



Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARIANA GRANCIERI

**YACON (*Smallanthus sonchifolius*) NA MODULAÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON
EM MODELO ANIMAL**

ALEGRE/ES
2016

Mariana Grancieri

**YACON (*Smallanthus sonchifolius*) NA MODULAÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON
EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Neuza Maria Brunoro Costa

Coorientadoras: Prof.^a Mirelle Lomar Viana e Prof.^a Maria das Graças Vaz Tostes

ALEGRE/ES

2016

MARIANA GRANCIERI

**YACON (*Smallanthus sonchifolius*) NA MODULAÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON
EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em 03 de Fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof.^a Dra. Mirelle Lomar Viana
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof.^a Dra. Maria das Graças Vaz Tostes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof.^a Dra. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora externa

Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G749y Grancieri, Mariana, 1993-
Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na modulação do câncer de cólon em modelo animal / Paula de Almeida Claudino. – 2016.
93 f. : il.

Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa.

Coorientadoras: Mirelle Lomar Viana ; Maria das Graças Vaz Tostes.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Fruto-oligossacarídeos. 2. Endotoxemia. 3. Permeabilidade intestinal.
4. Farinha de yacon. 5. imunologia. 6. Histologia. I. Costa, Neuza Maria
Brunoro. II. Viana, Mirelle Lomar. III. Tostes, Maria das Graças Vaz.
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias.
V. Título.

CDU: 664

Agradecimentos

Primeiramente, obrigada meu Deus! Obrigada por guiar meus caminhos e me conceder força e paz nos momentos de aflição e cansaço e me proporcionar tantas alegrias e conquistas!

Aos meus pais, Adriana e Marcelo, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por me ajudarem a realizar meus sonhos. Essa vitória é para vocês!

À minha orientadora, professora Neuza: Não há palavras que expressem meu respeito, admiração, carinho e gratidão a você! Muito obrigada pelos valiosos ensinamentos e amizade em todos esses anos.

Ao Ulip, pela companhia, compreensão e apoio durante todos esses anos.

À minha irmã Juliana, pelo apoio e amizade.

A todos meus familiares que sempre torceram e acreditaram em mim.

Às professoras Mirelle e Graça, por sempre estarem dispostas a me ajudar, compartilhando conhecimentos e me ajudando no que se fizesse necessário, além da amizade e companhia em todos esses anos.

À Laíz, por ser uma grande amiga e companheira que me auxiliou e esteve presente em todos os momentos, desde o início da graduação.

Às professoras Daniela e Mariana, pelo imprescindível amparo nas análises e amizade.

Ao professor Sérgio, pelo auxílio nas análises estatísticas e constante apoio no que fosse preciso.

Às meninas da Iniciação Científica: Priscila, Daniela, Thaísa e Patrícia, além do Alexandre, pela grande e imprescindível ajuda durante todo experimento.

Aos técnicos de laboratório, Amanda, Letícia, Gerusa, Marisa e Eduardo, por estarem sempre prestativos a ajudar.

À professora Louisiane e a todos do Laboratório de Patologia Animal, pelo suporte na parte experimental e nas análises histológicas.

Aos colegas do PCTA pelos bons momentos vividos e toda amizade.

Ao secretário do PCTA, Toninho, pela assistência no que fosse necessário, sempre com bom humor e paciência.

Aos meus amigos, principalmente Thaísa, Letícia de Nadai, Lara, Carol, Bruno, Letícia Louzada, Natália, Fernando, Leila, Larissa e Vagner, por estarem sempre comigo, alegrando minha vida!

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade e contribuição à minha formação acadêmica.

Ao CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do projeto.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Farmácia e Nutrição e do PCTA, por todo ensinamento compartilhado e amizade.

Aos professores membros da banca: André, Mariana, Graça e Mirelle que gentilmente aceitaram participar e colaborar com este trabalho.

E por todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

GRANCIERI, Mariana. **Yacon (*smallanthus sonchifolius*) na modulação do câncer de cólon em modelo animal**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES. Orientadora: Prof.^a Neuza Maria Bruno Costa. Coorientadoras: Prof.^a Mirelle Lomar Viana e Prof.^a Maria das Graças Vaz Tostes.

O câncer colorretal (CC) pode induzir complicações clínicas e até mesmo óbito do paciente. A farinha de yacon (FY) (*Smallanthus sonchifolius*) é rica em frutooligossacarídeos (FOS) que são fermentados por bifidobactérias produzindo efeitos benéficos à saúde intestinal. Seu efeito no CC, entretanto, é ainda desconhecido. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos intestinais e imunológicos da suplementação com a farinha de yacon em modelo animal de câncer de cólon induzido. Ratos machos *Wistar*, foram divididos em grupo S (sem CC e sem FY, n=10), grupo C (com CC e sem FY, n=12), grupo Y (sem CC e com FY, n=10) e grupo CY (com CC e FY, n=12). Durante cinco semanas, os grupos C e CY receberam, por via subcutânea, uma dose semanal de 25 mg/kg de peso da droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH), seguidas por oito semanas para o desenvolvimento do CC. Durante as 13 primeiras semanas do estudo, todos os grupos receberam ração padrão comercial. Após esse período, os grupos Y e CY consumiram dieta com FY em quantidades suficientes para fornecer 7,5% de FOS por oito semanas e os demais grupos, consumiram dieta AIN-93M. Após o período experimental foram determinados: permeabilidade intestinal, pH intraluminal, endotoxemia, focos de criptas aberrantes (FCA), histologia qualitativa (diâmetro apical, diâmetro basal e profundidade de cripta, além da contagem de criptas por campo), níveis de ânion superóxido e óxido nítrico e a capacidade antioxidante total do plasma (CAT). Os resultados foram avaliados utilizando-se Two-way ANOVA (análise de variância) seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). A farinha de yacon exerceu efeito benéfico e significativo sobre a permeabilidade intestinal, uma vez que a excreção de lactulose e manitol urinários foi menor nos grupos Y e CY, comparados aos grupos controles (S e C). Além disso, houve redução do pH intraluminal, no percentual dos níveis de FCA, além de ter aumentado a profundidade e número das criptas colônicas, a CAT e metabolismo oxidativo, via produção de

ânion superóxido. Porém não foi observada efetividade da farinha de yacon sobre o número de FCAs, na endotoxemia e na liberação de óxido nítrico. Pode-se concluir que a FY foi eficaz e benéfica na modulação do câncer colorretal em modelo animal, contudo, são necessários outros estudos que elucidem os mecanismos pelos quais isso ocorre.

Palavras-Chave: frutoligossacarídeos, endotoxemia, permeabilidade intestinal, farinha de yacon, imunologia, histologia.

Abstract

GRANCIERI, Mariana. **Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in colon cancer modulation in animal model**. 2016. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Federal University of Espirito Santo, Alegre - ES. Advisor: Neuza Maria Bruno Costa. Co-advisor: Mirelle Lomar Viana and Maria das Graças Vaz Tostes.

Colorectal cancer (CC) can induce clinical complications and even death of the patient. The yacon flour (FY) (*Smallanthus sonchifolius*) is rich in fructo-oligosaccharides (FOS) that are fermented by bifidobacteria producing beneficial effects on intestinal health. Its effect on the CC, however, is still unknown. The objective of this study was to investigate the intestinal and immunological effects of supplementation with yacon flour in animal model of induced colon cancer. Male Wistar rats were divided into groups S (without CC and without FY, n=10), C group (with CC and without FY, n=12), Y group (without CC and with FY, n=10) and CY group (with CC and FY, n=12). For five weeks, the C and CY groups received, subcutaneously, a weekly dose of 25 mg / kg weight of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) drug, followed by eight weeks for the development of CC. During the first 13 weeks of the study, all groups received standard commercial ration. After this period, the Y and CY groups consumed diet FY in amounts sufficient to provide 7.5% of FOS for eight weeks and the other groups consume AIN-93M diet. After the experimental period were determined: intestinal permeability, intraluminal pH, endotoxemia, aberrant crypt foci (ACF), qualitative histology (apical diameter, baseline diameter and crypt depth, beyond the crypts count per field) levels of anion superoxide and nitric oxide and plasma total antioxidant capacity (TAC). The data were analyzed by two-way ANOVA (analysis of variance) followed by Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Yacon flour exerts beneficial and significant effect on intestinal permeability, given that the urinary excretion of lactulose and mannitol was lower in Y and CY groups compared to control groups (S and C). Furthermore, there was a positive action in reducing the intraluminal pH, the percentage reduction in FCA levels, in addition to increased number and depth of the colonic crypts, TAC and oxidative metabolism via the production of superoxide anion. But it was not observed effectiveness of yacon flour on the number of ACF in endotoxemia and nitric oxide release. It may be concluded that the FY is effective and beneficial in the modulation of colorectal cancer in animal

model, however, further studies are required to elucidate the mechanisms by which this occurs.

Keywords: fructooligosaccharides, endotoxemia, intestinal permeability, yacon flour, immunology, histology.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da estrutura histológica do intestino grosso.....	20
Figura 2. Mucosa de cólon saudável e apresentando vários FCAs.....	29
Figura 3. Estrutura de uma inulina.....	31
Figura 4. Delineamento experimental do estudo.....	43
Figura 5. Mucosa e FCA no cólon de ratos Wistar.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da Farinha de yacon.....	44
Tabela 2. Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M suplementada com FY.....	45
Tabela 3. Peso inicial e final, consumo alimentar, ganho de peso e CEA.....	55
Tabela 4. Média dos valores de focos de criptas aberrantes totais e com menos que três e mais que três criptas por foco e FCA totais por segmento do intestino grosso.....	57
Tabela 5. Características morfológicas da mucosa do cólon.....	58
Tabela 6. pH intraluminal.....	60
Tabela 7. Capacidade Antioxidante Total do Plasma.....	60
Tabela 8. Liberação de ânion superóxido e óxido nítrico por neutrófilos, estimulados ou não por zimozan.....	61
Tabela 9. Porcentagem de excreção urinária de lactulose e manitol e a razão entre elas.....	63
Tabela 10. Tabela 10. Níveis de Endotoxina (EU/mL de plasma).....	64

Lista de Abreviaturas

% - porcentagem
°C – graus Celsius
µL - microlitro
AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AOM – Azometilhidrazina
APC - Células Apresentadoras de Antígeno
BCL-2 – Linfoma de células B2 (*B-cell lymphoma 2*)
CC - Câncer Colorretal
CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar
Da - Daltons
DACNT - Doenças e Agravos Crônicos não Transmissíveis
DMH - Dimetilhidrazina
DNA – Ácido Dextribonucléico
EP- Erro Padrão
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
EU - Unidade de Endotoxina
FCA - Focos de Criptas Aberrantes
FN-κB – Fator Nuclear Kappa beta
FOS – Frutooligossacarídeos
g - grama
GOS - Galactooligossacarídeos
GST - Glutathione S-transferase
HAT - Histonas Acetil Transferases
HDAC - Histonas Desacetilases
HE- Hematoxilina-eosina
HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN-γ – Interferon gama
IL- Interleucina
kg - quilograma
LAL – Lisato de Amebócito de Limulus
LPS - Lipopolissacarídeos

mg- miligrama

ml - mililitro

mMol - milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaNO₂ - Nitrito de Sódio

NO - Óxido Nítrico

NO²⁻-nitrito

O²⁻ - Ânion Superóxido

PBS - Solução Tampão Fosfato-Salina

ppm – partes por milhão

RNA – Ácido Ribonucléico

SFB - Soro Fetal Bovino

slgA - Imunoglobulina A secretória

SOD - Superóxido Dismutase

TB - Translocação Bacteriana

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta

TGI - Trato Gastrointestinal

TNF-α- Fator de Necrose Tumoral Alfa

XOS – xilooligossacarídeos

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Fisiologia e Defesa Intestinal.....	19
3.2 Câncer Colorretal.....	24
3.2.1 Carcinogênese experimental.....	28
3.3 Prebióticos e seus efeitos no organismo.....	29
3.4 Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	35
3.5 Yacon como fonte de FOS e sua relação com o câncer colorretal.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Delineamento experimental.....	41
4.3 Protocolo de elaboração da farinha de yacon.....	43
4.4 Diets experimentais.....	44
4.5 Consumo alimentar e alteração ponderal.....	46
4.6 Análise Histológica.....	46
4.6.1 Focos de Criptas Aberrantes.....	46
4.6.2 Histologia Qualitativa do Cólon.....	47
4.7 pH intraluminal do Cólon.....	47
4.8 Capacidade Antioxidante Total do Plasma.....	48
4.9 Preparo do estímulo: Zimozan opsonizado.....	48
4.10 Isolamento de Neutrófilos.....	48
4.11 Liberação de Ânion Superóxido.....	49
4.12 Dosagem de Óxido Nítrico.....	50
4.13 Permeabilidade intestinal.....	50
4.14 Endotoxemia.....	51
4.15 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Consumo alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar.....	53

5.2	Análises Histológicas.....	53
5.2.1	Focos de criptas aberrantes.....	53
5.2.2	Histologia qualitativa do cólon.....	54
5.3	pH intraluminal.....	59
5.4	Capacidade Antioxidante Total do Plasma.....	59
5.5	Liberção de Ânion Superóxido.....	59
5.6	Dosagem de Óxido Nítrico.....	59
5.7	Permeabilidade intestinal.....	62
5.8	Endotoxemia... ..	62
6.	DISCUSSÃO.....	65
7.	CONCLUSÃO.....	77
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	ANEXO.....	94

1 INTRODUÇÃO

A incidência das doenças e agravos crônicos não transmissíveis (DACNT) aumenta progressivamente no cenário mundial, entre os quais destaca-se o câncer. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de moléstias que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, cuja origem se dá por condições multifatoriais (INCA, 2014).

O câncer colorretal (CC) abrange tumores que acometem o cólon intestinal e o reto. Esse tipo de carcinoma, assim como a maioria das linhagens de câncer é resultado da interação entre fatores endógenos, como a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade avançada, além de fatores ambientais, como a dieta (INCA, 2015). Ainda, alterações na microbiota intestinal, como a disbiose, facilitam o desenvolvimento de processos inflamatórios, podendo promover a ativação de componentes carcinogênicos e a produção de compostos mutagênicos, como os radicais livres (CLARK, ROBIEN, SLAVIN, 2012). Segundo a última estimativa brasileira, realizada pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, o CC será o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo nas mulheres no biênio 2016/2017, sendo os principais índices nas regiões mais desenvolvidas (INCA, 2015).

Alguns compostos bioativos estão relacionados na modulação da microbiota intestinal, atuando benéficamente em muitos distúrbios que afetam o trato gastrointestinal (TGI), dentre eles o CC. Dentre esses compostos encontra-se o FOS (TOLOUDI, 2015; FIOCCHI, 2003; MACPHERSON; HARRIS, 2004). Estes são prebióticos, ou seja, ingredientes alimentares não digeríveis pelo organismo humano que resultam em benefícios pela estimulação seletiva do crescimento e/ou ativação do metabolismo de bactérias probióticas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp (SAAD, 2006; RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2010). Nesse sentido, a administração de prebióticos pode ser uma alternativa potencialmente benéfica na redução do risco de CC.

A inulina e o FOS são prebióticos com ação benéfica conhecida. O FOS é formado a partir da hidrólise da inulina pela enzima inulase, tornando-se oligossacarídeos resistentes. Estes são carboidratos complexos resistentes à ação das enzimas digestivas, chegando intactos ao cólon. Neste local, o FOS é

fermentado por bifidobactérias, formando lactato, gases como o dióxido de carbono e hidrogênio, e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (LOSADA, OLLEROS, 2002).

O FOS estimula a colonização intestinal de bifidobactérias por ser substrato para esses microrganismos, melhorando a função intestinal e prevenindo infecções sistêmicas derivadas da translocação bacteriana, os quais que podem ocasionar sepse e até mesmo morte (WESTERBEEK et al., 2011). Estudos mostram que o consumo de FOS é capaz de alterar a histologia intestinal, aumentando a profundidade e número de criptas totais e bifurcadas (SCHOLZ-AHRENS, SCHREZENMEIR, 2002; RASCHKA, DANIEL, 2005; LOBO et al., 2007; LOBO et al., 2014). Ainda, o FOS pode reduzir o número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes (FCA), número de adenocarcinomas invasivos e taxa de proliferação celular em tumores (MOURA et al., 2012).

Os AGCC produzidos pela fermentação do FOS, especialmente o butirato, fornecem energia aos enterócitos. Também, o butirato é capaz de diminuir a quimiorresistência e bloquear a ação das histonas desacetilases em células tumorais, levando essas células à apoptose, além de modular a expressão da glutathione S-transferase que detoxifica compostos cancerígenos e associados ao estresse oxidativo (MOURA, 2012; KILNER, et al, 2012; RAJENDRAN et al, 2011).

Além disso, os AGCC, podem causar nos neutrófilos alteração do pH intracelular, mobilização de cálcio intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fagocitose e morte de microrganismos e distribuição de proteínas do citoesqueleto, além de estimular liberação de óxido nítrico que em concentrações elevadas atua como um potente agente anti-carcinogênico, promovendo apoptose, necrose e inibição da angiogênese (VINOLO, 2010; COULTER et al., 2008).

A propriedade da farinha de yacon de estimular o sistema imunológico da mucosa intestinal foi demonstrada por Vaz Tostes e colaboradores (2014), na dose de 0,14 g FOS/kg/dia ofertada durante 18 semanas a crianças pré-escolares. Ao fim do estudo, os pesquisadores verificaram que a ingestão da farinha de yacon aumentou os níveis séricos de IL-4 e sIgA fecal. A sIgA tem a capacidade de neutralizar toxinas e microrganismos patogênicos, estando em níveis elevados apenas no intestino de animais com uma microbiota normal (MACPHERSON, et al., 2008; SANSONETTI, 2011).

As fontes alimentares de FOS e de inulina são restritas e, em vista dos seus potenciais efeitos no CC, novas fontes de prebióticos têm sido investigadas. Dentre essas fontes, encontra-se o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), que é uma raiz tuberosa originária das regiões andinas, introduzido no Brasil no início dos anos 90 (MOSCATTO et al., 2004). É um alimento rico em FOS, podendo representar de 40%-70% da matéria seca no yacon (SANTANA e CARDOSO, 2008). Embora promissor, o yacon tem sido pouco investigado quanto aos seus efeitos benéficos à saúde intestinal.

Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar os efeitos do consumo da farinha de yacon em parâmetros intestinais e sistêmicos de ratos com CC induzido. Espera-se que o consumo de farinha yacon promova melhorias nos parâmetros morfológicos e no metabolismo oxidativo de neutrófilos dos animais submetidos à carcinogênese experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos intestinais e o metabolismo oxidativo da farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) em modelo animal de câncer de cólon induzido.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em animais submetidos ou não à indução do CC, os efeitos da farinha de yacon no:

- Consumo alimentar e no peso corporal;
- pH intraluminal;
- Alterações morfológicas e histopatológicas no cólon;
- Metabolismo oxidativo de neutrófilos.
- Permeabilidade intestinal;
- Endotoxemia;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiologia e defesa intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) humano é um microecossistema cinético que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro. É composto por boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso, além dos órgãos anexos, como fígado, pâncreas, vesícula biliar e glândulas salivares. É por meio do TGI que o organismo recebe água, nutrientes e eletrólitos, além de constituir uma importante barreira de proteção contra entrada de patógenos do meio externo (HALL; GUYTON, 2012).

