula a transcrição de genes, como o p27 e o *c-myc*. A fosforilação do Smad-3 é amplificada pelo butirato. Assim, o efeito pró-apoptótico do butirato pode em parte ser explicado pela regulação da fosforilação do Smad-3 [13, 55].

O butirato causa sobre-regulação do *death receptor 5* (DR5) nas células neoplásicas sensibilizando-as para a apoptose induzida por um outro agente quimioterapêutico, o *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), sem afetar as células normais

(citado em [43]). O butirato estimula seletivamente a expressão do DR5 sem afetar a expressão dos outros recetores para o TRAIL (DR4, DcR1 e DcR2). Enquanto que as células neoplásicas expressam como recetor o DR5, as células normais expressam o DcR1 ou DcR2 que são recetores que não ativam a apoptose [56].

O butirato induz a apoptose através da hiperacetilação das histonas, que resulta na ativação da caspase-3. A incubação de células HT-29 com butirato aumenta o número de células apoptóticas, verificando-se aumento da atividade da caspase-3 e da caspase-9 sugerindo que a apoptose é ativada pela via mitocondrial nesta linha celular [1]. O butirato também induz a apoptose em células Caco-2 pela via mitocondrial, através da sobreexpressão da Bak e da translocação do citocromo-c para o citoplasma ocorrendo a formação do apoptossoma e a ativação das caspases [57]. Estudos *in vivo* mostram que a apoptose desencadeada pelo butirato está associada a uma alteração da expressão das proteínas da família Bcl2, ocorrendo sobreexpressão da BAK que é uma proteína proapoptótica e diminuição da BclxL que é uma proteína antiapoptótica [23, 31, 58].

A elevação da concentração de AGCC no lúmen do cólon não aumenta diretamente a taxa de apoptose dos colonócitos normais, mas causa um aumento significativo após a indução de um dano celular causado por um genotóxico [59]. Estes dados indicam que o butirato não induz apoptose *per se*, mas sensibiliza as células para o dano celular, o que também pode explicar as diferentes ações que ele tem nas células epiteliais transformadas e nas células epiteliais não transformadas (citado em [60]).

6.4.3 Viabilidade, proliferação e diferenciação celular

O butirato diminui a viabilidade e a proliferação celular e aumenta a diferenciação celular e a apoptose [2, 29, 45]. O butirato induz a diferenciação de colonócitos neoplásicos *in vitro* produzindo um fenótipo tipicamente associado ao de uma célula madura normal e isto é demonstrado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina [25, 45, 61]. O butirato consegue estimular um fenótipo absorptivo em células Caco-2 (citado em [62]). A

diferenciação induzida pelo butirato altera a morfologia e a ultraestrutura das células tumorais, resultando na perda da maioria das características malignas das células cancerígenas (citado em [58]).

A proteína de resistência do cancro da mama (BCRP) é uma proteína da superfamília de transportadores ABC que promove o efluxo pela membrana apical do butirato no cólon humano. A sua expressão é abundante nos colonócitos normais, ao contrário do que acontece no CCR em que a sua expressão se encontra reduzida. Assim, a sua reduzida expressão no CCR pode explicar porque estas células são mais sensíveis aos efeitos do butirato do que os colonócitos não neoplásicos. Além disso, a inibição da BCRP potencia o efeito do butirato sobre a proliferação celular em colonócitos normais [63].

6.4.4 Outros efeitos celulares

Múltiplos estudos utilizando análise proteómica tentaram identificar as vias pelas quais o butirato exerce a sua ação quimiopreventiva. *Tan et al* mostraram que o butirato regula a expressão dos genes envolvidos no controlo do ciclo celular, da apoptose, do metabolismo e da metastização [15].

O butirato altera a expressão de várias proteínas reguladoras do ciclo celular (p16, p21 e *c-myc*) e reduz a síntese de nucleotídeos, induzindo a paragem do crescimento celular. Aumenta a expressão de genes supressores tumorais (galectina-1, metalotioneína-1X e proibitina-2), de proteínas que ativam a apoptose (complexos de transporte da cadeia transportadora de eletrões e sintase do ATP), de enzimas envolvidas no metabolismo celular (desidrogénase do malato, desidrogénase do oxoglutarato e transaldólase) e de proteínas associadas ao citoesqueleto (citoesqueleto 18, citoesqueleto 19 e filaminas), diminuindo o potencial metastático das células [15]. A análise proteómica de duas linhas celulares, uma sensível e outra resistente ao butirato, identificou 154 proteínas que são expressas de modo diferencial após exposição ao butirato [64].