O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo. A superfície interna do intestino delgado é constituída por centenas de dobras, depressões e projeções, denominadas vilosidades. Estas são revestidas com células epiteliais denominadas enterócitos que apresentam extensões cilíndricas ainda menores, as microvilosidades. Estas estruturas são de grande importância para o TGI, pois aumentam a superfície de absorção intestinal (MAHAN; KRAUSE, 2013).

O intestino grosso é dividido nos segmentos: ceco, cólon (ascendente, transverso, descendente e sigmóide), reto e ânus. Existem três faixas musculares que percorrem longitudinalmente todo o cólon, chamadas de tênia ou faixas cólicas. As haustras são bolsas formadas pela contração das faixas cólicas e que dão o aspecto enrugado ao cólon. A mucosa do intestino grosso não apresenta vilos. É constituída por epitélio cilíndrico simples, formado por células chamadas colonócitos que estão presentes sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, contendo criptas de Lieberkühn. A submucosa é formada por tecido conjuntivo fibroelástico. A camada muscular é formada por túnicas de músculo liso, uma circular interna e outra longitudinal externa. A camada mais externa é serosa (HALL; GUYTON, 2012).

Entre as células intestinais encontram-se as “tight junctions” que atuam como uma barreira semi-permeável para o transporte paracelular de íons, solutos e água, bem como células, sendo importante barreira que divide os domínios apical e basolateral de enterócitos e colonócitos. Localizadas entre as vilosidades estão as criptas intestinais que são longas glândulas tubulares com grande número de células de absorção e caliciformes e, em menor número, células granulares (HALL; GUYTON, 2012).

As células de absorção são cilíndricas e apresentam microvilosidades. O muco produzido pelas células caliciformes facilita a passagem das fezes e protege as paredes do intestino grosso da irritação provocada pelos ácidos e gases libertados pelas bactérias da microbiota intestinal (HALL; GUYTON, 2012). A estrutura da parede intestinal pode ser observada na Figura 1.

Associados ao epitélio secretor encontram-se as células de defesa imunológica. Os linfócitos, principais células da imunidade celular, estão presentes em três regiões principais da mucosa do TGI: na camada epitelial, na lâmina própria e em locais específicos da lâmina própria, chamados de placas de Peyer. As células de cada região apresentam características específicas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

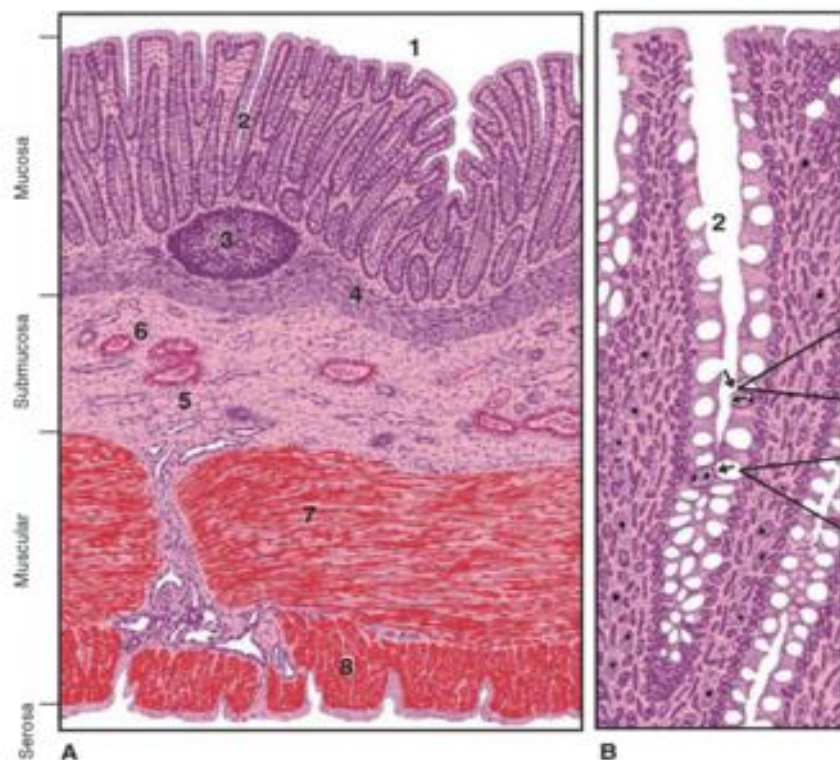


Figura 1: Esquema da estrutura histológica do intestino grosso em menor (A) e em maior (B) aumento. Observa-se o epitélio superficial (1), as criptas de Lieberkühn (2), um nódulo linfático (3), a musculatura da mucosa (4), as células adiposas (5), os vasos sanguíneos da submucosa (6), a camada muscular interna circular (7) e a camada muscular externa longitudinal (8). Adaptado de: Eynard; Valentich; Rovasio (2011).

Na região intra-epitelial, encontram-se principalmente os linfócitos T, responsáveis pela memória e pelo desenvolvimento de respostas imunes apropriadas. A lâmina própria contém linfócitos T, responsáveis por reconhecer e responder aos antígenos presentes nos linfonodos mesentéricos que drenam o intestino, além de linfócitos B, plasmócitos ativados, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. Já as placas de Peyer são aglomerados de folículos linfóides e neles se inicia a resposta imunológica das mucosas, com a produção da sIgA. As células M (membranosas) são células intra-epiteliais que recobrem as placas de Peyer. Essas células são responsáveis por transportar macromoléculas do lúmen intestinal para os tecidos sub-epiteliais, num mecanismo de transcitose, a fim de iniciar defesa contra o antígeno e/ou gerar células de memória (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

Adicionalmente, outra barreira extremamente efetiva contra entrada de microrganismos patogênicos na lâmina própria intestinal é a presença de um ecossistema bacteriano formado por bifidobactérias. Estas são bactérias não-patogênicas e benéficas que são oposição a microrganismos patogênicos e oportunistas. O equilíbrio entre as populações microbianas dá-se pela competição por nutrientes e espaço entre elas, além da inibição de um grupo bacteriano pelos produtos metabólicos de outro. Além de funcionarem como barreira intestinal, as bactérias do intestino grosso fermentam as fibras que não sofreram digestão e absorção, levando a formação de ácidos e gases. Além disso, as bactérias intestinais são também responsáveis por sintetizar vitamina B e K (DENIPOTE, TRINDADE, BURINI, 2010).

Além da defesa por células imunológicas e pela microbiota intestinal, o próprio epitélio intestinal constitui-se uma estrutura de defesa contra agentes agressores. Seu intenso “turnover” celular contribui para a eliminação de antígenos que aderem à superfície mucosa. Deste modo, verifica-se que o epitélio intestinal apresenta diferentes propriedades, promovendo tanto a função de transporte de substâncias existentes na luz intestinal, quanto de barreira aos antígenos (VILELA, 2005).

O termo permeabilidade intestinal relaciona-se justamente a essa função de barreira exercida pelo epitélio (MORROW, GOGINENI, MALESKER, 2012). Este permite a passagem de moléculas através do mecanismo de difusão não mediada, independente do gradiente de concentração e sem utilizar carreador bioquímico passivo ou ativo. Apenas substâncias com peso molecular maior que 150 Daltons

(Da) utilizam essa via de acesso a mucosa intestinal. Moléculas com peso molecular menor que 150 Da utilizam sistemas carreadores para seu transporte para a mucosa intestinal e assim atingir a corrente sanguínea (VILELA, 2005).

A técnica mais utilizada para se avaliar a permeabilidade intestinal é pela avaliação da excreção urinária de açúcares não metabolizados, administrados oralmente. Os principais açúcares utilizados são a lactulose e o manitol, devido à capacidade de atravessar o epitélio por uma rota transcelular ou paracelular e não serem metabolizados pelo organismo, possibilitando obter um índice específico da permeabilidade intestinal. A absorção do monossacarídeo manitol é utilizada para refletir permeabilidade transcelular, demonstrando a absorção de moléculas pequenas. Por outro lado, o dissacarídeo lactulose é capaz de passar entre as junções paracelulares, refletindo a permeabilidade de moléculas maiores. De modo que uma maior excreção de lactulose e manitol está relacionada a danos nas células da mucosa e nas “tight junctions” (WIEST; RATCH, 2003).

Porém, essa barreira exercida pelo epitélio intestinal pode se alterar devido a estresse hiperosmolar, doenças, drogas, citocinas e hormônios, associados a uma dieta desbalanceada, rica em gorduras e pobre em fibras. Esse fato pode favorecer a passagem de antígenos pela mucosa intestinal, podendo iniciar ou agravar um processo inflamatório (MORROW, GOGINENI, MALESKER, 2012). Como consequência, metabólitos, mediadores inflamatórios e células relacionadas ao processo inflamatório, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos, acumulam-se na mucosa intestinal (BAUMGART, CARDING, 2007; MALOY, POWRIE, 2011). Estas células passam a liberar elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilo, ânions superóxido e peroxinitrito e espécies reativas de nitrogênio (ERN), como óxido nítrico (NO) (ZHU; LI, 2012).

O processo de inflamação do intestino leva à transformação das células epiteliais que sofreram mutações genéticas. Essa transformação ocasiona perda da função das células apresentadoras de antígeno (APC) na ativação da β -catenina e, por fim no desenvolvimento de carcinomas e adenomas. Consequentemente, essas alterações estão associadas com a perda da função da barreira intestinal (GRIVENNIKOV et al., 2012)

Estas modificações na integridade das células da mucosa facilitam a translocação de bactérias do lúmen para a lâmina própria, levando à ativação de

células mielóides por receptores “toll-like”, acarretando na produção de IL-23. Esta, por sua vez, auxilia na produção da IL-17 que provoca uma resposta maciça de neutrófilos e a proliferação de células epiteliais, gerando uma gradual perda de função das mesmas, além de processos de inflamação e formação de tumores (GRIVENNIKOV et al., 2012).

A quebra da barreira intestinal pode levar a translocação bacteriana (TB). Esta é definida como a passagem de bactérias endógenas viáveis e não-viáveis, assim como seus produtos, da luz do TGI para sítios estéreis (linfonodos mesentéricos, circulação sistêmica, órgãos extraintestinais) por meio da barreira epitelial (AZEVEDO et al., 2009). Este evento induz, perpetua ou intensifica o estado inflamatório por iniciar a resposta mediada por citocinas, predispondo o hospedeiro ao desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica (EL-AWADY et al., 2009; BALZAN et al., 2007). A presença de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-2 e IFN- γ) e óxido nítrico na mucosa intestinal, por sua vez, promove ruptura da barreira intestinal, intensificando ainda mais a TB (LI et al., 2008; RAPIN, WIERNSPERGER, 2010).

Existem duas teorias, não excludentes, que tentam explicar como se dá o processo de quebra da barreira intestinal. A primeira delas é o “Modelo dos três insultos”, em que a translocação bacteriana é conseqüência de dois insultos iniciais. No primeiro insulto, que pode ser um trauma, cirurgia ou doença, ocorre a hipoperfusão esplâncnica. Já o segundo insulto ocorre após recuperação e resultaria em lesão de isquemia e reperfusão, com conseqüente aumento da permeabilidade intestinal. No terceiro e último insulto, bactérias e citocinas estimulariam fatores imunológicos locais e sistêmicos, perpetuando o estado inflamatório e resultando em síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (CLARK; COOPERSMITH, 2007). A segunda teoria de quebra da barreira intestinal é chamada “Teoria do tecido linfóide intestinal”. Segundo essa teoria, macrófagos e linfonodos mesentéricos bloqueiam a maior parte das bactérias translocadas, porém algumas sobrevivem ou liberam endotoxinas, que através do sistema linfático intestinal migram para o ducto torácico e assim para a circulação direita, atingindo o pulmão. Nesse órgão, ocorreria ativação de macrófagos alveolares, fato que contribuiria para a progressão da disfunção pulmonar e SDMO (SULIBURK, 2008).

Entre os fatores que predispõem a translocação bacteriana estão à obstrução intestinal, icterícia, doença inflamatória intestinal, neoplasias, nutrição parenteral pré-operatória, cirurgia de emergência e colonização gástrica por microrganismos, uma vez que hiperproliferação bacteriana pode levar ao aumento de endotoxinas, com possível aumento da permeabilidade intestinal e translocação (AZEVEDO et al., 2009).

Tem sido proposto que estas bactérias intestinais potencialmente patogênicas, ou suas endotoxinas, possam iniciar ou perpetuar o estado de septicemia em pacientes que não apresentam focos de infecção, podendo levar em alguns casos à falência múltipla orgânica e óbito, reforçando a importância de uma microbiota constituída por bifidobactérias (WIEST; RATH, 2003).

3.2 Câncer colorretal

A população brasileira, seguindo um contexto mundial, passa pelo processo de transição epidemiológica. Neste cenário, a ocorrência das doenças infectocontagiosas diminui e a incidência das doenças e agravos crônicos não transmissíveis (DACNT) aumenta drasticamente, sendo o novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira. Dentre as DACNT, o câncer tem grande destaque dado sua alta incidência e mortalidade (INCA, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (2015), no Brasil, o câncer é segunda principal causa de mortalidade no país, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. É estimado para o ano de 2016 mais de 420 mil casos novos de câncer (não incluindo os de pele não-melanoma), sendo os homens os mais acometidos (51%) (INCA, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para ano 2030, cerca de 27 milhões de casos incidentes de câncer e 17 milhões de mortes. O maior efeito desse aumento deverá ocorrer nos países de baixa e média renda (FERLAY, 2012).

De um modo geral, a maior incidência é o de câncer de próstata, seguido pelo de pulmão, traqueia e brônquio e o câncer de cólon e reto se posiciona na terceira posição quando o câncer de pele não-melanoma é excluído da lista (INCA, 2015). Segundo a última estimativa mundial, o câncer de cólon e reto configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo nas mulheres, sendo os principais índices nas regiões mais desenvolvidas, porém a maioria das

mortes por esse tipo de neoplasia acomete as regiões subdesenvolvidas (FERLAY, 2012).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, cuja origem se dá por condições multifatoriais (INCA, 2014). As células do corpo dividem-se somente quando são expostas a influências extracelulares, tais como fatores de crescimento e hormônios. Porém, as células cancerosas não respondem a esses comandos e perdem o controle sobre a divisão celular, dividindo-se continuamente, gerando grandes massas de células, os chamados tumores (PRADO, 2014). O processo de carcinogênese é dividido em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação.

A etapa de iniciação é caracterizada por modificações irreversíveis e permanentes do DNA celular. Na fase de promoção ocorre a expansão clonal de células iniciadas, sendo esta etapa reversível, desde que retirado o agente promotor. Já a etapa de progressão tumoral, as células pré-neoplásicas se tornam invasivas, podendo iniciar sua propagação para outros tecidos e órgãos, processo este chamado de metástase. Além disso, nessa etapa as células pré-neoplásicas ficam mais expansivas, dada à elevada taxa de proliferação celular causada pela crescente instabilidade genômica. Essas alterações estruturais fornecem condições biológicas para as manifestações clínicas do câncer (GRIFFITHS, 2008).

Existem tumores benignos e malignos. Os tumores benignos assemelham-se ao tecido do qual eles se originaram, crescem de maneira lenta e são fixos. Esses tumores não são cânceres, mas devem ser retirados, pois pelo aumento de volume, podem afetar algum órgão importante, como o cérebro. Já os tumores malignos não se assemelham com seu tecido de origem (PRADO, 2014). As células malignas, na maioria das vezes, apresentam estruturas irregulares, como núcleo de tamanho e forma variáveis. Essas células expressam o gene para telomerase, enzima que adiciona sequências específicas e repetitivas de DNA a extremidade 3' dos cromossomos onde se encontra o telômero (extremidade do cromossomo). Desta maneira, não diminuem as extremidades de seus cromossomos após cada replicação do DNA, podendo gerar o tumor. Outra característica de células cancerosas é a capacidade de metástase. Células cancerosas apresentam alta taxa

de divisão celular, invasão de novos territórios celulares, altas taxas metabólicas e forma celular anormal, características que as difere das células normais (GRIFFITHS, 2008).

A maioria dos tipos de câncer é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo um dos mais notáveis a dieta (INCA, 2015). Os fatores protetores mais importantes para o câncer de cólon e reto são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibra alimentar, tais como, frutas, hortaliças, cereais integrais e derivados de leite. Por outro lado, os fatores de risco para esse tipo de câncer são consumo exagerado de carne vermelha, carnes processadas, gorduras saturadas, bebidas alcoólicas, tabagismo, obesidade e sedentarismo (TOLOUDI, 2015).

Apesar de cerca de 75% dos cânceres de cólon e reto se darem de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral, a história familiar de câncer colorretal, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade avançada são considerados fatores de risco endógenos (INCA, 2015).

Evidências indicam a desregulação da apoptose como uma das principais causas ligadas ao desenvolvimento do câncer colorretal. A apoptose é observada principalmente na região superior das criptas colônicas e a principal hipótese é que esta regulação depende de um balanço complexo entre fatores indutores da apoptose e fatores de sobrevivência celular. A indução da morte celular programada pode também ser um mecanismo pelo qual os colonócitos, quando possuem danos no DNA, possam ser eliminados. Desta forma, quando as taxas de proliferação colônica são aumentadas e a apoptose é reduzida ou inativada, o risco de perpetuação de danos no DNA e da incidência do câncer aumenta (CHAPKIN et al., 2000).

Dentre os fatores que regulam positivamente a apoptose está a família BCL-2 (Linfoma de células B2), da qual faz parte o gene BAX, que é expresso principalmente nas zonas superiores da cripta colônica e também, a citocina TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta), a qual inibe a divisão celular, apresenta um gradiente em seu nível de expressão gênica, possuindo maior expressão na região superior e menor expressão na base da cripta, exercendo importante controle no balanço entre apoptose e divisão celular nas células colônicas (CHAPKIN et al, 2000).

Além desses fatores, a mucosa colônica necessita de constante renovação de suas células devido ao intenso fluxo intestinal. Alterações nesse processo podem levar à formação de pólipos que são lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Os pólipos podem desenvolver câncer colorretal por meio de uma sequência denominada adenoma-carcinoma, resultante de uma complexa interação entre genética e meio ambiente (SANTOS et al., 2013).

Os pólipos adenomatosos podem ter origem em pequenas lesões conhecidas como focos de criptas aberrantes (FCA) que são grupos de células que apresentam alterações, como maior tamanho, aspecto mais corado, aberturas menos circulares e com tendência a se apresentarem alongadas, elípticas ou tortuosas. Cada FCA evolui de uma cripta alterada e podem ser observados e quantificados microscopicamente, sendo o resultado dessa contagem um indicador da carcinogênese de cólon (GUPTA; SCHOEN, 2009). Os FCA encontram-se presentes em indivíduos que possuem alta predisposição a desenvolver câncer de cólon e são marcadores em estudos experimentais da referida neoplasia (MOURA et al., 2012).