A influência do butirato na expressão de alguns outros genes foi alvo de estudos, cujos resultados são apresentados em seguida.

A) A proteção contra o CCR exercida pelo butirato pode envolver a ativação de enzimas que metabolizam os carcinogêneos [65], nomeadamente vários tipos de glutathione-S-transferase [16, 35].

B) O butirato diminui a expressão de neurofilina-1, uma molécula essencial na regulação da apoptose e da angiogénese que promove a migração celular e a sobrevivência das células neoplásicas [66]. Um estudo *in vivo* mostrou que os níveis de neurofilina-1 estão inversamente associados aos níveis de butirato no cólon [67].

C) A existência de níveis intestinais mais elevados de butirato estão associados à diminuição da expressão de queratina-8, uma molécula que confere resistência à apoptose, no CCR [68].

D) O butirato estimula a expressão do RNAm e da proteína do gene *homeobox Cdx2* através da ativação transcripcional do seu promotor, o que pode representar um novo mecanismo pelo qual controla a proliferação e diferenciação das células do CCR. O Cdx-2 é um fator de transcrição produzido no epitélio intestinal que inibe o crescimento celular e estimula a proliferação intestinal [69].

E) O butirato estimula a produção de mucina-2 numa linha celular de cancro do cólon, sendo que a mucina-2 é importante na proteção contra doenças colo-retais [70].

F) O butirato diminui o potencial metastático e invasivo das células neoplásicas através da diminuição da atividade de vários genes envolvidos na capacidade de metastização, como a metaloproteinase de matriz (citado em [43]).

G) A GPR43 e a GPR109A são recetores para o butirato que não são expressos nas células neoplásicas e que podem atuar como genes supressores tumorais. A reexpressão

da GPR43 numa linha de adenocarcinoma induz a paragem celular e o aumento da apoptose depois do tratamento com butirato/propionato [24, 71].

Todos estes estudos demonstram que o butirato, para além de regular a expressão de genes envolvidos no controlo do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose, regula outros genes que têm um papel importante na manutenção da homeostasia intestinal.

7. Butirato e Doença Inflamatória Intestinal

A DII de longa duração aumenta o risco de desenvolvimento de CCR (citado em [32]). Foram reportadas alterações na concentração de butirato e na sua oxidação na Colite Ulcerosa (CU). No entanto, nos doentes com CU inativa a oxidação do butirato *in vivo* é normal, o que sugere que a alteração da sua oxidação não é um defeito primário na CU [32]. As citocinas pró-inflamatórias que são expressas abundantemente na DII, nomeadamente o TNF α e o INF γ , diminuem a expressão do MCT1 via inibição da sua transcrição. A diminuição da oxidação do butirato na mucosa inflamada pode assim ser consequência da redução da expressão do MCT1, com consequente diminuição da captação do butirato, o que pode afetar os seus efeitos reguladores a nível celular [72]. A diminuição da expressão do MCT1 é maior nos doentes que têm DII e CCR do que naqueles que têm DII que não complicou com CCR [32]. De modo semelhante, o TNF α também diminui a expressão do SMCT1 via inibição da sua transcrição [73]. Assim, as citocinas pró-inflamatórias diminuem a expressão dos dois principais transportadores do butirato nos colonócitos, diminuindo deste modo a sua oxidação na mucosa inflamada. A diminuição da captação e da oxidação do butirato que ocorre durante a inflamação pode explicar porque os doentes com DII têm um risco maior de desenvolver CCR.

A inativação do NF-Kb é o efeito anti-inflamatório mais estudado do butirato. Em doentes com CU, a administração de butirato diminuiu os níveis de NF-Kb e a manifestação clínica da doença. Este efeito anti-inflamatório do butirato via inibição do NF-Kb reduz a concentração de mieloperoxidase, ciclo-oxigenase 2, moléculas de adesão e citocinas (citado em [33]).