Bactérias também podem contribuir para a patogenicidade do câncer de cólon. A presença de alterações na microbiota intestinal facilita o desenvolvimento de processos inflamatórios, pode promover a ativação de componentes carcinogênicos e a produção de compostos mutagênicos, como os radicais livres (ZHU et al., 2011). Por outro lado, uma microbiota saudável contribui para o controle da proliferação e diferenciação das células epiteliais, produção de ácidos graxos de cadeia curta, prevenção da proliferação de organismos patogênicos e estimulação da imunidade intestinal (DENIPOTE, TRINDADE, BURINI, 2010).

Alguns métodos são considerados meios de detecção precoce do câncer de cólon. A pesquisa de sangue oculto nas fezes e métodos endoscópicos são, respectivamente, capazes de diagnosticar e remover precursores do câncer de cólon e reto (chamados pólipos adenomatosos colorretais), bem como tumores em estágios bem iniciais. Sovich, Sartor e Misra (2015) realizaram uma avaliação global da eficácia de tecnologias existentes para a detecção do câncer colorretal. Os autores analisam métodos sorológicos de triagem baseada em fezes, métodos endoscópicos, radiológicos e os recém-emergentes, como o Teste DNA Fecal, Cápsula Endoscópica e Testes sorológicos. Os autores concluíram que a

colonoscopia continua sendo o padrão ouro, porém outros testes mais recentes, baseados em fezes, como DNA fecal, também apresentam boa sensibilidade.

O câncer de cólon tem bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais; de acordo com o INCA (2014), a sobrevida, para o câncer de cólon e reto é aproximadamente de 55%.

3.2.1 Carcinogênese experimental

A indução de CC por carcinógenos químicos é um modelo muito utilizado para o estudo de vários aspectos da patogênese, morfologia, prevenção e tratamento das neoplasias. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos é a formação de compostos covalentes com o DNA, fato que aumenta a probabilidade de ocorrerem erros durante a replicação, podendo ainda inibir a atividade das enzimas reparadoras (ZILIOTTO, 2008). Em estudos experimentais de câncer de cólon, os agentes carcinogênicos mais empregados em roedores são as drogas azometilhidrazina (AOM) e dimetilhidrazina (DMH) (RODRIGUES et al., 2002).

A DMH é um carcinógeno químico indireto, ou seja, precisa primeiro sofrer modificações químicas no organismo para então se tornar ativa. A ativação metabólica da DMH envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano que sofre segunda oxidação, gerando o azoximetano. Este é hidroxilado por enzimas microsossomais hepáticas, resultando em metilazoximetanol, um composto quimicamente instável em temperatura corporal, que após decomposição, libera formaldeído, água, nitrogênio e um agente alquilante, o metildiazônio, que é capaz de provocar metilação do DNA, RNA e outras proteínas. Esse composto interage com as bases púricas dos ácidos nucleicos, levando a alteração do genoma das células alvo. O DMH atua principalmente no cólon devido à intensa proliferação celular nesse local e induz grande proliferação de tumores no cólon. Sugere-se que a DMH e seus metabólitos hepáticos são transportados até as células epiteliais do cólon via corrente sanguínea, secretados pela bile. Uma das alterações induzidas pela DMH no cólon são os focos de criptas aberrantes (OGATA et al., 2010).

Características dos FCA, como o número de criptas nos focos, podem ser usadas para quantificar a evolução das alterações que ocorrem ao longo do tempo no desenvolvimento do câncer de cólon e para identificar alterações celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento do tumor (RODRIGUES et al., 2002).

Na mucosa do cólon de animais tratados com carcinógenos químicos as criptas aberrantes são revestidas por células epiteliais com diferentes graus de maturação celular e displasia. A análise de FCA é fundamental para se investigar alterações moleculares muito precoces na carcinogênese do cólon (STEVENS, 2007). Além disso, foi observado que os FCA apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, com redução das taxas da hexosaminidase e da produção de mucinas, fenômeno associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (FEMIA et al., 2004). A Figura 2 demonstra a diferença de uma mucosa de cólon saudável e outra apresentando FCA.

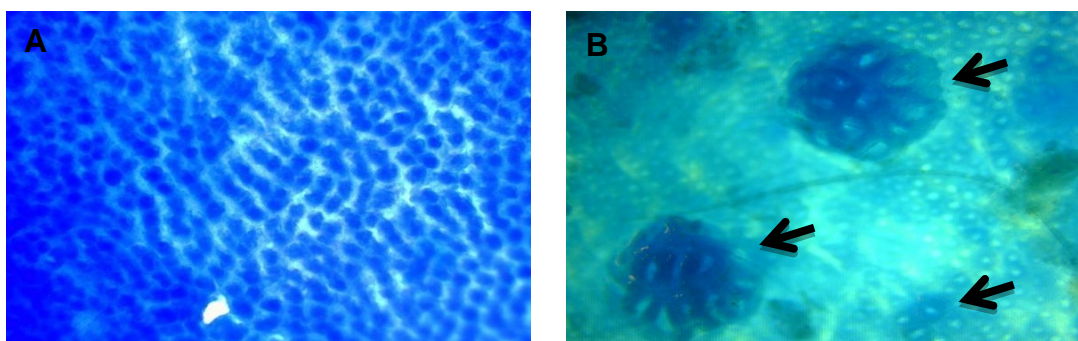


Figura 2. Mucosa de cólon saudável (A) e mucosa de cólon apresentando vários FCAs (B).

Vários aspectos influenciam o número de FCA em um modelo experimental. Entre estes estão o sexo, idade e raça dos animais, região do cólon examinada, tempo de progressão da lesão e frequência da exposição ao carcinogênico. De modo geral, ratos machos, de idade mais avançada são mais suscetíveis a desenvolver FCA, que geralmente acometem as regiões mais distais do cólon (BIRD e GOOD, 2000).

3.3 Prebióticos e seus efeitos no organismo

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis pelo organismo humano que resultam em benefícios pela estimulação seletiva do crescimento e/ou ativação do metabolismo de bactérias benéficas, chamadas de probióticas, além de impedirem o desenvolvimento de bactérias patogênicas, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006). Os prebióticos atuam mais

frequentemente no intestino grosso, porém também podem ter impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Os prebióticos são carboidratos complexos, considerados fibras, resistentes as ações das enzimas secretadas pelo TGI, não sendo digeridas e absorvidas no TGI superior. No intestino grosso, os prebióticos são fermentados por bactérias anaeróbicas do cólon, levando à produção de ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente ácido acético, propiônico e butírico, e gases, como dióxido de carbono e hidrogênio. Conseqüentemente, ocorre diminuição do pH do lúmen e estimulação da proliferação de células epiteliais do cólon (SAAD, 2006).

A redução do pH, por ação dos AGCC, promove o aumento de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. por serem resistentes em meio ácido, ao passo que as bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, sensíveis à acidez, tem seu número reduzido. Além disso, as bactérias benéficas (bifidobactérias) produzem e secretam bacteriocinas que exercem efeito antibacteriano nos microrganismos patogênicos (RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2010).

Dentre os compostos com função prebiótica, tem-se os frutanos, os galactoligossacarídeos (GOS), amido resistente e beta-glucanos. Frutano é o termo empregado para descrever todos os oligo ou polissacarídeos não digeríveis, de origem vegetal, sendo os polissacarídeos não-estruturais mais abundantes na natureza, depois do amido. Os frutanos são carboidratos em que uma ou mais ligações frutossil-frutose predominam dentre as ligações glicosídicas. Estão presentes em muitos vegetais e em algumas bactérias e fungos (SAAD, 2006).

Os frutanos podem ser classificados de acordo com sua estrutura, em três grupos: inulinas, levanos e graminanos que são baseados nos compostos 1-cestose, 6-cestose e neocestose, respectivamente, presentes em sua estrutura química (SILVA; CÂNDIDO, 2004).

Os frutanos do tipo inulina subdividem-se em 2 grupos gerais: grupo da inulina e seus produtos relacionados e grupo da oligofrutose e frutooligossacarídeos (FOS). De modo geral, os compostos desses dois grupos são muito semelhantes quimicamente, diferindo apenas no grau de polimerização, ou seja, o número de unidades de monossacarídeos que compõem a molécula. De modo que a inulina é constituída de subunidades de frutose (2 a 150), ligadas entre si a uma glicose terminal, apresentando um grau médio de polimerização de 10 ou mais unidades. Já

os FOS são inulina com grau de polimerização inferior a 10 (SAAD, 2006). Na Figura 3 tem-se a estrutura de uma molécula de inulina que permite verificar o ponto de alongação que determina o grau de polimerização da cadeia.

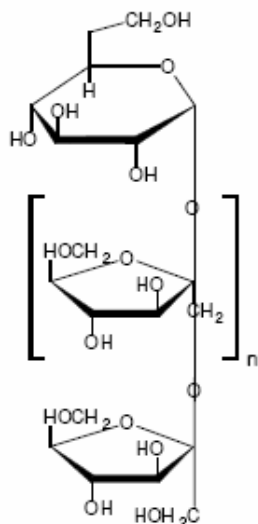


Figura 3. Estrutura de uma inulina. n= ponto de alongação da cadeia. Fonte: Adaptado de: QUINTEROS, 2000.

Os FOS consistem de moléculas de sacarose, compostas de duas ou três subunidades de frutose adicionais, acrescentadas enzimaticamente, através de ligação β (2 \rightarrow 1) à subunidade frutose da sacarose. São obtidos a partir da hidrólise da inulina pela enzima inulase. Na indústria são sintetizados a partir da sacarose por ação da enzima frutossiltransferase. Estão naturalmente presentes em alimentos como cebola, alho, tomate, banana, cevada, aveia, trigo, mel, cerveja e na yacon (DAVIDSON; CARVALHO, 2007).

Os frutanos são preferencialmente fermentados por bifidobactérias em relação a outras fontes de carboidratos, como o amido, pectina ou a polidextrose. A alta especificidade dos FOS como substratos para bifidobactérias é decorrente da atividade das enzimas β -frutósidas (inulinases) associadas a células específicas. Essa enzima hidrolisa monômeros de frutose da extremidade não-redutora da cadeia de frutanos ou de determinados açúcares em que o resíduo de frutose ocorre na posição β (2-1) (BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004).

Assim como ocorre com outros carboidratos não-digeríveis, os prebióticos exercem um efeito osmótico no TGI, enquanto não são fermentados. Quando fermentados pela microbiota endógena eles aumentam a produção de gás, podendo

acarretar em diarreia, devido ao efeito osmótico. Porém, a tolerância de doses baixas de prebióticos é geralmente excelente (SAAD, 2006).

São descritos na literatura muitos efeitos benéficos ao organismo ocasionados pelos AGCC, formados durante a fermentação dos prebióticos, principalmente butirato, acetato e propionato. O acetato estimula a proliferação de células normais das criptas intestinais, aumenta a motilidade ileal, aumenta o fluxo sanguíneo do cólon e desempenha um papel na adipogênese e sistema imunológico, uma vez que interage com o receptor acoplado a proteína G do tecido adiposo e células imunitárias. Além disso, demonstrou-se que o acetato reduz níveis de fator de necrose tumoral (TNF), IL-6 e NF- κ B e, ao mesmo tempo, aumenta a produção de anticorpos do sangue periférico em vários tecidos diferentes (TEDELIND et al., 2007).

Em relação ao propionato foi demonstrado, em estudos com animais e humanos, que esse ácido graxo apresenta capacidade de reduzir a ingestão de alimentos e aumenta a saciedade através do aumento do hormônio da saciedade, a leptina, pela ativação dos genes GPCR 43, 41 (AL-LAHHAM et al., 2010). Além disso, o propionato pode ser fator protetor contra a carcinogênese, pois reduz o crescimento e diferenciação de células de câncer de cólon via hiperacetilação de proteínas histonas e estimulação da apoptose. Também, o propionato inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e de fatores de transcrição gênica, como NF- κ B, em vários tecidos (ZAPOLSKA-DOWNAR; NARUSZEWICZ, 2009).

Entre os AGCC, o butirato tem sido o mais extensivamente estudado quanto à sua ação no CC. Esse composto exibe forte propriedade anti-inflamatória, atuando na inibição da produção de TNF- α , a ativação de NF- κ B, IL-8, IL-10 e IL-12 (BAILÓN, 2010). Além disso, promove diferenciação de células (KILNER, 2012), suprime a inflamação do cólon (WOLEVER et al., 2002), leva à interrupção do ciclo celular e promove a apoptose em células cancerígenas do cólon (GANAPATHY, 2013).

O consumo de prebióticos está relacionado a muitos benefícios ao organismo, dentre eles atuação na biodisponibilidade de minerais. Lobo e colaboradores (2011) realizaram um estudo para verificar a atuação dos FOS de yacon sobre a biodisponibilidade de ferro em ratos com anemia induzida. Os autores encontraram que a inulina aumentou a fermentação no ceco e a biodisponibilidade de ferro,

porém nos animais que receberam FOS da farinha de yacon, esses resultados foram intensificados.

Também Bryk e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de uma mistura de GOS/FOS na absorção de cálcio, magnésio e fósforo em ratos em crescimento com desnutrição protéica e encontraram maior absorção desses minerais nos animais que consumiram os prebióticos, mesmo naqueles com desnutrição protéica.

Os prebióticos também possuem atuação positiva sobre a função imunológica. Vaz Tostes e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da farinha de yacon, na dose de 0,14g/FOS/kg/dia durante 18 semanas, no estado nutricional de ferro e zinco e biomarcadores de resposta imune em crianças pré-escolares. Ao fim do estudo, não foi encontrada alterações nos valores plasmáticos de ferro e plasmáticos e eritrocitário de zinco, porém, a ingestão yacon aumentou os níveis séricos de IL-4 e sIgA fecal.

Delgado e colaboradores (2012) também avaliaram a atuação do FOS derivados de yacon, sobre parâmetros imunológicos. Ratos BALB/c foram alimentados com a dieta AIN-93 suplementada com 5% de FOS comercial ou 3% e 5% FOS, derivado do yacon, durante 30 dias. Como resultado, a ingestão de FOS levou a uma redução significativa da citocina pró-inflamatória IL-1 β em culturas de macrófagos e elevação dos níveis de IgA fecal, melhorando, portanto, a imunidade da mucosa.

Genta e colaboradores (2009) realizaram um estudo com mulheres pré-menopáusicas obesas com o objetivo de avaliar os efeitos à saúde e a tolerância de xarope de yacon em duas doses, 0,29g e 0,14g/FOS/kg/dia. Os autores encontraram, ao fim de 120 dias que o consumo diário recomendado de xarope de yacon sem efeitos gastrointestinais indesejáveis é de 0,14g/FOS/kg, e que o consumo diário desse produto produziu uma redução significativa no peso corporal, circunferência da cintura e índice de massa corporal.

Cani e colaboradores (2006) avaliaram o efeito anti-diabético da oligofrutose em ratos diabéticos recebendo ou não alta quantidade de gordura e/ou oligofrutose durante 4 semanas, na presença ou ausência do antagonista do receptor de GLP-1. Houve melhoria na tolerância à glicose, glicemia de jejum, secreção de insulina estimulada por glicose e produção hepática de glicose e insulina sensível ao ganho de peso corporal, porém todos esses efeitos benéficos ocorrem apenas na presença do receptor de GLP-1.

Hsu e colaboradores (2004) encontraram que tanto o consumo de XOS quanto de FOS, por 35 dias, em ratos Sprague-Dawley, diminuiu acentuadamente o pH do ceco, a concentração de triglicérides no soro, aumentou a população total de bifidobactérias cecal, porém XOS teve um efeito maior sobre a população bacteriana do que FOS. Além disso, XOS e FOS reduziram acentuadamente o número de focos de criptas aberrantes no cólon de ratos tratados com DMH.

Além disso, o FOS estimula o crescimento e o desenvolvimento de probióticos, como os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses microrganismos são os que mais mostraram efeitos positivos na prevenção de câncer de cólon em estudos *in vivo* e *in vitro*. Em comparação aos microrganismos anaeróbios no intestino, estes apresentam baixa atividade de enzimas como a β -glucuronidase, azoredutase e nitrato-redutase, enzimas estas envolvidas na formação de agentes genotóxicos. Dessa forma, essas bactérias quando colonizam o cólon promovem uma ação diminuída desses agentes nocivos, aumentando a excreção de xenobióticos conjugados (GUPTA; GARG, 2009).

A ingestão de prebióticos pode também agir aumentando a atividade das enzimas de detoxificação de cancerígenos, como o citocromo P450 e os níveis de glutathione-S-transferase, enzimas envolvidas no metabolismo de compostos eletrofílicos e os associados ao “stress” oxidativo (PRETER, 2008; JOHNSON, 2002).

Além dos efeitos citados, os prebióticos tem ação antimicrobiana e antifúngica, redução de uremia, efeito hipocolesterolemizante, dentre outros (ROSSI et al., 2010). Todos esses benefícios estão relacionados à fermentação dos prebióticos por ação das bifidobactérias (CILLA et al., 2012; GUSSO et al., 2015). Além disso, nesse processo, alguns nutrientes são formados como vitamina K, vitamina B12, tiamina e riboflavina (BEYER, 2005).

A administração de prebióticos, principalmente FOS e inulina, é uma alternativa potencialmente benéfica, dada a capacidade desses compostos bioativos na modulação da microbiota intestinal, atuando benéficamente em muitos distúrbios que afetam o TGI, dentre eles, o CC. Desse modo, novas fontes alimentares desses prebióticos têm sido investigadas, uma vez que são restritas, incluindo, dentre essas fontes, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (MACPHERSON; HARRIS, 2004; SANTANA; CARDOSO, 2008).

3.4 Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

A yacon, cientificamente conhecida como *Smallanthus sonchifolius*, é uma raiz tuberosa, oriunda da região Andina, na América do Sul. Pertence à família *Asteraceae* ou *Compositae*. No Brasil, a yacon foi introduzida no início dos anos 90 no estado de São Paulo, na região de Capão Bonito, pelos japoneses, que utilizavam as raízes frescas ou desidratadas para o tratamento contra hipercolesterolemia e diabetes. A raiz tuberosa produzida pela planta tem aparência de batata doce e sabor adocicado, com polpa levemente amarelada, crocante e aquosa (SANTANA; CARDOSO, 2008).

A yacon é consumida preferencialmente *in natura*, porém pode ser cozido ou desidratado na forma de chips ou farinha, sendo esta última maneira eficaz para concentrar os constituintes nutricionais (MOSCATTO et al., 2004). O percentual de água das raízes situa-se em torno de 83 a 90% do peso fresco, o que as torna um alimento de baixo valor energético (1,5 kcal/g) (LACHMAN et al., 2004). Porém, devido a essa grande umidade, a yacon tem vida útil reduzida em condições ambientais, cerca de 7 dias (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Em relação à sua composição, as raízes contêm entre 10 e 14% de matéria seca, sendo esta composta por aproximadamente 90% de carboidratos. A composição glicídica é variável em decorrência de fatores como o cultivo, a época de cultivo e a colheita, o tempo e a temperatura na pós-colheita. Entre os açúcares encontrados estão os monossacarídeos frutose e glicose, e os oligossacarídeos sacarose e frutooligossacarídeos (FOS), além de traços de amido e inulina. Enquanto que a maioria de tubérculos e raízes armazenam o amido, como carboidrato, a yacon armazena essencialmente FOS (SANTANA E CARDOSO, 2008).

Apesar da proporção média de cada açúcar ser variável, em base seca, encontra-se em torno de 40 a 70% de FOS, 5 a 15% de sacarose, 5 a 15% de frutose e menos de 5% de glicose. O conteúdo de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais das raízes é muito baixo, sendo, respectivamente, potássio e ácido ascórbico, o mineral e a vitamina encontrados em maior concentração. Em comparação a outras raízes e tubérculos, as raízes do yacon possuem elevada

quantidade de compostos fenólicos, principalmente ácido clorogênico. Ainda, são encontrados outros ácidos, como ácido ferúlico e ácido caféico, tanto nas folhas como nas raízes tuberosas de yacon (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Logo após a colheita das raízes de yacon, ocorre uma rápida mudança na composição química dos açúcares. Nesse processo, os açúcares polimerizados tendem a se despolimerizar com o tempo pós-colheita, dessa forma, os FOS são hidrolisados em açúcares simples pela ação da enzima frutano hidrolase, que os converte em frutose, sacarose e glicose. Porém, a velocidade desta conversão é mais lenta se o yacon for armazenado em temperaturas de refrigeração (GRAEFE et al., 2004; SANTANA; CARDOSO, 2008).

Os FOS são açúcares não-redutores, o que não os torna suscetíveis à reação de Maillard. Quanto à estabilidade, estes compostos são estáveis a valores de pH superiores a 3 e temperaturas de até 140°C. Desse modo, os FOS não são degradados na maioria dos processos térmicos das indústrias de alimentos (MOURA, 2004).

O yacon contém quantidade apreciável da enzima fenol oxidase que catalisa a oxigenação de compostos fenólicos a quinonas que, após polimerização, apresentam pigmentos marrons ou pretos, resultantes da oxidação enzimática. Esta oxidação ocorre em presença de oxigênio livre, escurecendo rapidamente a superfície recém cortada das raízes de yacon, depreciando sua aparência e a de seus produtos (VALENTOVÁ et al., 2003). O controle do escurecimento enzimático é geralmente limitado à inibição das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, responsáveis pela reação de escurecimento (CABELLO, 2005). Entre os métodos propostos para a prevenção da oxidação, estão a desidratação, o armazenamento a baixas temperaturas, o tratamento térmico, a utilização de antioxidantes, a eliminação do oxigênio do meio (por meio de vácuo), entre outros (LUPETTI et al., 2005).

O yacon é considerado um alimento funcional devido à grande quantidade de FOS presente, o que lhe confere baixa digestibilidade pelas enzimas do TGI humano, e um estímulo seletivo do crescimento e atividade de bactérias intestinais benéficas a saúde que irão produzir os AGCC, substâncias que conferem muitos benefícios ao organismo, dentre elas, ação benéfica sobre a carcinogênese (GUIGOZ et al., 2002).

3.5 Yacon como fonte de FOS e sua relação com o câncer colorretal

A inulina, a oligofrutose e os FOS, por não serem metabolizados no TGI superior, chegam intactos ao cólon, onde passam por fermentação bacteriana, formando os AGCC. Os AGCC são rapidamente absorvidos (90 a 95%) e com exceção do butirato, alcançam a circulação portal, sendo metabolizados no fígado. O butirato, por sua vez, tem sido reconhecido como a principal fonte de energia para a mucosa colônica, atuando na proliferação e na regulação da diferenciação e da apoptose dos colonócitos. Apesar de todos os AGCC terem a capacidade de reduzir o pH do cólon, o butirato é o que tem maior destaque redução do risco do desenvolvimento do câncer de cólon, devido aos seus múltiplos efeitos na diferenciação celular e por ser utilizado como fonte de energia primária para os colonócitos (NKONDJOCK et al., 2003).

Embora os mecanismos não estejam ainda totalmente elucidados, estudos também apontam que o butirato é um quimiopreventivo em CC em virtude dos mecanismos de ação na modulação da expressão de genes, devido à sua ação nas histonas desacetilases (HDAC), levando à mudanças no padrão de acetilação das histonas. As histonas acetiltransferases (HAT) e as HDAC controlam o processo de acetilação e desacetilação do DNA, se ocorre um desequilíbrio nesses processos em regiões promotoras, pode-se acarretar na desregulação da expressão gênica levando à carcinogênese. O butirato de sódio é considerado um inibidor das histonas desacetilases (iHDAC), resultando em um hiperacetilação relativa de proteínas histonas centrais H3 e H4. Os iHDAC são considerados uma classe de agentes anti-tumorais que mostram efeitos benéficos na proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e angiogênese tumoral. O butirato é capaz de provocar apoptose em células cancerígenas e atuar na diferenciação e parada do ciclo celular (RAJENDRAN et al., 2011).

O butirato também pode promover a modulação da expressão da glutathione S-transferase (GST). Esta enzima exerce papel fundamental na detoxificação de cancerígenos e compostos associados ao estresse oxidativo. Além disso, o butirato está associado com o aumento no número de células caliciformes nas criptas intestinais aumentando assim, a secreção de mucinas para a proteção da mucosa do cólon (MOURA et al., 2012).

Outro possível mecanismo ao qual o butirato atua na redução do risco de desenvolvimento do câncer de cólon é a indução da apoptose em células cancerosas do cólon (IACOMINO et al., 2001). A apoptose é um processo de morte celular regulado por vias celulares específicas e o funcionamento incorreto desse processo contribui para o desenvolvimento de inúmeras doenças, dentre elas, o câncer de cólon (CHEN et al., 2002). Alguns estudos mostraram que o processo de apoptose induzido pelo butirato seria mediado pelo aumento da atividade de uma cisteína protease, a caspase-3, já outros estudos apontam que esse processo pode ocorrer por meio da indução da atividade de enzimas reguladoras do ciclo celular (TURNER et al., 2002; RAMOS et al., 2002).

Outro mecanismo pelo qual o butirato reduz a proliferação celular é sua capacidade de induzir a diferenciação e ainda levar à apoptose celular, modulando a expressão de alguns genes do ciclo celular (GASCHOTT et al., 2001). Este é regulado pela interação de ciclinas com quinases-dependentes de ciclinas (cdks). Quando estas são ativadas, levam à progressão do ciclo celular. Vários genes reguladores do ciclo celular tiveram suas expressões aumentadas com tratamento *in vitro* com butirato, como p16^{INK4A}, p19^{INK4D}, p21^{Cip/Waf1}, p57 e p14/15 (IACOMINO et al., 2001, CHEN et al., 2002).

O butirato apresenta ainda propriedade anti-invasiva e capacidade para induzir os genes supressores de metástases, bem como regular negativamente genes promotores de metástases. Além de reduzir o nível de c-Src, quinase de adesão focal (FAK) e metaloproteinases da matriz (MMP-2, MMP-9), enzimas relacionadas com a invasividade tumoral. Os efeitos inibidores de butirato na malignidade do tumor e na metástase podem ser mediados por diversos mecanismos, ainda não completamente elucidados (HOFMANOVÁ et al., 2013).

No estudo de Hinnebusch e colaboradores (2002), procurou-se determinar os efeitos de variedades de AGCC no crescimento, diferenciação e apoptose de células de carcinoma de cólon. Para isso, células HT-29 ou HCT-116 foram tratadas com concentrações fisiologicamente relevantes de diversos AGCC e avaliou-se o estado de acetilação de histonas, crescimento e efeitos apoptóticos e de diferenciação. O propionato e o valerato interromperam o crescimento e a diferenciação em células de carcinoma de cólon humano, porém o butirato teve esses efeitos mais acentuados. O butirato também aumentou significativamente a apoptose e interrompeu o crescimento das células tumorais. O acetato não causou a

hiperacetilação de histonas e também não teve efeitos apreciáveis sobre o crescimento celular ou diferenciação.

Carraro e colaboradores (1993) avaliaram o efeito do butirato de sódio em ratos com CC, induzido por DMH. Os autores verificaram que a suplementação com butirato de sódio a 2% não alterou o número de tumores formados. Peluzio e colaboradores (2000) avaliaram os efeitos do butirato no CC experimental, por meio da quantificação dos FCA, em ratos Wistar tratados com DMH que receberam durante 30 dias butirato de sódio *ad libitum*, em substituição à água. Após 17 semanas, encontraram redução significativa nos FCA total no grupo que recebeu butirato, principalmente no segmento médio.

Apesar de muitos estudos mostrarem os efeitos benéficos do butirato sobre o CC, poucos deles utilizaram alimentos, como fonte de FOS, no tratamento do CC. Lobo e colaboradores (2007) analisaram a morfologia da mucosa do ceco em 24 ratos Wistar machos e adultos. Oito desses animais receberam dieta controle (AIN-93), outros oito receberam dieta suplementada com 5% de FOS, derivado da farinha de yacon, e o restante do grupo, 7% de FOS na dieta. Após os 27 dias, a histologia do cecal alterou sensivelmente em ratos alimentados com farinha yacon, houve aumento na profundidade e número de criptas totais e bifurcadas, indicando os efeitos benéficos da fermentação do FOS sobre a mucosa intestinal.

Moura e colaboradores (2012) tiveram como objetivo, no seu estudo, determinar a atividade quimioprotetora da ingestão de yacon sobre o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA), consideradas lesões pré-neoplásicas, induzidas por dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos. Os animais foram divididos em grupos e cada grupo recebeu concentrações diferentes de extrato de yacon e um dos grupos recebeu o probiótico *Lactobacillus casei*. Como resultado, após 20 semanas de intervenção, verificou-se redução no número, multiplicidade de FCA, número de adenocarcinomas invasivos e taxa de proliferação celular tanto em criptas colônicas como em tumores, nos grupos tratados com 1% yacon e no grupo que recebeu adicionalmente o probiótico. Este último grupo, aliás, também teve redução na multiplicidade de tumores invasivos e não invasivos.

Mas além dos efeitos benéficos decorrentes dos produtos da fermentação, a ingestão de fibras aumenta o bolo fecal, que diminui o tempo de trânsito intestinal, reduzindo a ação de substâncias carcinogênicas, processo esse intensificado pela diluição da concentração destas substâncias carcinogênicas no intestino. Além

disso, as fibras podem alterar o metabolismo energético dos colonócitos, reduzir a síntese de ácidos biliares secundários e impedir que esses se conjuguem a outras substâncias, o que pode gerar possíveis agentes carcinogênicos (HILL, 2003).

Estudos com humanos que investigaram os efeitos do FOS na neoplasia de cólon são raros. Búrigo e colaboradores (2007) compararam pacientes com diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas, submetidos a altas doses de quimioterapia e distribuídos em um grupo controle, que recebeu maltodextrina e outro grupo tratado com FOS. Encontraram valores de proteína C reativa maiores no grupo controle em relação ao grupo que recebeu FOS, indicando efeito benéfico deste nos processos inflamatórios e na demanda metabólica.

Ishikawa e colaboradores (2005) avaliaram a administração de fibras e probióticos do tipo *Lactobacillus casei* na prevenção de CC em população com risco de desenvolvimento de lesões intestinais, após remoção de pelo menos dois adenomas. Não foi encontrada diferença significativa no desenvolvimento de novas lesões de cólon entre 2 e 4 anos, porém, após 4 anos, a ocorrência de lesões de moderada e elevada intensidade foi significativamente menor no grupo que recebeu *Lactobacillus casei*, fato que diminuiu as chances de progressão para um câncer de cólon.

Dessa maneira, a utilização de prebióticos, especialmente o FOS, pode proporcionar muitos benefícios, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, como no câncer colorretal. No entanto, pouco é conhecido sobre a ação de fontes de FOS, como o yacon, sendo importante o estudo dos seus efeitos e mecanismos de ação no organismo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo experimental com animais foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana, do Departamento de Farmácia e Nutrição. As análises histológicas qualitativas, análises da excreção de lactulose e manitol urinários e processamento do yacon, foram realizadas, respectivamente, no Laboratório de Patologia Animal, do Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Análises Analíticas, do Departamento de Química e Laboratório de Operações Unitárias, do Departamento de Engenharia de Alimentos. Todos os laboratórios localizados no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.1 Animais

Foram utilizados 46 ratos machos Wistar adultos, com aproximadamente 4 semanas de idade e peso de 207 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da UFES. Os animais foram mantidos inicialmente em gaiolas de polietileno durante o período de 13 semanas e posteriormente, transferidos para gaiolas aramadas de aço inoxidável individuais, onde foram mantidos por um período de 8 semanas, totalizando as 21 semanas de estudo. Durante todo experimento, os animais foram mantidos em temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e a iluminação controlada para o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e receberam água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA), protocolo nº 004/2014 (Anexo 1).

4.2 Delineamento experimental

Dos 46 animais do estudo, 20 foram mantidos saudáveis e 26 animais receberam a indução do CC, por meio de uma dose semanal de 25mg/kg de peso da droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH- Sigma®), por via subcutânea, durante as 5 semanas iniciais do estudo. Nas 8 semanas subsequentes foi dado um intervalo para o desenvolvimento do CC. A DMH foi preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em NaCl 0,9%, contendo 15% de EDTA como veículo e o pH ajustado

para 6,5, na proporção de 1:1 (DMH:salina), conforme método utilizado por Rodrigues e colaboradores (2002).

Ao final do período de indução tumoral, ou seja, na 13ª semana do experimento, dois animais submetidos à indução do CC foram eutanasiados e seus intestinos coletados e analisados conforme BIRD, 1987, que confirmou a formação de FCA.

Os demais 24 animais com indução de CC foram divididos nos grupos C e CY e os 20 animais sem indução de CC foram divididos entre os grupos S e Y, conforme descrito abaixo:

- I. Grupo S:** grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon; n=10
- II. Grupo C:** grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon; n=12
- III. Grupo Y:** grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon; n=10
- IV. Grupo CY:** grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon; n=12.

Todos os animais receberam ração comercial (marca In Vivo®), durante as 13 semanas iniciais, independente da indução do câncer. Nas 8 semanas seguintes, os animais dos grupos S e C receberam dieta AIN-93M e os grupos Y e CY passaram a receber farinha de yacon adicionada à dieta AIN-93M, em quantidade suficiente para fornecer 7,5% de FOS, de acordo com Lobo e colaboradores (2011).

Os ratos foram monitorados diariamente em relação à ingestão alimentar e hídrica e eventuais intercorrências, como diarreia. Semanalmente foi monitorado o peso corporal. Ao final das 8 semanas de tratamento (21ª semana do experimento), os ratos foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de 0,2mL/100g peso corporal de solução anestésica contendo 3,75% cetamina, 2,5% xilazina e 3,75% de solução salina. Em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca, sendo distribuído em tubos heparinizados e tubos secos, afim de se coletar o plasma e o sangue total dos animais, respectivamente.

O intestino dos animais, utilizado para análise histológica qualitativa, foi recolhido nos dias de eutanásia, de acordo com a metodologia descrita posteriormente.

Para análise da permeabilidade intestinal, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, na última semana de intervenção, para coleta da urina durante 24 horas. O delineamento do estudo encontra-se na Figura 4.

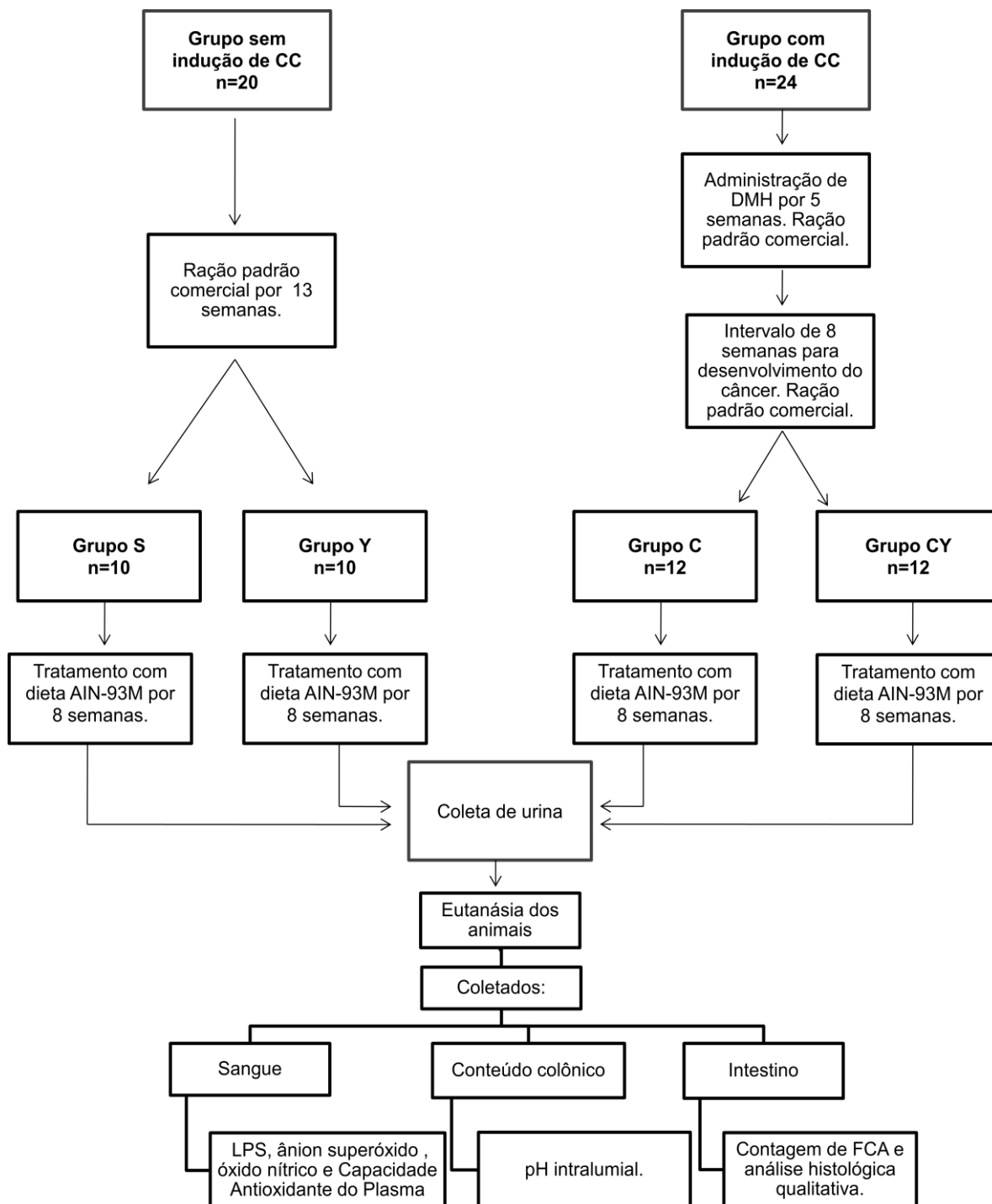


Figura 4. Delineamento experimental do estudo.

4.3 Protocolo de elaboração da farinha de yacon

O Yacon foi adquirido diretamente de um produtor da cidade de Santa Maria de Jetibá/ES. As raízes tuberosas foram pré-lavadas em água corrente, sanitizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos,

descascadas com descascador doméstico e fatiadas em forma de lâminas por meio de processador. Após, foram imersas em solução contendo 0,5% de ácido cítrico por 10 segundos, sendo então drenadas e encaminhadas para a secadora de bandejas com circulação de ar marca Poldryer, a 60°C por 24 horas e posteriormente trituradas em liquidificador para obtenção da farinha (VAZ TOSTES et al, 2014). Ao final do processo, a farinha foi armazenada em sacos plásticos de 2 a 5 kg à temperatura de -10°C, em freezer comercial, marca Electrolux®.