O butirato induz a expressão da catalase, e inibe a expressão da ciclooxigenase2 e da superóxidodismutase2 (citado em [8, 74]), o que também contribui para a sua ação anti-inflamatória. A indução da catalase reduz a concentração de peróxido de hidrogénio que é

genotóxico. O butirato sozinho ou numa mistura com outros AGCC tem um efeito protetor contra danos no DNA causados pelo H_2O_2 [75].

8. Conclusão

O butirato é o principal produto da fermentação das fibras no intestino humano e tem um papel importante na manutenção da homeostasia intestinal. As suas ações são múltiplas e envolvem diferentes mecanismos de ação, sendo o mais importante a modulação epigenética da expressão de vários genes através da sua capacidade de inibir a HDAC. Entre as várias ações induzidas pelo butirato destacam-se a indução da apoptose, o bloqueio do ciclo celular e a estimulação da diferenciação celular.

A produção de butirato pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais as fibras exercem o seu efeito protetor relativamente ao CCR, pois o aumento da concentração de butirato também é acompanhada por outras alterações a nível intestinal. Embora a maioria dos estudos apontem para que o butirato tenha um papel protetor sobre a mucosa colónica, mais estudos são necessários, nomeadamente estudos *in vivo*, para se conseguir perceber as ações que ele desencadeia na mucosa do cólon normal e no CCR.

Referências Bibliográficas

1. Wang, L.L., H-S.; Xia, H, *Sodium Butyrate Induces Human Colon Carcinoma HT-29 Cell Apoptosis Through a Mitochondrial Pathway*. J Int Med Res, 2009. **37**(3): p. 803-811.
2. Young, G.P., et al., *Dietary fibre and colorectal cancer: A model for environment – gene interactions*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(6): p. 571-584.
3. Bordonaro, M., D.L. Lazarova, and A.C. Sartorelli, *Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk?* Cell Cycle, 2008. **7**(9): p. 1178-1183.
4. Gonçalves, P., et al., *Modulation of butyrate transport in Caco-2 cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(4): p. 325-336.
5. Rose, D.J., et al., *Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern*. Nutr Rev, 2007. **65**(2): p. 51-62.
6. Pool-Zobel, B.L., *Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data*. Br J Nutr, 2007. **93**(S1): p. S73.
7. Pool-Zobel, B., et al., *Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer*. Br J of Nutr, 2007. **87**(S2): p. S273.
8. Pool-Zobel, B.L. and J. Sauer, *Overview of Experimental Data on Reduction of Colorectal Cancer Risk by Inulin-Type Fructans*. J Nutr, 2007. **137**(11): p. 2580S-2584S.
9. Hinnebusch, B.F., et al., *The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation*. J Nutr, 2002. **132**(5): p. 1012-1017.
10. Comalada, M., et al., *The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype*. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**(8): p. 487-497.

11. Sengupta, S., J.G. Muir, and P.R. Gibson, *Does butyrate protect from colorectal cancer?* J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(1 Pt 2): p. 209-18.
12. RORENO. *Taxas de incidência de cancro na região Norte de Portugal*. [cited 2011; Available from: <http://www.roreno.com.pt/pt/estatisticas/graficos/top-10.html>.
13. Kim, Y.S. and J.A. Milner, *Dietary Modulation of Colon Cancer Risk*. J Nutr, 2007. **137**(11): p. 2576S-2579S.
14. O'Keefe, S.J., et al., *Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk*. J Nutr, 2009. **139**(11): p. 2044-8.
15. Tan, H.T., et al., *Quantitative and Temporal Proteome Analysis of Butyrate-treated Colorectal Cancer Cells*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(6): p. 1174-1185.
16. Rosignoli, P., et al., *Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate*. Eur J Nutr, 2008. **47**(6): p. 301-309.
17. Nkondjock, A., *Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study*. Int J Epidemiol, 2003. **32**(2): p. 200-209.
18. Goldstein, N.S., *Serrated Pathway and APC (Conventional)-Type Colorectal Polyps*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**(1): p. 146-153.
19. Bordonaro, M. and A.C. Sartorelli, *Fiber, cancer stem cells and the Wnt signaling continuum*. Chinese Journal of Cancer, 2008. **27**(7): p. 1-4.
20. Lazarova, D.L., et al., *Linear relationship between Wnt activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate*. Int J Cancer, 2004. **110**(4): p. 523-531.
21. Park, Y., et al., *Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer*. J Am Med Assoc, 2005. **294**(22): p. 2849-2857.
22. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-1501.