O conteúdo de FOS da farinha de yacon foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no Centro de Raízes e Amidos Tropicais-CERAT, Botucatu/SP. As análises de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, cinzas e umidade da farinha de yacon foram determinadas de acordo com método AOAC (1997). As análises foram realizadas em triplicata. Toda farinha utilizada no preparo das dietas pertenceu ao mesmo lote de raízes de yacon. A composição da farinha de yacon encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da Farinha de yacon.

Componentes	Quantidade (%)
Frutose	8,16
Glicose	3,76
Sacarose	7,25
FOS	52,20
Inulina	6,61
Fibras	10,68
Proteínas	4,52
Lipídeos	0,33
Fibras	10,68
Umidade	5,92
Cinzas	2,94

4.4 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram baseadas na dieta AIN93-M, segundo as recomendações do “American Institute of Nutrition” (REEVES et al, 1993).

A dieta dos grupos Y e CY foi suplementada com 7,5% de FOS, provenientes da farinha yacon (FY). Uma vez que esta continha 52,2% de FOS foi adicionada 14,37 g de FY/100 g de dieta. O conteúdo de caseína, sacarose, amido e fibra da dieta desses grupos experimentais foi ajustado, a fim que as dietas de todos os grupos apresentassem as mesmas concentrações de energia, carboidratos, lipídios, proteínas e fibras. A composição das dietas experimentais está apresentada na Tabela 2. As dietas foram armazenadas em local refrigerado durante um período máximo de quinze dias antes do consumo.

Tabela 2. Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M suplementada com FY.

INGREDIENTES (g/100g)	Grupos S e C	
	AIN-93M	AIN-93M + FY
Caseína	14,0	13,14
Amido Dextrinizado	15,5	15,5
Sacarose	10,0	7,24
Óleo de Soja	4,0	4,0
Fibra (celulose microfina)	5,0	0
Mix Minerais	3,5	3,5
Mix Vitamínico	1,0	1,0
L-Cistina	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
Amido de milho	46,57	40,81
Farinha de yacon	0	14,37
Energia total (kcal)	380,28	356,37

S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon; C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon; Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon; CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon. FY= Farinha de Yacon.

4.5 Consumo alimentar e alteração ponderal

O consumo alimentar foi avaliado semanalmente por meio da diferença entre peso da dieta ofertada e a sobra. O peso dos animais foi aferido semanalmente, sempre no mesmo horário do dia, em balança semi-analítica (RADWAG[®], modelo WPT 6C/1).

Foi calculado o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), por meio do ganho de peso do animal (g), subtraindo-se o peso inicial do final, dividido pelo consumo de dieta em cada grupo experimental.

4.6 Análise Histológica

O intestino grosso foi lavado com água destilada, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica com a mucosa interna do intestino voltada para cima e fixado em formol 10% por 24 horas.

4.6.1 Focos de Criptas Aberrantes

Após fixação em formol, os intestinos foram medidos e divididos igualmente em três fragmentos: proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida, corados com solução de azul de metileno a 1%, por 1 minuto e lavados com solução tampão fosfato salina (PBS). A superfície da mucosa intestinal foi então observada com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 4X para a identificação dos FCA, de acordo com Bird (1987).

A contagem de FCA foi feita por 2 observadores, independentes e treinados, de forma cega por toda superfície de mucosa do intestino grosso, de maneira adaptada ao método de Henriques e colaboradores (2009), sendo quantificados separadamente focos com menos de três criptas aberrantes ($FCA \leq 3$) e focos com mais de três criptas aberrantes ($FCA > 3$), sendo este último indicativo de lesões neoplásicas mais avançadas. Além disso, avaliou-se a porcentagem de redução dos FCA totais e dos focos com mais de 3 criptas aberrantes ou com 3 ou menos criptas, conforme Henriques (2004), da seguinte maneira:

- Calculou-se a porcentagem de FCA apresentada pelo grupo CY, em que se considerou a mediana de FCA do grupo controle (C) como 100%.

Esse resultado foi subtraído de 100%, resultando na porcentagem de redução dos FCA dos grupos teste em relação ao grupo controle.

As imagens dos FCA foram digitalizadas com o uso do microscópio óptico trinocular Prolab® B-350, com aumento de 4X, acoplado a câmara digital Dyno-eye com software de captura Dino Capture 2.0.

4.6.2 Histologia Qualitativa do Cólon

Após a contagem dos FCAs, o tecido de mucosa foi imerso em álcool amoníaco por 12 horas. Posteriormente, foi lavado em água corrente, colocado em cassetes e processado no histotécnico (OMA®), por 10 horas. Transcorrido esse tempo, os intestinos foram incluídos em blocos de parafina e, a partir destes, foram feitos cortes histológicos com 5 µm de espessura que foram montados sobre uma lâmina e corado com hematoxilina-eosina (HE).

Posteriormente, foram realizadas capturas de imagens dos cortes histológicos nas lâminas, nas dimensões de 1280X1024 pixels, utilizando a objetiva de 4X. Cada captura correspondia a um campo microscópico. Realizaram-se 5 capturas de imagens de cada segmento do cólon (proximal, medial e distal), totalizando 15 campos microscópicos em cada lâmina. Foram avaliados, por meio do programa Dino Capture 2.0 e na grandeza de µm, profundidade, diâmetro basal e apical de 3 criptas por campo, além da contagem manual do número total de criptas por campo microscópico (LOBO et al., 2007; MARTINS, 2014). Essas imagens foram realizadas em microscópio óptico trinocular Prolab® B-350, acoplado a câmara digital Dyno-eye com software de captura Dino Capture 2.0.

4.7 pH intraluminal do Cólon

Após remoção do intestino grosso dos animais, o conteúdo luminal do ceco foi retirado, pesado, diluído na proporção 1:10 em solução salina e homogeneizado em vórtex. Posteriormente, realizou-se a leitura do pH por meio de pHmetro de bancada (Kasvi®).

4.8 Capacidade Antioxidante Total do Plasma

O plasma obtido pela centrifugação do sangue (3000g, 10 minutos, 4°C) foi congelado a -80°C. A análise da capacidade antioxidante do plasma foi realizada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o kit comercial específico “Antioxidant Assay Kit”, marca Cayman Chemical Company® que quantifica tanto compostos antioxidantes hidrossolúveis quanto lipossolúveis. A leitura das amostras foi efetuada em leitor de microplaca Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO, em comprimento de onda de 750 nm e os resultados foram expressos como milimolar (mM) de Trolox equivalente (TE).

4.9 Preparo do estímulo: Zimosan opsonizado

Para o preparo do estímulo imunológico, 40 mg de zimosan foi ressuspendido em 40 mL de PBS e mantido em banho-maria por 30 minutos. Após, centrifugou-se a solução a 1500 *rpm* por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em 40 mL de PBS. Após nova centrifugação (1500 *rpm*; 5 minutos; 25°C), a solução foi ressuspendida em 4 mL de soro de rato, o volume completado para 20 mL com PBS e incubada a 37°C por 30 minutos em banho-maria. Uma nova centrifugação foi realizada (2000 *rpm*, 5 minutos; 4°C) e o sedimento foi lavado 1 vez em PBS gelado e centrifugado a 2000 *rpm*, 5 minutos; 4°C. A concentração foi ajustada para 7 mg/mL com hanks hepes e a solução aliquoteada em tubos resfriados que foram congelados a -80°C.

4.10 Isolamento de Neutrófilos

Após a coleta do sangue em tubos seco, adicionou-se o mesmo volume, correspondente ao de sangue, de PBS (tampão fosfato salino) e centrifugou-se a 550 g a 22°C por 20 minutos. Depois da lavagem, removeu-se, cuidadosamente, o plasma e a camada de células imunes mononucleares. Ao volume de papa contendo hemácias e granulócitos, acrescentou-se a solução de gelatina 2,5% em PBS à 37°C em quantidade equivalente a 2 vezes o volume de células e incubou-se a 37°C durante 30 min para sedimentar os eritrócitos. O sobrenadante, contendo granulócitos, foi recolhido em tubo novo e misturado com 1 volume de PBS na

temperatura ambiente. Após centrifugar (550 g a 22°C por 20 minutos), novamente ressuspendeu-se o sedimento em 1 volume de PBS e foi realizada outra centrifugação para lavagem. Logo após, as hemácias restantes foram lisadas com cloreto de amônio durante 5 minutos a 37°C. Centrifugou-se a 200g a 4°C por 10 minutos, adicionou-se 30 mL de PBS e foi realizada nova centrifugação. Ao final, adicionou-se Hanks Hepes contendo 0,1% de gelatina para ressuspender as células. Em seguida, uma retirou-se uma alíquota para contagem de células em câmara de Neubauer e teste de viabilidade celular por exclusão com Azul de Tripán. Por meio da contagem, determinou-se a diluição necessária para se obter uma concentração de 5×10^5 células/mL, conforme Lucisano e Mantorani (1984), com modificações.

4.11 Liberação de Ânion Superóxido

A liberação extracelular de ânion superóxido (O_2^-) foi medida pelo método de redução do ferrocitocromo C, levando-se em conta apenas a redução inibível pela superóxido dismutase (SOD), conforme descrito por Johnston e Lehmeyer (1976), com modificações. Brevemente, a reação foi realizada em placa de cultura de tecido de 96 poços e iniciou-se pela incubação da suspensão de 100 μ L de neutrófilos isolados (5×10^5 cél/mL) com 10 μ L de ferrocitocromo C (15 mg/mL) dissolvido em meio Hank's hepes gelatina (0,1 g/mL). Em seguida, 40 μ L de imunocomplexo zimosan opsonizado e 100 μ L Hanks hepes foram adicionados separadamente. Nos controles do experimento foram acrescentados 10 μ L de (SOD) (1500 μ g/mL) para inibir a produção de ânion superóxido e garantir a especificidade do experimento. Nos demais poços foram adicionados 10 μ L de Hanks hepes, totalizando um volume final de 260 μ L de solução em cada poço. A mistura de reação foi incubada por 60 minutos a 37°C, em uma atmosfera saturada de vapor de água, sem agitação. Transcorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 730g por 10 minutos a 4°C para remoção das células. A suspensão final foi lida em leitor de microplaca, marca Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO, no comprimento de 550nm e a densidade óptica resultante foi convertida para nM de ferrocitocromo C reduzido, utilizando-se o coeficiente de extinção $\Delta E_{550nm} = 2,1 \times 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ (MASSEY, 1959).

4.12 Dosagem de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico foi determinada pelo acúmulo de nitrito (NO_2^-), produto final estável da reação de óxido nítrico (NO) com oxigênio, em solução aquosa. O acúmulo de nitrito no sobrenadante de cultura foi medido pela reação de Griess, conforme descrito por Green e colaboradores (1982), com modificações. 100 μL de neutrófilos isolados (5×10^5 células/mL) foram incubados, por 180 min a 37°C em uma atmosfera de vapor de água sem agitação, em microplacas de 96 poços no meio RPMI 1640 sem fenol vermelho, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), penicilina (0,1g/L), estreptomicina (0,1g/L), piruvato de sódio (0,11g/L) e bicarbonato de sódio (2,2g/L). Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 730g por 10 minutos a 4°C e congelado a -80°C .

Para dosagem de NO_2^- , adicionou-se 100 μL do sobrenadante de cultura a igual volume do reagente de Griess (Sigma®) e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi determinada a 540nm em leitor de microplaca, marca Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO. A concentração de NO_2^- foi estabelecida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) realizada em concentração que variou de 0,04 a 100 μM de NaNO_2 .

4.13 Permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal realizou-se na última semana de intervenção. Para essa análise, os animais foram mantidos em jejum por 12h e, posteriormente, foi administrado por gavagem 2 mL de solução contendo 200 mg de lactulose e 100 mg de manitol. Após a administração, os animais foram alocados em gaiola metabólica e permaneceram em jejum por 5 horas. Foi realizada a coleta de urina de 24 h, sendo o volume medido, registrado e armazenado a -80°C até a análise laboratorial (SONG et al., 2011).

Para determinação das concentrações de lactulose e manitol, a urina coletada foi filtrada em filtros Millipore de 0,45 mm e cerca de 1,5 mL foi colocado em vials para HPLC. Para análise, utilizou-se HPLC, da marca Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema de cromatografia consistiu em desgaseificador (Modelo DGU-14A), bomba (Modelo LC-10AT), injetor automático (modelo SIL-20A), forno de coluna (Modelo CTO-10AS) e detector de UV-Vis (modelo SPD-10AV) ligado em série com um

detector de índice de refração (modelo RID-10A). A coluna analítica utilizada foi Aminex HPX-87H (300 cm x 8.7 mm) da marca BIO-RAD (Califórnia, EUA). As análises por HPLC foram realizadas a 55°C, numa pressão de 1920 psi, sob condições isocráticas. A fase móvel empregada foi água em 0,005 mM de ácido sulfúrico, com volume de injeção da amostra de 100 µL (SÁ et al., 2011).

Para a padronização do teste e o adequado conhecimento dos valores medidos na unidade g/L, quantidades conhecidas de lactulose (12,5 a 0,1953mM) e manitol (25 a 0,3906 mM) foram avaliadas separadamente no HPLC, com a finalidade de se compor a equação da reta dos mesmos ($y = ax + b$).

A urina foi analisada em HPLC e suas áreas sob a curva indicavam os valores de y em mMol/L e, uma vez aplicada a equação da reta, determinou-se os valores de x. Esse valor foi transformado para g/L para o cálculo das taxas de excreção da lactulose e do manitol pela fórmula:

$$[(x \cdot \text{volume urina excretada em 12h}) / 0,1 \text{g manitol ingerido}] \cdot 100$$

$$[(x \cdot \text{volume urina excretada em 12h}) / 0,2 \text{g lactulose ingerida}] \cdot 100$$

Para a relação entre os mesmos, dividiu-se a taxa de excreção da lactulose pela taxa de excreção do manitol.

4.14 Endotoxemia

Uma alíquota de 1,5 mL de sangue dos animais foi centrifugado (3000 g; 10 minutos; 4°C) e 10 µL de plasma foi diluído em água livre de endotoxinas na proporção de 1:10. Os níveis de lipopolissacarídeos (LPS) foram medidos no plasma pelo teste do lisato de amebócito do Limulus (LAL) com determinação do ponto final cromogênico, utilizando proteínas livres de toxinas, por meio de kit comercial específico da marca HIT302® e seguindo a recomendação do fabricante. Todo procedimento foi realizado em capela a fim de evitar contaminação externa.

A suspensão final foi lida em leitor de microplaca, marca Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO, no comprimento de 405nm. Os resultados foram expressos em EU/mL (unidade de endotoxina por mL de plasma), conforme orientação do fabricante do kit.

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Statistica, versão 10. As amostras foram testadas pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e naquelas com distribuição normal, os grupos foram testados para os efeitos da farinha de yacon e do câncer colorretal e/ou as suas interações utilizando-se “Two-way” ANOVA (análise de variância) seguida por “post hoc” de Newman-Keuls ($p < 0,05$). As amostras que não apresentaram distribuição normal foram transformadas (utilizando a função \log_{10}). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP), sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar.

Após o período de 8 semanas de intervenção, o CC exerceu influência sobre o consumo alimentar dos animais ($p < 0,05$), de forma que o grupo C apresentou consumo alimentar estatisticamente superior aos grupos S e Y, porém semelhante ao grupo CY, como pode ser observado na Tabela 3. Não houve diferença entre os demais grupos experimentais.

Quanto ao ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), a farinha de yacon e o CC não influenciaram nessas variáveis, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 3).

5.2 Análises Histológicas

5.2.1 Focos de criptas aberrantes

No exame da mucosa colônica dos animais foram observados FCAs em todos os grupos experimentais, mas principalmente nos grupos C e CY, como pode ser observado na Figura 5.

Os grupos com indução de câncer (C e CY), apresentaram maior número ($p < 0,05$) de FCA totais, focos com número igual ou inferior a 3 criptas aberrantes e focos com mais de 3 criptas aberrantes em comparação aos sem indução de câncer, grupos S e Y (Tabela 4).

Na avaliação do total de FCA no segmento proximal do intestino grosso, o grupo S apresentou a menor média e se diferenciou significativamente dos demais grupos que não diferiram entre si, apesar do fator câncer mostrar-se significativo ($p < 0,05$).

Já na porção medial, os grupos C e CY não diferiram entre si e apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) em comparação aos grupos S e Y que foram estatisticamente iguais.

Na porção distal do cólon, observou-se interação entre os fatores farinha de yacon e CC ($p < 0,05$), de modo que a resposta à farinha de yacon dependeu da presença ou não de câncer. Na ausência de câncer, o yacon promoveu aumento do número de FCA que é comparável aos valores na presença de câncer. Isso ficou

evidenciado pelo fato do grupo Y apresentar valores de FCA semelhantes ao grupo CY e maiores que o grupo S. Porém, na presença da neoplasia, a farinha de yacon não tem atuação, fato confirmado pelo valor médio de C não ser estatisticamente diferente de CY.

Além disso, independente do grupo experimental, a região medial foi a que apresentou maior média de FCA total (16,93), valor que foi estatisticamente igual à região proximal (11,15), porém diferente da região distal (8,15). As regiões proximal e distal não diferiram entre si ($p>0,05$).

Além da análise categórica dos dados de FCA, foi realizado o cálculo da porcentagem de redução dos FCA do grupo CY em comparação ao grupo C. Houve redução de 41,22%, 47,22% e 47,22% de FCAs totais, ≤ 3 e >3 , respectivamente, do grupo CY em relação ao grupo C, ao fim das 8 semanas de tratamento com farinha de yacon, demonstrando atuação clínica benéfica da farinha de yacon no CC.

5.2.2 Histologia qualitativa do cólon

Observa-se na Tabela 5 que o consumo de farinha de yacon (FY), bem como a presença de CC, não influenciaram nos diâmetros apicais e basais das criptas colônicas ($p>0,05$) e, mesmo a FY exercendo efeito significativo no número de criptas por campo microscópico, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais para esse parâmetro.

Porém, o consumo de farinha de yacon influenciou significativamente na profundidade das criptas colônicas, de modo que os grupos Y e CY apresentaram uma maior profundidade de cripta, comparados ao grupo C ($p>0,05$). O grupo S não diferiu de nenhum outro grupo experimental ($p>0,05$).

Tabela 3. Peso inicial e final, consumo alimentar, ganho de peso e CEA.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FYxCC
Peso inicial (g)	410,90	413,50	418,10	417,73	-	-	-
Peso Final (g)	488,96	477,75	509,39	506,69	-	-	-
Ganho de Peso (g)	78,06±11,3 ^a	64,25±11,30 ^a	91,29±10,3 ^a	88,96±10,8 ^a	0,4647	0,0904	0,6023
Consumo alimentar (g)	1403,30±39,1 ^b	1357,25±39,1 ^b	1550,79±35,7 ^a	1475,96±37,3 ^{ab}	0,1183	0,0011	0,7059
CEA	5,55±0,8 ^a	4,55±0,8 ^a	5,93±0,7 ^a	6,13±0,7 ^a	0,7037	0,2506	0,5112

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). Peso inicial= 13^a semana experimental; Peso Final= 21^a semana experimental. FY=Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal. CEA= Coeficiente de Eficiência Alimentar.

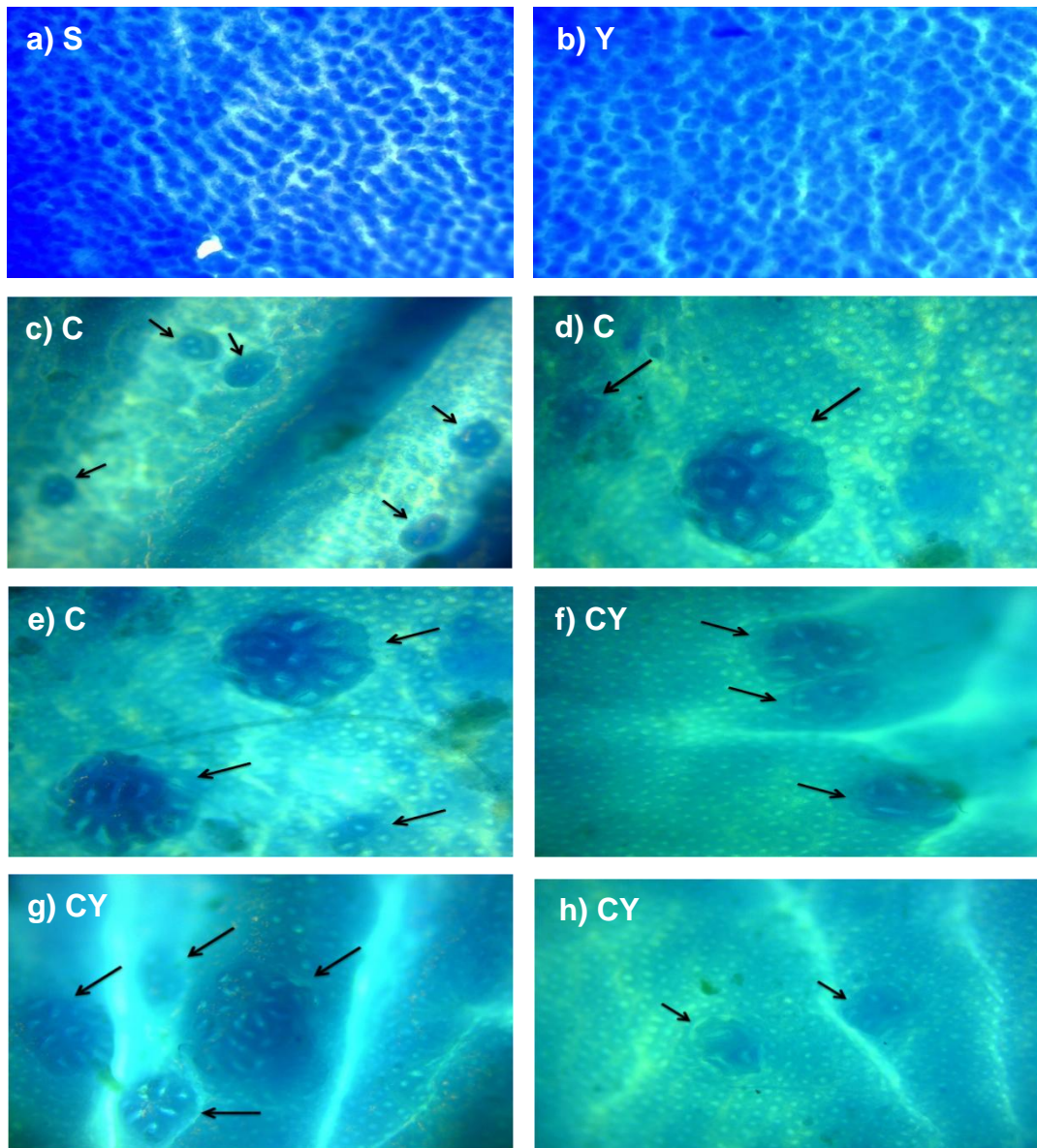


Figura 5. Mucosa e FCA no cólon de ratos Wistar. a) Área de mucosa normal de animal do grupo S. b) Área de mucosa normal de animal do grupo Y. c) Área de mucosa com 4 focos contendo ≤ 3 criptas aberrantes cada e 1 foco com >3 criptas aberrantes de animal do grupo C. d) Área de mucosa com 1 foco contendo incontáveis criptas aberrantes e 1 foco com 3 criptas aberrantes de animal do grupo C. e) Área de mucosa com 2 focos contendo incontáveis criptas aberrantes cada e 1 foco com >3 criptas aberrantes de animal do grupo C. f) Área de mucosa com 3 focos contendo >3 criptas aberrantes cada de animal do grupo CY. g) Área de mucosa com 2 focos contendo incontáveis criptas aberrantes cada e 2 focos com >3 criptas aberrantes cada de animal do grupo CY. h) 1 foco com 3 criptas aberrantes e 1 foco com >3 criptas aberrantes de animal do grupo CY. S= grupo sem CC e sem FY; C= grupo com CC e sem FY; Y= grupo sem CC e com FY; Y= grupo com CC e com FY. Objetiva: 4X. Corante: Azul de metileno.

Tabela 4. Média dos valores de focos de criptas aberrantes totais e com menos que três e mais que três criptas por foco e FCA totais por segmento do intestino grosso.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY xCC
FCA Totais	1,87 ± 1,27 ^b	20,83 ± 48,13 ^b	68,04 ± 49,73 ^a	49 ± 37,42 ^a	0,2376	<0,0001	0,1247
FCA ≤3	0,85 ± 2,50 ^c	1,22 ± 2,63 ^c	18,79 ± 2,28 ^a	11,32 ± 2,38 ^b	0,1558	<0,0001	0,1179
FCA >3	0,65 ± 8,53 ^b	1,06 ± 9,54 ^b	49,25 ± 7,79 ^a	37,68 ± 8,13 ^a	0,9123	0,0006	0,1964
Proximal	0,00 ± 0,69 ^b	5,78 ± 12,05 ^{ab}	23,92 ± 23,24 ^a	14,41 ± 12,59 ^a	0,6638	0,0007	0,2466
Medial	0,75 ± 4,58 ^b	0,75 ± 5,11 ^b	28,96 ± 4,17 ^a	24,64 ± 4,36 ^a	0,6391	<0,0001	0,6391
Distal	0,5 ± 0,0 ^c	6,43 ± 3,14 ^b	16,54 ± 10,96 ^a	10,95 ± 12,03 ^{ab}	0,1913	<0,0001	0,0031

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal. FCA= Focos de Criptas Aberrantes.

Tabela 5. Características morfológicas da mucosa do cólon.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY x CC
Diâmetro Apical (μm)	99,01 \pm 2,82 ^a	103,14 \pm 2,82 ^a	105,01 \pm 2,57 ^a	100,58 \pm 2,57 ^a	0,9572	0,5313	0,1246
Diâmetro Basal (μm)	97,11 \pm 3,52 ^a	100,31 \pm 3,52 ^a	105,63 \pm 3,21 ^a	100,32 \pm 3,36 ^a	0,7571	0,2179	0,2188
Profundidade (μm)	592,30 \pm 39,44 ^{ab}	667,77 \pm 39,44 ^a	512,75 \pm 36,00 ^b	689,57 \pm 37,60 ^a	0,0020	0,4536	0,1918
Número de Criptas	60,89 \pm 3,48 ^a	67,07 \pm 3,48 ^a	60,77 \pm 3,15 ^a	68,36 \pm 3,30 ^a	0,0478	0,8627	0,8362

Valores apresentados como média \pm EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal.

5.3 pH intraluminal

Os grupos C e S apresentaram valores semelhantes ($p < 0,05$) de pH, porém maiores ($p < 0,05$) em comparação aos grupos Y e CY que, por sua vez, não diferiram entre si (Tabela 6). Esse resultado revela que o consumo de farinha de yacon possibilitou diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores de pH intraluminal.

5.4 Capacidade Antioxidante Total do Plasma

Para análise da capacidade antioxidante total do plasma (CAT), utilizou-se Trolox (ácido-tetrametilcroman-2-carboxílico 6-hidroxi-2,5,7,8) como o padrão, cujo coeficiente de determinação (R^2) foi 0,993.

Observa-se que a FY exerceu efeito significativo sobre a CAT, porém não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais, como pode ser observado na Tabela 7.

5.5 Liberação de Ânion Superóxido

É possível notar que independentemente ao estímulo imunológico por zimozan não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Apesar da interação entre os fatores câncer e farinha de yacon ter se apresentado significativo na dosagem de ânion superóxido sem o estímulo, essa diferença não foi identificada entre os grupos (Tabela 8).

5.6 Óxido Nítrico

Na dosagem de óxido nítrico, o valor do R^2 encontrado na curva padrão foi de 0,999. Na Tabela 8, observa-se que o câncer atuou significativamente em ambas análises, com ou sem estímulo por zimozan. Os valores médios de óxido nítrico encontrados no grupo Y foram maiores que os valores encontrados no grupo CY ($p < 0,05$), ou seja, o câncer diminuiu a liberação de óxido nítrico no animal que consumiu a farinha de yacon, comparado àquele que não apresentava a neoplasia e consumiu a farinha. Os demais grupos não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Tabela 6. pH intraluminal.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY x CC
pH	7,70± 0,18 ^a	6,32±0,18 ^b	7,69±0,17 ^a	6,34±0,18 ^b	<0,0001	0,9649	0,9340

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). Letras iguais na mesma linha: grupos semelhantes entre si ($p > 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal.

Tabela 7. Capacidade Antioxidante Total do Plasma.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY xCC
CAT (mMTE)	1,42 ±0,02 ^a	1,44 ±0,02 ^a	1,41 ±0,02 ^a	1,48 ±0,02 ^a	0,0304	0,5710	0,2732

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon(n=12). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal. mMTE= milimolar de trolox equivalente.

Tabela 8. Liberação de ânion superóxido e óxido nítrico por neutrófilos, estimulados ou não por zimozan.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY xCC
O ^{2-#} (nM FC)	0,63 ± 0,30 ^a	0,62 ± 0,38 ^a	0,26 ± 0,27 ^a	1,14 ± 0,33 ^a	0,1999	0,8331	0,1960
O ²⁻ (nM FC)	0,90 ± 0,18 ^a	0,24 ± 0,18 ^a	0,22 ± 0,16 ^a	0,42 ± 0,23 ^a	0,2527	0,2002	0,0405
NO ^{2-#} (µM NO ₂)	0,64 ± 0,16 ^{ab}	0,97 ± 0,14 ^a	0,59 ± 0,13 ^{ab}	0,34 ± 0,16 ^b	0,7924	0,0381	0,0730
NO ²⁻ (µM NO ₂)	0,66 ± 0,07 ^{ab}	0,73 ± 0,07 ^a	0,54 ± 0,07 ^{ab}	0,39 ± 0,09 ^b	0,6401	0,0095	0,1810

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=5); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=6); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=5); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=4). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal. O₂⁻: ânion superóxido basal; NO₂⁻: óxido nítrico basal; #: estimulado por zimozan; µM NO₂= micromolares de nitrito; nM FC= nanomolares de Ferrocitocromo C.

5.7 Permeabilidade intestinal

A porcentagem de excreção urinária de lactulose e manitol, assim como razão entre esses valores estão expressos na Tabela 9. Os valores do R^2 da curva padrão de lactulose e manitol foram de 0,998 e 0,997, respectivamente. Na excreção de manitol urinário houve interação significativa entre os fatores farinha de yacon e câncer colorretal, de modo que na ausência da FY e presença de CC ocorreu uma maior excreção urinária de manitol. Porém a presença de FY promoveu redução de excreção urinária de manitol, mesmo na presença da neoplasia. Na comparação entre os grupos experimentais, a maior excreção urinária de manitol foi encontrada no grupo C ($p < 0,05$) seguido pelo grupo S. Os menores valores foram encontrados nos grupos Y e CY, que não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Já para a porcentagem de excreção urinária de lactulose, a FY demonstrou efeito significativo, reduzindo a excreção urinária de lactulose, de modo que os grupos que não consumiram FY (C e S) apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) em comparação aos grupos que consumiram FY (Y e CY). Quanto à razão lactulose/manitol (L/M), os grupos C e CY foram os únicos que diferiram entre si ($p < 0,05$), evidenciando ação positiva da farinha de yacon sobre a permeabilidade intestinal no CC.

5.8 Endotoxemia

A endotoxemia foi medida por meio dos níveis de lipopolissacarídeos (LPS) plasmáticos. A curva padrão realizada com o padrão LAL (lisato de amebócito do *Limulus*) gerou um R^2 de 0,959.

O CC teve influência significativa sobre os valores de LPS plasmáticos ($p < 0,05$) (Tabela 10). Esse dado é confirmado uma vez que o grupo C diferiu estatisticamente dos grupos S e Y, e foi igual ao grupo CY ($p > 0,05$), demonstrando atuação da neoplasia de cólon nesse parâmetro. Entretanto, não foi encontrado efeito do consumo de FY sobre a endotoxemia, apesar de os níveis de endotoxemia do grupo CY se manterem semelhantes aos dos grupos sem neoplasia (S e Y).

Tabela 9. Porcentagem de excreção urinária de lactulose e manitol e a razão entre elas.

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FYxCC
% excreção urinária de manitol	6,10±0,67 ^b	3,51±0,67 ^c	8,45±0,61 ^a	2,87±0,64 ^c	<0,0001	0,1945	0,0268
% excreção urinária de lactulose	4,41±0,87 ^a	1,76±0,87 ^b	6,34±0,79 ^a	1,0±0,83 ^b	<0,0001	0,4905	0,1171
Razão lactulose/manitol	0,68±0,11 ^{ab}	0,45±0,11 ^{ab}	0,78±0,10 ^a	0,39±0,10 ^b	0,0051	0,8284	0,4089

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal.

Tabela 10. Níveis de Endotoxina (EU/mL de plasma).

Variáveis	Grupos				<i>p</i>		
	S	Y	C	CY	Efeito da FY	Efeito do CC	Interação entre FY x CC
LPS	0,28±0,07 ^b	0,31±0,07 ^b	0,58±0,08 ^a	0,51±0,07 ^{ab}	0,8144	0,0022	0,5092

Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes na mesma linha: grupos diferem entre si ($p \leq 0,05$). Letras iguais na mesma linha: grupos semelhantes entre si ($p > 0,05$). S= grupo sem indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=10); C= grupo com indução de câncer de cólon e sem farinha de yacon (n=12); Y= grupo sem indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=10); CY= grupo com indução de câncer de cólon e com farinha de yacon (n=11). FY= Farinha de Yacon, CC= Câncer colorretal.

6 Discussão

O yacon é amplamente cultivado em todo o mundo e seu consumo está associado a muitos benefícios à saúde, dentre eles encontra-se sua capacidade de modular a microbiota intestinal, função imunológica e atuação sobre câncer de cólon (VAZ-TOSTES et al., 2014; MOURA et al., 2014).

Esses efeitos estão associados à fermentação do FOS, presente em grande quantidade na raiz de yacon, pela microbiota intestinal. No presente estudo, a quantidade de FOS encontrada (52,2%) foi superior ao encontrado no estudo de Vasconcelos et al. (2010) que verificaram teores de 19,4%, porém menor ao encontrado por Lobo et al. (2011), 55,3%. Essa variação nos teores de FOS é decorrente do período em que o yacon é colhido, da sazonalidade, clima, altitude, solo e tratamento pós-colheita, incluindo o processamento e o armazenamento ao qual essa raiz é submetida (RODRIGUES et al., 2011).

No presente estudo, o consumo da farinha de yacon não alterou o ganho de peso, consumo alimentar e o CEA dos animais. Isso pode estar relacionado ao estágio precoce da lesão cancerígena induzida, visto que a caquexia só se apresenta em estágios mais avançados da doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Porém o CC aumentou significativamente o consumo alimentar dos animais, e não alterou o ganho de peso e o CEA. Resultados que, de acordo com a literatura, são plausíveis, uma vez que não é frequente a desnutrição no câncer de cólon e reto. Isto pode ser explicado devido ao menor comprometimento da ingestão alimentar, ausência de distúrbios nutricionais absorptivos, alterações metabólicas mínimas e inexistência de fatores obstrutivos ou efeito hormonal para a caquexia por esta neoplasia (FORTES, 2007). A perda de peso irá depender do tipo e do estágio do tumor, dos órgãos envolvidos, dos tipos de terapias utilizadas e da localização do tumor. Por outro lado, o ganho de peso não é comum em portadores de câncer (PEREIRA, NUNES e DUARTE, 2015).

Assim como no presente estudo, Moura e colaboradores (2014) não encontraram alteração no consumo alimentar e ganho de peso em ratos com câncer de cólon induzido e recebendo extrato de yacon.

Nesse estudo observou-se que o consumo de farinha de yacon foi capaz de reduzir o pH intraluminal. Esse resultado é muito positivo, uma vez que um ambiente

ácido no lúmen colônico prejudica o crescimento de patógenos oportunistas, por provocar rompimentos das membranas das bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, inibindo o crescimento das mesmas (ALAKOMI et al., 2000). De forma semelhante ao presente estudo, Paula e colaboradores (2012), Rodrigues e colaboradores (2012), Sant'anna e colaboradores (2013) e Lobo e colaboradores (2007) verificaram redução do pH do conteúdo cecal após consumo de FOS/Inulina. No entanto, Martins (2014), não encontrou esse resultado em seu estudo com ratas ovariectomizadas que receberam 6% de FOS durante 20 semanas.

Um pH mais ácido melhora a solubilidade de minerais, aumentando a absorção no intestino grosso e pode ser indicio da presença de AGCC nas fezes, que participam de muitos processos benéficos ao organismo (RODRÍGUEZ-CABEZAS et al., 2010). Dentre esses processos, os AGCC estimulam a hipertrofia das células da mucosa intestinal, levando a um aumento da área de superfície no intestino, fato encontrado no presente estudo, em que houve um aumento na profundidade das criptas colônicas, apesar de não ter estimulado um aumento no número de criptas. Acredita-se que esse aumento das criptas ocorra em função da fermentação do FOS, promovendo um incremento da área da superfície absorviva (WEAVER et al., 2010).

Lobo e colaboradores (2011) observaram que ratos Wistar consumindo 7,5% de FOS, derivado da FY, aumentou a fermentação no ceco, a biodisponibilidade de ferro, o diâmetro da parede e conteúdo do ceco e reduziu o pH intraluminal. De modo semelhante, em seu outro estudo, Lobo e colaboradores (2014), verificaram que a suplementação com 7,5% FOS foi capaz de aumentar a fissão e proliferação de células nas criptas do ceco.

No estudo de Genta e colaboradores (2005) analisou-se os efeitos do consumo de três doses diferentes de FOS, derivado da farinha de yacon, durante 120 dias em ratos Wistar saudáveis. Os autores verificaram que a FY foi bem tolerada, não produziu qualquer toxicidade ou efeito nutricional adverso, independente da dose (340 mg FOS/kg ou 6800 mg FOS/kg). Além de promover hipertrofia cecal, porém este último apenas no consumo da maior dose de yacon. Também, Campos e colaboradores (2012) forneceram, durante 8 semanas, farinha de yacon suficiente para ofertar 5% de FOS a porcos. Os autores observaram um

crescimento das bifidobactérias e lactobacilos, resultando em altos níveis de AGCC no material cecal e aumento da densidade celular e formação de criptas no cólon intestinal.