23. Canani, R.B., et al., *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(12): p. 1519-28.
24. Thangaraju, M., et al., *GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2826-32.
25. Lecona, E., et al., *Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms*. Biochem J, 2008. **409**(1): p. 311.
26. Andriamihaja, M., et al., *Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: Implications concerning its growth-inhibitory effect*. J Cell Physiol, 2009. **218**(1): p. 58-65.
27. Archer, S.Y., et al., *The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(4): p. G696-703.
28. Blouin, J.-M., et al., *Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2591-2601.
29. Gonçalves, P., et al., *Inhibition of butyrate uptake by the primary bile salt chenodeoxycholic acid in intestinal epithelial (IEC-6) cells*. J Cell Biochem (in press).
30. Dronamraju, S.S., et al., *Differential Antineoplastic Effects of Butyrate in Cells With and Without a Functioning DNA Mismatch Repair*. Nutr Cancer, 2009. **62**(1): p. 105-115.
31. I.T, J., *Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(8): p. 1171-1178.
32. Thibault, R., et al., *Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: A transport deficiency*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(4): p. 684-695.
33. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.

34. Lei He, X.L., He-Sheng Luo, Han Rong, Jia Cai, *Possible mechanism for the regulation of glucose on proliferation, inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate*. World J Gastroenterol, 2007. **13**: p. 4015-4018.
35. *Nutrient and antioxidant modulation of apoptosis in gastric and colon cancer cells*. Canc Biol Ther, 2006. **5**(6): p. 569-572.
36. Morris, M. and M. Felmler, *Overview of the Proton-coupled MCT (SLC16A) Family of Transporters: Characterization, Function and Role in the Transport of the Drug of Abuse γ -Hydroxybutyric Acid*. The AAPS Journal, 2008. **10**(2): p. 311-321.
37. Ganapathy, V., et al., *Biological functions of SLC5A8, a candidate tumor suppressor*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(1): p. 237-240.
38. Gonçalves, P., J. Araújo, and F. Martel, *Characterization of Butyrate Uptake by Nontransformed Intestinal Epithelial Cell Lines*. J Membr Biol, 2011. **240**(1): p. 35-46.
39. Ganapathy, V., et al., *Sodium-coupled Monocarboxylate Transporters in Normal Tissues and in Cancer*. The AAPS Journal, 2008. **10**(1): p. 193-199.
40. Halestrap, A. and D. Meredith, *The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond*. Pflügers Arch, 2004. **447**(5): p. 619-628.
41. Cuff, M.A., D.W. Lambert, and S.P. Shirazi-Beechey, *Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1*. J Physiol, 2002. **539**(2): p. 361-371.
42. Cuff, M.A. and S.P. Shirazi-Beechey, *The importance of butyrate transport to the regulation of gene expression in the colonic epithelium*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(6): p. 1100-1102.
43. Gupta, N., et al., *SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter*. Life Sci, 2006. **78**(21): p. 2419-2425.

44. Thangaraju, M., et al., *Sodium-Coupled Transport of the Short Chain Fatty Acid Butyrate by SLC5A8 and Its Relevance to Colon Cancer*. J Gastrointest Surg, 2008. **12**(10): p. 1773-1782.
45. Gonçalves, P., et al., *In Vitro Studies on the Inhibition of Colon Cancer by Butyrate and Polyphenolic Compounds*. Nutr Cancer, 2011. **63**(2): p. 282-294.
46. Araújo, J.R., P. Gonçalves, and F. Martel, *Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines*. Nutr res (New York, N.Y.), 2011. **31**(2): p. 77-87.
47. Lupton, J.R., *Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy*. J Nutr, 2004. **134**(2): p. 479-482.
48. Scheppach, W. and F. Weiler, *The butyrate story: old wine in new bottles?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004. **7**(5).
49. de Silanes, I.L., et al., *Acquisition of Resistance to Butyrate Enhances Survival after Stress and Induces Malignancy of Human Colon Carcinoma Cells*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4593-4600.
50. Chen, Y.-X., et al., *Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines* World J Gastroenterol, 2004. **10**(18): p. 2643-2646.
51. Kobayashi, H., E.M. Tan, and S.E. Fleming, *Sodium Butyrate Inhibits Cell Growth and Stimulates p21WAF1/CIP1 Protein in Human Colonic Adenocarcinoma Cells Independently of p53 Status*. Nutr Cancer, 2003. **46**(2): p. 202-211.
52. Lu, R., et al., *Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer*. Epigenetics, 2008. **3**(6): p. 330-335.
53. Maier, S., et al., *Butyrate and vitamin D3 induce transcriptional attenuation at the cyclin D1 locus in colonic carcinoma cells*. J Cell Physiol, 2009. **218**(3): p. 638-42.
54. Avivi-Green, C., et al., *Different Molecular Events Account for Butyrate-Induced Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines*. J Nutr, 2002. **132**(7): p. 1812-1818.