Além da profundidade, neste estudo, avaliou-se o diâmetro apical e basal das criptas colônicas. O maior valor médio encontrado entre os grupos foi de 105,63 μm e não foi observada diferença significativa entre as médias dos grupos. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Martins (2014), em que ratas ovariectomizadas recebendo 6% de FOS/inulina não apresentaram diferença significativa do grupo controle.

A análise dessa variável morfométrica é de grande importância, pois criptas com diâmetros basal e apical superiores a 115 μm são consideradas aberrantes, sendo capazes de estimular alterações das células para formação de tumores (TSUKAMOTO et al., 2001). Sendo assim, o consumo de FY promoveu a hipertrofia das criptas, uma vez que a profundidade das mesmas aumentou, porém sem interferir adversamente na morfologia das mesmas.

Os FCA encontrados nos grupos tratados com DMH, ou seja, grupos C e CY, comprovam a eficácia do modelo de carcinogênese descrito por Bird (1987). Diferente do descrito na literatura, em que os FCAs são observados com maior frequência no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (RODRIGUES et al., 2002; LARANJEIRAS et al., 1998; HENRIQUES, 2004), no presente estudo, os FCA foram observados principalmente nos segmentos proximal.

Acredita-se que os prebióticos possam reduzir o processo de carcinogênese pelo fato de induzirem considerável modificação na microbiota intestinal com aumento do número de bifidobactérias. Além disso, os prebióticos atuam na redução da formação das FCAs, marcador que precede o processo de carcinogênese do cólon, sugerindo, portanto, que tenham potencial para suprimir tal neoplasia por meio da modificação da microbiota do cólon (MARQUES, WAITZBERG, 2000).

Porém, neste estudo, não foi observada redução no número de FCA totais e com FCA >3 , mas reduziu os FCAs ≤ 3 , comparando-se o grupo C ao CY. Além disso, a farinha de yacon foi capaz de reduzir em mais de 40% os valores de todas as classes de FCA, demonstrando a importância clínica do consumo dessa farinha. A fermentação de frutanos, incluindo os FOS, produz AGCC, dos quais butirato foi mostrado ter várias propriedades biológicas contra carcinogênese do cólon de rato

(POOL-ZOBEL e SAUER, 2007). Em células de carcinoma, o butirato tem demonstrado inibir a proliferação celular e angiogênese, além de induzir a apoptose (DAVIS; MILNER, 2009).

É mostrado na literatura que os probióticos, prebióticos ou os simbióticos podem modular a resistência imunológica do hospedeiro contra doenças inflamatórias intestinais (POOL-ZOBEL, 2005; POOL-ZOBEL E SAUER, 2007), além de fornecerem efeitos protetores contra biomarcadores precoces e desenvolvimento de tumores no cólon de ratos tratados com carcinógenos (MOURA et al., 2014).

Hughes e Howland (2001) observaram, em seu estudo com ratos, que a média do número de apoptose foi maior no cólon dos ratos alimentados com FOS e inulina em comparação ao grupo alimentado com dieta basal. Também Moura e colaboradores (2012) verificaram que após 20 semanas de intervenção, ofertando 1% de FOS derivado do extrato de yacon a ratos, houve redução no número, multiplicidade de FCA, número de adenocarcinomas invasivos e taxa de proliferação celular tanto em criptas colônicas como em tumores, além de redução na multiplicidade de tumores invasivos e não invasivos no grupo que recebeu adicionalmente um probiótico. Já Lobo e colaboradores (2007), observaram que após os 27 dias, ratos alimentados com 5% ou 7% FOS, proveniente da farinha yacon, houve aumento na profundidade e número de criptas totais e bifurcadas, indicando os efeitos benéficos da fermentação do FOS sobre a mucosa intestinal.

Além disso, o consumo de FOS estimula o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável que é essencial para o desenvolvimento adequado do sistema imune do hospedeiro, exercendo importante função na indução da produção de células de defesa, como células T (reguladoras e auxiliares) e sIgA (TURRONI et al., 2014). Além disso, a presença da microbiota intestinal saudável promove um estado de tolerância imunitária, impedindo a resposta imunológica contra organismos comensais e proteínas da dieta, evitando alergias alimentares e perturbações intestinais, como a síndrome do intestino irritável (DELGADO et al., 2012).

No presente estudo, não foi encontrada alteração nos níveis de ânion superóxido, independente ao estímulo imunológico por zimosan e presença/ausência de CC ou farinha de yacon, porém verificou-se interação entre esses fatores. Já o óxido nítrico (NO) apresentou valores mais elevados no grupo

sem indução de câncer que consumiu a farinha de yacon (grupo Y), de modo que o câncer diminuiu significativamente este marcador do estresse oxidativo. Ânion superóxido e NO são espécies reativas do oxigênio (ERO), resultantes da atuação de neutrófilos contra microrganismos (NATHAN, 2006).

Os neutrófilos apresentam o complexo enzimático NADPH, responsável pela produção de ânion superóxido, a primeira ERO a ser produzida. Esse complexo permanece inativado, porém quando o neutrófilo é ativado, que pode ocorrer por ação de diferentes estímulos, como acetato de forbol miristato (PMA), formil metil-leucil-fenilalanina (fMLP), leucotrieno-B₄, zimosan ou partículas opsonizadas, resulta na sinalização de diferentes vias, como a da proteína G (fMLP) ou a ativação direta da proteína quinase C (PKC). Dessa forma, os componentes citossólicos e de membrana desse sistema são reorganizados. Nesse processo, as proteínas p47phox e p67phox são fosforiladas pela proteína quinase C (PKC) e as subunidades citossólicas migram para a membrana, onde se associam ao citocromo b558. A associação do citocromo b558 com os componentes citossólicos torna a oxidase ativa, que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular gerando o superóxido (SHEPPARD et al., 2005).

Neutrófilos possuem a isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS 2), que após o processo de ativação da célula, por exemplo, com interferon- γ (IFN- γ), lipopolissacarídeo (LPS) ou fator de necrose tumoral (TNF), converte L-arginina a L-citrulina e óxido nítrico (NO). O NO é um dos principais mecanismos antimicrobianos de macrófagos e neutrófilos. O NO pode afetar diversas respostas celulares e sua produção por fagócitos tem importante função na destruição de células tumorais e no controle da proliferação de linfócitos durante a resposta imune (VINOLO, 2010).

Os AGCC, produzidos pela fermentação do FOS, podem causar nos neutrófilos alteração do pH intracelular, mobilização de cálcio intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fagocitose e morte de microrganismos e distribuição de proteínas do citoesqueleto (VINOLO, 2010). Em concentrações elevadas, o NO pode atuar como um potente agente anti-carcinogênico, promovendo apoptose, necrose e inibição da angiogênese (COULTER et al., 2008). No presente estudo, a farinha de yacon não foi capaz de aumentar a liberação de

NO, porém a presença do CC foi capaz de reduzir sua liberação, tanto na presença do estímulo imunológico quanto na condição basal.

Na literatura não foi encontrado estudo onde tenha sido dosado óxido nítrico de neutrófilos em animais com CC e tratados com yacon, dificultando a comparação dos resultados. Porém, outros estudos, utilizando modelos experimentais diferentes são encontrados. Delgado e colaboradores (2012) avaliaram a produção de NO em macrófagos intraperitoneais de camundongos tipo BALB/c, mantidos em condições específicas livres de agentes patogênicos. Os animais receberam dieta AIN-93 e foram suplementados com 5% de FOS comercial ou 3% ou 5% FOS derivado do yacon durante 30 dias. Ao fim do experimento não foi encontrada diferença significativa nos níveis de NO entre o grupo controle e os grupos que consumiram FOS, independente da fonte.

Umesalma e Sudhandiran (2010) trataram ratos Wistar com câncer de cólon, induzido pela DMH, com ácido elágico na dose de 60 mg/kg de peso corporal. Os autores encontraram que os animais que receberam DMH apresentaram alterações em marcadores tumorais do câncer, dentre eles, aumento de óxido nítrico, por aumentar expressão de iNOS. Ainda, Cani e colaboradores (2009) trataram camundongos (linhagem *ob/ob*) com 10% da dieta composta por oligofrutose durante 5 semanas. Ao fim do experimento, observaram redução de marcadores de inflamação, dentre eles o óxido nítrico.

Na capacidade antioxidante total do plasma, foi observado que a FY influenciou significativamente esse parâmetro. Isso era esperado, uma vez que é reportado na literatura científica grande quantidade de compostos antioxidantes na raiz do yacon, cerca de 3,8% da massa em base seca, encontrando-se principalmente os ácidos fenólicos como o ferúlico, clorogênico e caféico (MARANGONI, 2007). Há relatos do efeito antioxidante do yacon, porém todos realizados *in vitro* ou por meio de outra técnica analítica, como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), mas em nenhum deles analisou-se diretamente os antioxidantes totais presentes no sangue (CAMPOS et al., 2012; TAKENAKA, 2003; YAN et al., 1999, SOUZA, 2015).

Organismos vivos desenvolveram sistemas antioxidantes complexos para neutralizar ERO e reduzir os seus danos. Estes sistemas antioxidantes incluem enzimas tais como superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase e uma

variedade de moléculas pequenas, incluindo ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutathione reduzida, ácido úrico e bilirrubina. A soma de antioxidantes endógenos e derivados de alimentos representa a atividade antioxidante total do sistema. A cooperação entre os diferentes antioxidantes oferece maior proteção contra o ataque de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO e ERN), do que qualquer composto isoladamente. Assim, a capacidade antioxidante total pode fornecer informação biológica mais relevante em comparação com a obtida através da medição de componentes individuais, como se considera o efeito cumulativo de todas as antioxidantes presentes em fluidos corporais e de plasma (KAMPA et al, 2002).

Habib e colaboradores (2015) analisaram a atividade antioxidante e os efeitos benéficos de raízes yacon, utilizando ratos diabéticos. Para isso, a peroxidação lipídica e outros indicadores de estresse oxidativo foram determinados no fígado e nos rins de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados ou não com farinha yacon (340mg FOS/kg/dia) durante 90 dias. A suplementação com yacon nos ratos diabéticos produziu uma diminuição significativa nos níveis de malondialdeído no fígado e rins tanto dos ratos diabéticos quanto dos não diabéticos. Superóxido dismutase hepática e atividade de catalase foram significativamente menores nos ratos diabéticos tratados com a farinha de yacon em comparação com os controles diabéticos. Além disso, houve aumento dos níveis de glutathione peroxidase e glutathione no fígado e rim.

Outro estudo que obteve resultados imunológicos positivos após o oferecimento de farinha de yacon, foi o de Vaz Tostes e colaboradores (2014). Nesse, crianças pré-escolares (idade entre 2 e 5 anos) receberam por 5 dias semanais, durante 18 semanas, preparações contendo farinha de yacon, na dose de 0,14g/FOS/kg/dia. Ao fim do estudo, a ingestão da farinha de yacon aumentou os níveis séricos de IL-4, citocina com características anti-inflamatórias, e sIgA fecal, uma imunoglobulina relacionada à proteção de barreira intestinal.

A microbiota intestinal se comunica extensivamente com o sistema imune do intestino, levando a reações imunológicas e metabólicas. Quando ocorre um desequilíbrio entre esses fatores pode ocorrer um aumento da permeabilidade intestinal que, por sua vez, pode causar translocação bacteriana, inflamação e outras complicações decorrentes. Além disso, os linfócitos infiltrantes da mucosa

intestinal passam a produzir citocinas pró-inflamatórias, as quais desempenham um papel chave na angiogênese, inibição da apoptose, estímulo a proliferação celular (LU; WALKER, 2001; CHALKIAS et al., 2011).

No presente estudo encontrou-se que a farinha de yacon foi capaz de diminuir a excreção urinária de lactulose e manitol, mesmo no grupo que apresentava também o câncer (grupo CY), demonstrando sua capacidade de diminuir a permeabilidade intestinal. O teste utilizado, de lactulose/manitol é considerado o teste mais eficaz para avaliar a presença deste fenômeno. Os testes com açúcares, principalmente utilizando a combinação da lactulose com o manitol, tem sido um dos mais aplicados (VILELA, 2005).

Muitos mecanismos etiopatogênicos comuns a várias doenças de caráter inflamatório do TGI, bem como de doenças extra-intestinais de caráter auto-imune, como o diabetes mellitus e a dermatite atópica, vem sendo associados à integridade da barreira mucosa. Além disso, acredita-se que o excesso de antígenos e bactérias que atingem o organismo através da luz intestinal está associado também a integridade do sistema imunológico. Assim a barreira intestinal contribui para prevenção de desnutrição, alergias e infecções no hospedeiro (BISCHOFF, 2011).

Portanto, o teste de permeabilidade intestinal é um exame útil no monitoramento da resposta terapêutica e na avaliação dos processos etiopatogênicos associados a várias afecções intestinais. Assim, a melhoria da função de barreira exercida pela mucosa implica na redução da permeação de antígenos e, conseqüentemente, na diminuição da reação inflamatória. Desse modo, se um determinado nutriente/alimento é capaz de melhorar a permeabilidade intestinal, pode também proporcionar benefícios clínicos no tratamento de doenças intestinais, como o câncer de cólon (VILELA, 2005).

A farinha de yacon pode ter esse feito benéfico sobre a permeabilidade intestinal, uma vez que a fermentação do FOS pelas bifidobactérias estimula a produção de muco, de peptídeos antimicrobianos, como defensinas e catelicidinas, além de promover a produção de AGCC e bacteriocinas ou microcinas, e estimularem a proliferação de bifidobactérias, que contribuem para a função de barreira intestinal, competindo com patógenos por sítios de ligação nas células epiteliais e na camada mucosa subjacente. Também, o FOS pode aumentar a produção e liberação de sIgA, além de diminuir alterações nas *tight junctions*, de

modo que as junções entre os colonócitos e enterócitos ficam mais estreitas, dificultando a passagem de microrganismos e/ou suas toxinas (COLLINS; BERCIK, 2009; BARTON; KAGAN, 2009; RESTA-LENERT; BARRETT, 2006; MUMMY et al., 2008).

Christensen e colaboradores (2014) realizaram um estudo com ratos Wistar que receberam, por gavagem, 2 mL do prebiótico XOS (xilooligossacrídeos) ou 1 mL do probiótico *B. pseudolongum*, durante 16 dias. Ao fim do estudo, os autores não encontraram diferença significativa para a permeabilidade intestinal entre os grupos experimentais. Já Também Venkatraman e colaboradores (2000) encontraram melhoria na permeabilidade intestinal de ratos com colite intestinal induzida e tratada com butirato de metilo. Por sua vez, Rafter e colaboradores (2007) encontraram que uma intervenção simbiótica resultou em aumento do número de bactérias benéficas e redução das maléficas, além de melhorar a função de barreira epitelial e diminuição da exposição a endotoxinas em pacientes polipectomizados.

No entanto, não foi encontrado trabalho que utilizou a farinha de yacon para avaliar a permeabilidade intestinal. Outra dificuldade encontrada é o fato de existirem muitas metodologias para avaliar a permeabilidade intestinal, o que dificulta a interpretação dos dados encontrados no estudo. Vilela (2005), afirma que os trabalhos publicados sobre permeabilidade intestinal apresentam pouca uniformidade metodológica, tornando as comparações entre os estudos muito difíceis. Esta afirmação implica que, até que a uniformização ocorra, é importante que o pesquisador estabeleça seu próprio controle e o explicita adequadamente em seus métodos e resultados, conforme foi realizado no presente estudo.

Apesar da farinha de yacon ter se apresentado benéfica na redução da permeabilidade intestinal, ela não se mostrou significativa na redução dos níveis plasmáticos de LPS (lipopolissacarídeo), que mensuram a endotoxemia, apesar de manter os níveis de LPS do grupo CY semelhantes aos grupos sem câncer. Já o câncer teve ação significativa sobre esse parâmetro neste estudo, aumentando os valores no grupo com CC. LPS é componente da parede celular de bactérias gram-negativas e interage com receptores presentes na membrana celular de neutrófilos e macrófagos (CD14 e receptor Toll like-4/MD-2), que ativam diversas vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição como o NF- κ B, culminando em

intensa produção e liberação de citocinas (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004).

O fator de transcrição NF- κ B modula a expressão de diversas proteínas envolvidas no processo inflamatório. Sob condições normais, a presença de LPS no lúmen intestinal não causa efeitos negativos. Alguns fatores podem favorecer a transferência de LPS para o sistema circulatório, processo chamado endotoxemia. Dentre esses fatores encontra-se a disbiose, consumo de gorduras e obesidade (LAUGERETTE et al., 2011; DELZENNE; CANI, 2011).

O LPS é responsável pela indução da maior parte das alterações fisiopatológicas intestinais observadas durante infecções micobacterianas e infecções por gram-negativos entre outras. Entre as alterações inespecíficas induzidas pelo LPS estão a pirogenicidade, o aumento do número de leucócitos, a ativação do sistema complemento e de macrófagos. O LPS induz ainda a resposta imune mediada por citocinas, por ser potente estimulador da produção do TNF- α , citocina iniciadora da cascata de produção das demais citocinas inflamatórias (DELZENNE; CANI, 2011).

A administração de prebióticos resulta em aumento das bactérias intestinais gram-positivas, incluindo bifidobactérias, e diminuição no LPS plasmático, por meio da avaliação de marcadores inflamatórios. Deste modo, a composição da microbiota interfere diretamente no estado de inflamação intestinal que por sua vez está relacionado ao desenvolvimento de CC. Por conseguinte, a modulação da microbiota intestinal, utilizando probióticos ou prebióticos, pode influenciar no desenvolvimento de tumores (CANI et al., 2006; CANI et al., 2007; CANI et al., 2008).

Nesse estudo foram encontrados altos níveis de LPS plasmáticos e baixos de liberação de óxido nítrico pelos neutrófilos nos animais do grupo C. O LPS é um estimulador da liberação de NO por células de defesa, incluindo neutrófilos. Portanto, se os níveis de NO ficaram baixos, mesmo na presença de altos níveis de LPS, é bem provável que esses animais, portadores da neoplasia, estavam imunossuprimidos, ou seja, a atividade imunológica deliberadamente reduzida ou ineficiente (REZENDE, 2011). As células tumorais geram um microambiente imunossupressor, através da liberação de vários fatores, tais como VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), IL-6, IL-10 e TGF- β , capazes de afetar a

diferenciação e maturação das células dendríticas, uma das responsáveis pela defesa contra células neoplásicas (MICHELSEN et al., 2011).

Porém, verificou-se que os animais que consumiram FY apresentaram maior liberação de óxido nítrico, menores valores de LPS, além de níveis de LPS reduzidos no grupo que dela consumiram e tinham CC (grupo CY). Isso pode estar relacionado ao efeito imunomodulador do FOS presente na FY. É descrito que o ácido lático produzido pelas bifidobactérias, a partir da fermentação do FOS é capaz de estimular várias funções imunes inatas e adquiridas possivelmente através da modulação da expressão de citocinas (BUDDINGTON et al., 2002).