55. Nguyen, K.A., et al., *Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut*. *Ann Surg*, 2006. **243**(5): p. 619-25; discussion 625-7.
56. Kim, Y.-H., et al., *Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(10): p. 1813-1820.
57. Ruemmele, F.M., et al., *Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway*. *Gut*, 2003. **52**(1): p. 94-100.
58. Williams, E.A., J.M. Coxhead, and J.C. Mathers, *Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms*. *Proc Nutr Soc*, 2003. **62**(1): p. 107-15.
59. Le Leu, R.K., et al., *Effect of resistant starch on genotoxin-induced apoptosis, colonic epithelium, and luminal contents in rats*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(8): p. 1347-1352.
60. Corfe, B.M., et al., *A study protocol to investigate the relationship between dietary fibre intake and fermentation, colon cell turnover, global protein acetylation and early carcinogenesis: the FACT study*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 332.
61. Fung, K.Y.C., et al., *Proteomic Analysis of Butyrate Effects and Loss of Butyrate Sensitivity in HT29 Colorectal Cancer Cells*. *J Proteome Res*, 2009. **8**(3): p. 1220-1227.
62. Augenlicht, L.H., et al., *Short Chain Fatty Acids and Colon Cancer*. *J Nutr*, 2002. **132**(12): p. 3804S-3808S.
63. Gonçalves, P., I. Gregório, and F. Martel, *The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein*. *Am J Physiol - Cell Ph*, 2011. **301**(5): p. C984-C994.
64. Fung, K.Y.C., et al., *Butyrate-Induced Apoptosis in HCT116 Colorectal Cancer Cells Includes Induction of a Cell Stress Response*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(4): p. 1860-1869.

65. Scharlau, D., et al., *Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre*. *Mutat Res/Rev Mutat* **682**(1): p. 39-53.
66. Yu, D.C., et al., *Butyrate suppresses expression of neuropilin 1 in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 276.
67. Yu, D.C., et al., *Short-chain fatty acid level and field cancerization show opposing associations with enteroendocrine cell number and neuropilin expression in patients with colorectal adenoma*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 27.
68. Khan, A.Q., et al., *Keratin 8 expression in colon cancer associates with low faecal butyrate levels*. *BMC Gastroenterol*, 2011. **11**: p. 2.
69. Domon-Dell, C., et al., *Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells*. *Gut*, 2002. **50**(4): p. 525-529.
70. Hatayama, H., et al., *The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **356**(3): p. 599-603.
71. Tang, Y., et al., *G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(4): p. 847-856.
72. Thibault, R., et al., *Down-Regulation of the Monocarboxylate Transporter 1 Is Involved in Butyrate Deficiency During Intestinal Inflammation*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(6): p. 1916-1927.
73. Borthakur, A., et al., *The probiotic Lactobacillus plantarum counteracts TNF- α -induced downregulation of SMCT1 expression and function*. *Am J Physiol - Gastr L*, 2010. **299**(4): p. G928-G934.
74. Tong, X., L. Yin, and C. Giardina, *Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **317**(2): p. 463-71.

75. Rosignoli, P., et al., *Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(10): p. 1675-1680.

**ANEXO – NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE
ARTIGOS AOS ARQUIVOS DE MEDICINA**

Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: www.icmje.org).

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo à sua efectivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original.

Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA.

Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes à que é submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efectuada sobre o material apresentado à revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêm publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a recepção sem avaliação externa.

TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa.

O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências.

Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objecto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

Os comentários não devem apresentar resumos.

Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa selecção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspectiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Cartas ao editor

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

Revisões de livros ou software

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objecto da revisão.

As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado à esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título.

Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito.

Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efectuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

Unidades de medida

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

Abreviaturas

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, excepto no caso das unidades de medida.

Nomes de medicamentos

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

Página do título

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);
- 3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);
- 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;
- 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;
- 6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;
- 7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

Autoria

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) concepção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redacção do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. António Silva colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Silva efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.

Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

Agradecimentos

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

Resumos

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e séries de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

Palavras-chave

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

Introdução

Deve mencionar os objectivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efectuadas as referências indispensáveis para justificar os objectivos do estudo.

Métodos

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efectuadas no final desta secção.

Análise dos dados

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses, com o uso de valores de p, que não fornecem informação quantitativa importante.

Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

Considerações éticas e consentimento informado

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial (www.wma.net).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

Resultados

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras.

Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

Apresentação de dados numéricos

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior à permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como t ou χ^2 , e os coeficientes de correlação devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de p devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de p=NS, p<0,05 ou p>0,05, na medida em que a informação contida no valor de P pode ser importante. Nos casos em

que o valor de p é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-se como $p < 0,0001$.

Tabelas e figuras

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

*, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida à largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato electrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

Discussão

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspectos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objectivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

Referências

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números das referências devem ser apresentados entre parentesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescentam alguns exemplos:

1. Artigo

• Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

2. Artigo com Organização como Autor

• The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

• Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

5. Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone;1996.

7. Livro (Organização como Autor e Editor)

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute;1992.

8. Capítulo de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press;1995. p. 465-78.

9. Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adoptado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada indivíduo presente em fotografias, mesmo quando forem efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;
- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos aos ARQUIVOS DE MEDICINA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma carta de apresentação.

Carta de apresentação

Deve incluir a seguinte informação:

- 1) Título completo do manuscrito;
- 2) Nomes dos autores com especificação do contributo de cada um para o manuscrito;
- 3) Justificação de um número elevado de autores, quando aplicável;
- 4) Tipo de artigo, de acordo com a classificação dos ARQUIVOS DE MEDICINA;
- 5) Fontes de financiamento, incluindo bolsas;
- 6) Revelação de conflitos de interesse ou declaração da sua ausência;
- 7) Declaração de que o manuscrito não foi ainda publicado, na íntegra ou em parte, e que nenhuma versão do manuscrito está a ser avaliada por outra revista;
- 8) Declaração de que todos os autores aprovaram a versão do manuscrito que está a ser submetida;
- 9) Assinatura de todos os autores.

É dada preferência à submissão dos manuscritos por e-mail (submit@arquivosdemedicina.org).

O manuscrito e a carta de apresentação devem, neste caso, ser enviados em ficheiros separados em formato word. Deve ser enviada por fax (225074374) uma cópia da carta de apresentação assinada por todos os autores.

Se não for possível efectuar a submissão por e-mail esta pode ser efectuada por correio para o seguinte endereço:

ARQUIVOS DE MEDICINA
Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200 – 319 Porto, Portugal

Os manuscritos devem, então, ser submetidos em triplicado (1 original impresso apenas numa das páginas e 2 cópias com impressão frente e verso), acompanhados da carta de apresentação.

Os manuscritos rejeitados ou o material que os acompanha não serão devolvidos, excepto quando expressamente solicitado no momento da submissão.

CORRECÇÃO DOS MANUSCRITOS

A aceitação dos manuscritos relativamente aos quais forem solicitadas alterações fica condicionada à sua realização.

A versão corrigida do manuscrito deve ser enviada com as alterações sublinhadas para facilitar a sua verificação e deve ser acompanhada duma carta respondendo a cada um dos comentários efectuados.

Os manuscritos só poderão ser considerados aceites após confirmação das alterações solicitadas.

MANUSCRITOS ACEITES

Uma vez comunicada a aceitação dos manuscritos, deve ser enviada a sua versão final em ficheiro de Word®, formatada de acordo com as instruções acima indicadas.

No momento da aceitação os autores serão informados acerca do formato em que devem ser enviadas as figuras.

A revisão das provas deve ser efectuada e aprovada por todos os autores dentro de três dias úteis. Nesta fase apenas se aceitam modificações que decorram da correcção de gralhas.

Deve ser enviada uma declaração de transferência de direitos de autor para os ARQUIVOS DE MEDICINA, assinada por todos os autores, juntamente com as provas corrigidas.