Segundo Pimentel-Nunes (2011), a medição de LPS sérico é muito dependente do método de colheita e varia de acordo com a hora do dia e jejum, entre outros fatores, e por essa razão a análise de outros fatores séricos para confirmar um aumento da endotoxemia, seriam necessários. Um aumento da endotoxemia acompanha-se de um aumento da produção de LBP (*LPS - Binding protein*) e de sCD14, dois co-fatores essenciais para o reconhecimento imunológico do LPS. Desse modo, a cascata de aumento de permeabilidade intestinal-endotoxemia-inflamação é modulada por diversos outros fatores, como os imunológicos, que são cruciais para o resultado final de LPS.

Cani e colaboradores (2009) trataram camundongos da linhagem *ob/ob* com oligofruose na dose de 10% da dieta, durante 5 semanas. Os autores encontraram que naqueles animais tratados com o prebiótico, os níveis plasmáticos de LPS, citocinas inflamatórias, expressão hepática de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo, bem como a permeabilidade intestinal, diminuíram significativamente.

Outro estudo realizado por Cani e colaboradores (2007b) testou se a restauração da quantidade cecal de *Bifidobacterium spp.* pode modular a endotoxemia metabólica, o perfil inflamatório e o desenvolvimento de diabetes em camundongos linhagem *ob/ob*. Os autores encontraram, após 14 semanas de experimento, que o grupo que consumiu a fibra fermentável restaurou as bifidobactérias intestinais. Além disso, o grupo HF (consumiu altos níveis de gordura) teve aumento significativo da endotoxemia, mas que nos grupos que receberam adicionalmente a fibra fermentável, esses níveis foram normalizados.

Diante disso, os importantes achados desse estudo, reforçados pelos encontrados em outros trabalhos da literatura científica, permitem afirmar que o

consumo regular de farinha de yacon pode contribuir substancialmente para tratamento do câncer de cólon, dado os importantes benefícios por ela produzidos, não só intestinais, mas também a nível sistêmico, como observado nesse trabalho.

7 Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que o consumo de farinha de yacon possa atuar benéficamente sobre a saúde intestinal e imunológica de animais com câncer de cólon induzido. A suplementação de 7,5% de FOS, provenientes da farinha de yacon, promoveu melhoria da permeabilidade, reduziu o pH intraluminal e a porcentagem de redução de FCA, além de aumentar a profundidade das criptas colônicas e o número de criptas colônicas, a CAT e o metabolismo oxidativo, via produção de ânion superóxido.

Porém não foi observada efetividade da farinha de yacon sobre o número de FCAs, na endotoxemia e na liberação de óxido nítrico.

Novos estudos devem ser realizados a fim de melhor elucidar a atuação da farinha de yacon em outros parâmetros imunológicos, como citocinas e imunoglobulinas, além de avaliar seu efeito na composição da microbiota intestinal em modelo experimental de câncer colorretal e os mecanismos pelo quais ocorrem.

8 Considerações Finais

O presente estudo reveste-se de importância, uma vez que muitos benefícios do consumo de farinha de yacon na neoplasia de cólon foram evidenciados, sendo grande parte deles descritos pela primeira vez na literatura científica, destacando o caráter inovador e pioneiro do trabalho que pode conduzir a trabalhos futuros mais completos e esclarecedores.

Além disso, muitos pontos positivos podem ser destacados, dentre eles, os resultados encontrados, os quais demonstraram efeitos benéficos (maioria) ou efeitos nulos do consumo da farinha de yacon, porém nenhum deles demonstrou efeito negativo da farinha sobre o câncer de cólon. Outro ponto positivo, foi a adaptação e padronização com êxito de muitas metodologias, não antes descritas para o modelo experimental aqui utilizado, como na avaliação da permeabilidade intestinal, no metabolismo oxidativo, na análise histológica, bem como no pH intraluminal.

Quanto às limitações, a dose de FOS e o tempo de intervenção utilizados, bem como o número de animais podem não ter sido suficientemente grandes para alcançar resultados mais contundentes para comprovar a eficácia da farinha de yacon na redução das lesões pré-neoplásicas, como os FCAs. Outra limitação foi a suplementação da dieta com a farinha de yacon após a indução do CC. Possivelmente, a maior eficácia poderia ter sido obtida com a suplementação anterior à indução do CC, a fim de avaliar o papel da farinha de yacon na redução do risco de desenvolvimento da neoplasia.

Novas análises deverão ser desenvolvidas, como a dosagem de AGCC nas fezes, citocinas pró e anti-inflamatórias, sIgA e microbiota intestinal, afim de elucidar muitas questões e complementar os resultados já encontrados, integrando o estudo.

9 Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K. LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Brasil: Elsevier, 2008.

ALAKOMI, H. L. et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001-2005, 2000.

AL-LAHHAM, S. H. et al. Regulation of adipokine production in human adipose tissue by propionic acid. **European journal of clinical investigation**, v. 40, n. 5, p. 401-407, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12 ed. Washington: AOAC, 1997.

AZEVEDO, R. P. et al. Constipação intestinal em terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 3, p. 324-331, 2009.

BAILÓN, E. et al. Butyrate *in vitro* immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 863-873, 2010.

BALZAN, S. et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **J. Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 464-471, 2007.

BARTON, G.M.; KAGAN, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nature Reviews Immunology**; v. 9, p. 535-542, 2009.

BAUMGART, D.C.; CARDING, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **The Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-1640, 2007.

BEYER, P.L. Digestão, absorção, transporte e excreção de nutrientes. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause – Alimentos , Nutrição e Dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends Food Science Technology**. Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 170-175, 2004.

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

BIRD, R. P.; GOOD, Carolyn K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology letters**, v. 112, p. 395-402, 2000.

BISCHOFF, S. C. 'Gut health': a new objective in medicine?. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 24, 2011.

BRYK, G. et al. Effect of a mixture of GOS/FOS® on calcium absorption and retention during recovery from protein malnutrition: experimental model in growing rats. **European journal of nutrition**, p. 1-14, 2015.

BUDDINGTON, K. K. Dietary Oligofructose and Inulin Protect Mice from Enteric and Systemic Pathogens and Tumor Inducers. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 472-477, 2002.

BÚRIGO, T. et al. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 491-497, 2007.

CABELLO, C. Extração e pré-tratamento químico de frutanos de yacon, *Polymnia sonchifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.202-207, 2005.

CAMPOS, D. et al. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius Poepp. & Endl*), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1592-1599, 2012.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091-1103, 2009.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, 2008.

CANI, P. D. et al. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 01, p. 32-37, 2007a.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007b.

CANI, P. D. et al. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 567-572, 2006.

CANI, P.D. et al. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1484-1490, 2006.

CARRARO, S. et al. Influencia de la ingesta de butirato de sodio en la carcinogénesis colónica murina. **Medicina (B. Aires)**, v. 53, n. 2, p. 133-6, 1993.

CHALKIAS, A. et al. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. **American journal of clinical oncology**, v. 34, n. 6, p. 561-566, 2011.

CHAPKIN, R. S.; FAN, Y; LUPTON, J.R. Effect of diet on colonic-programmed cell death: molecular mechanism of action. **Toxicology letters**, v. 112, p. 411-414, 2000.

CHEN, Z. et al. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) α and β messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 188, n. 1, p. 127-140, 2002.

CHRISTENSEN, E. G. et al. Dietary Xylo-oligosaccharide stimulates intestinal bifidobacteria and lactobacilli but has limited effect on intestinal integrity in rats. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 660, 2014.

CILLA, A. et al. Prebióticos y nucleótidos en alimentación infantil: revisión de la evidencia. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 4, p. 1037-1048, 2012.

CLARK, J. A.; COOPERSMITH, C. M. Intestinal crosstalk—a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 28, n. 4, p. 384, 2007.

CLARK, M. J.; ROBIEN, K.; SLAVIN, J.L. Effect of prebiotics on biomarkers of colorectal cancer in humans: a systematic review. **Nutrition Reviews**. v. 70, n. 8, p.436–443, 2012.

COLLINS, S. M.; BERCIK, P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 2003–14, 2009.

COULTER, J. A. et al. Nitric oxide: a novel therapeutic for cancer. **Nitric oxide**, v. 19, n. 2, p. 192-198, 2008.

DAVIDSON, P. CARVALHO, G. Ecologia e disbiose intestinal. In: PASCHOAL V.; NAVES, A.; FONSECA, A.B.B.L. **Nutrição Clínica Funcional: dos princípios a prática clínica**. São Paulo: Valeria Paschoal, 2007.

DAVIS, C.D.; MILNER, J.A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 743–752, 2009.

DELGADO, G. T. C. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 884-892, 2012.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: relevance in nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 15-31, 2011.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, p. 93-98, 2010.

EL-AWADY, S. I. et al. Bacterial translocation in an experimental intestinal obstruction model: C-reactive protein reliability?. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 98-106, 2009.

EYNARD, A. R.; VALENTICH, M. A.; ROVASIO, R. A. **Histologia e Embriologia Humanas-: Bases Celulares e Moleculares**. Artmed Editora, 2011.

FEMIA, A. P. et al. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 11, p. 1953-1960, 2002.

FEMIA, A. P.; DOLARA, P.; CADERNI, G.. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 277-281, 2004.

FERLAY J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 10 dez 2015.

FIOCCHI, C. Microbial factors in the pathogenesis of IBD. **Bioscience and microflora**, v. 22, n. 1, p. 5-14, 2003

FORTES, R. C. et al. Hábitos dietéticos de pacientes com câncer colorretal em fase pós-operatória. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 277-89, 2007.

GANAPATHY, V. et al. Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 869-874, 2013.

GASCHOTT, T. et al. 1, 25-Dihydroxycholecalciferol enhances butyrate-induced p21 Waf1/Cip1 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 283, n. 1, p. 80-85, 2001.

GENTA, S. B. et al. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 11, p. 1657-1665, 2005.

GENTA, S. et al. Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182-187, 2009.

GRAEFE et al. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, Lima, v.86, p.157-165, 2004.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anaitical Biochemistry**. v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

GRIFFITHS, A.J.F et al. **Introdução a genética**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 9 ed. 2008.

GRIVENNIKOV S.I. et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. **Nature**. V. 491: p. 254-8, 2012.

GUIGOZ, Y. et al. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1, p. 13–25, 2002.

GUPTA V., GARG R. Probiotics. **Indian journal of medical microbiology**.v.27, n.3, p.202, 2009.

GUPTA, A. K.; SCHOEN, R. E. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, n. 1, p. 59-65, 2009.

GUSSO, A. P., MATTANAI, P., RICHARDSII, N. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, 2015.

HABIB, N. C. et al. Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats. **Pharmaceutical biology**, p. 1-11, 2015.

HALL, J. E. **Guyton e Hall Fundamentos de Fisiologia**. 12^aed. Elsevier: Brasil, 2012.

HENRIQUES, V. T. et al. Ácidos graxos ômega-3 reduzem o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 237-244, 2009

HESS, J. R. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides on satiety responses in healthy men and women. **Appetite**, v. 56, p. 128–134, 2011.

HILL, M. Dietary fibre and colon cancer: where do we go from here? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 01, p. 63-65, 2003.

HINNEBUSCH, B. F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 5, p. 1012-1017, 2002.

HOFMANOVÁ, J. et al. Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

HSU, C. et al. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1523-1528, 2004.

HUGHES R, ROWLAND I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. **Carcinogenesis**., v. 22, n. 1, p. 43-7, 2001.

IACOMINO, G. et al. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 1280-1289, 2001.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2016. Disponível em: http://www.oncoguia.org.br/pub/material_apoio/material_apoio_299f_151205_2713.pdf. Acesso em: 10 dez. 2015.

ISHIKAWA, H. et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 5, p. 762-767, 2005.

JOHNSON, I. T. Review: Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 40, p. 1171-1178, 2002.

JOHNSTON, R. B. JR.; LEHMEYER, J. E. Elaboration of toxic oxygen by products by neutrophils on a model of immune complex disease. **Journal of Clinical Investigation**. v. 57, p. 836:841, 1976.

KAMPA, M. et al. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. **BMC Clinical Pathology**, v. 2, n. 1, p. 3, 2002.

KILNER, J. et al. A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 4, p. 1146-1156, 2012.

LACHMAN, J. et al. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius*. H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant Soil and Environment**, v. 50, n. 9, p. 383-390, 2004.

LARANGEIRAS, L. L. S. et al. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 3, 1998.

LAUGERETTE, F. C. et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 53–59, 2011.

LI, Q. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. **Clinical and Immunology**., v.126, p.67-80, 2008.

LOBO, A. R. et al. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 04, p. 776-785, 2007.

LOBO, A. R. et al. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. **British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1286-1295, 2014.

LOBO, A.R. et al. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with eructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* flour). **Food Chemistry**, v. 126, p. 885-891, 2011.

LOSADA, M. A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. **Nutrition research**, v. 22, n. 1, p. 71-84, 2002.

LU, L.; WALKER, W. A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1124S-1130S, 2001.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. The role of complement in the stimulation of lysosomal enzyme release by polymorphonuclear leucocytes induced by immune complexes of IgG and of IgM. **Immunology**, v. 65, n. 2, p. 171-5, 1988.

LUPETTI, K. O. et al. Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais. **Química Nova**, v.28, n.3, p.548-554, 2005.

MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2008.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MAHAN, L. K.; KRAUSE, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**, 13ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, 2011.

MARANGONI, A.L. **Potencialidade de aplicação de farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais**. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2007.

MARQUES, C.G.; WAITZBERG, D.L. Fibras alimentares e cancer. In: WAITZBERG, D.L. ed. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

MARTINS, J. F. L. et al. **Efeito de um produto a base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) no controle da massa corpórea, no perfil de lipídeos e na toxicidade crônica em ratas Wistar ovariectomizadas**. (2014). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2014.

MASSEY, V. The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. **Biochimica and Biophysica Acta**. v. 34, p. 255-256, 1959.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002

MICHIELSEN, A. J. et al. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27944, 2011.

MORROW, L. E.; GOGINENI, Vijaya; MALESKER, Mark A. Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. **Current opinion in critical care**, v. 18, n. 2, p. 186-191, 2012.

MOSCATTO, J. A. et al. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 634-640, 2004.

MOURA, C.P. **Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Polymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico**. 2004. 115f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MOURA, N. A. et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2902-2910, 2012.

MUMMY, K.L.; CHEN, X.; KELLY, C.P.; McCORMICK, B.A. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by postinvasion signaling events. **American Journal of Physiology**, v. 294, p. G599–G609, 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

National Cancer Institute: PDQ® Câncer de colon. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Última atualização: <31/07/2015>. Disponível em: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>. Acesso em: 05 jan. 2016.

NKONDJOCK, A. et al. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. **Cancer detection and prevention**, v. 27, n. 1, p. 55-66, 2003.

OGATA, D. C. et al. Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da β -catenina e Ki-67. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 2, p. 114-120, 2010.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p.153-62, 2004.

PAULA, H.A.A., Martins, J.F.L.; Sartori, S.S.R., Castro, A.S.B., Abranches, M.V., Rafael, V.C., Ferreira, C.L.L.F. (2012). **The yacon product PBY: which is the best dose to evaluate the functionality of this new source of prebiotic fructans?** In: Functional Foods Forum Probiotics, Turku, 2012.

PELUZIO, M. C. G. et al. Oral administration of sodium butyrate reduces chemically-induced preneoplastic lesions in experimental carcinogenesis. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 5, p. 717-725, 2009.

PEREIRA, P. L.; NUNES, A. L. S.; DUARTE, S. F. P. Qualidade de Vida e Consumo Alimentar de Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61, n. 3, p. 243-251, 2015.

PIMENTEL-NUNES, P. Permeabilidade Intestinal, Endotoxemia e Inflamação na Cirrose: Que Relação?. **Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 18, n. 2, p. 64-65, 2011.

POOL-ZOBEL, B. L.; SAUER, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. **Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 11, p. 2580–2584, Nov. 2007.

POOL-ZOBEL, B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Bristh Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p. S73–S90, 2005.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PRETER, V. de et al. Baseline microbiota activity and initial bifidobactérias counts influence responses to prebiotic dosing in healthy subjects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 504–513, 2008.

QUINTEROS, E. T. T. **Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon**. Campinas, 2000. 164p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

RAFTER, J. et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 2, p. 488-496, 2007.

RAJENDRAN, P. et al. Histone deacetylase turnover and recovery in sulforaphane-treated colon cancer cells: competing actions of 14-3-3 and Pin1 in HDAC3/SMRT corepressor complex dissociation/reassembly. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 68, 2011.

RAMOS, M. G. et al. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 2, p. 161-173, 2002.

RAPIN, J.R.; WIERNSPERGER, N. Possible links between intestinal permeability and food processing: a potential therapeutic niche for glutamine. **Clinics**, v.65, n. 6, p. 635-43, 2010.

RASCHKA, L.; DANIEL, H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans

on calcium absorption in the large intestine of rats. **Bone**, v. 37, p. 728-735, 2005.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Probiotics and commensals reverse TNF-alfa and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 130, p. 731–746, 2006.

RODRIGUES, F. C. et al. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): produção e caracterização química. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 70, n. 3, p. 290-295, 2011.

RODRIGUES, F. C. et al. Yacon flour and *Bifidobacterium longum* modulate bone health in rats. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 7, p. 664-670, 2012.

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

RODRÍGUEZ-CABEZAS, et al. The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. **Clinical Nutrition**. v.29, n.6, p.832-839, 2010.

ROSSI, R. et al. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: a review. **Animal feed science and technology**, v. 162, n. 1, p. 1-11, 2010.

SÁ, L. R. V. et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 36, n. 23, p. 15177-15186, 2011.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANSONETTI, P. J. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 1, p. 8-14, 2011.

SANTANA I., CARDOSO M.H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898-905, 2008.

SANTOS, T.P.; et al. Conhecimento dos usuários do serviço público de saúde sobre câncer colorretal e sua prevenção. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 1, p. 31-38, 2013.

SCHOLZ-AHRENS, K. E; SCHREZENMEIR, J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism—experimental data and mechanism. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S179-S186, 2002.

SHEPPARD, F. R. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 5, p. 1025-1042, 2005.

SILVA, E. B.; CANDIDO, L.M.B. **Processamento de bebida funcional à base de yacon (Polymnia sonchifolia Poepping & Endlicher)**. 2004. 96f. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SONG, P. et al. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6227-6232, 2011.

SOUZA, M. L. PROBIÓTICOS E A PERMEABILIDADE INTESTINAL. 2015. Disponível em: <<http://blog.newtonpaiva.br/pos/wp-content/uploads/2013/04/PDF-E6-NUT40.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

SOVICH, J. L.; SARTOR, Z., MISRA, S. Developments in Screening Tests and Strategies for Colorectal Cancer. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

STEVENS, R. G. et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. **Cancer letters**, v. 248, n. 2, p. 262-268, 2007.

SULIBURK, J. et al. The gut in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **European Surgical Research**, v. 40, n. 2, p. 184-189, 2008.

TAKENAKA, M. et al. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 793-796, 2003.

TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 20, p. 2826, 2007.

TOLOUDI, M. et al. A possible clinical benefit of the identification and characterization of colon cancer stem cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 22-27, 2015.

TSUKAMOTO, T. et al. Hexosaminidase-altered Aberrant Crypts, Carrying Decreased Hexosaminidase α and β Subunit mRNAs, in Colon of 1, 2-Dimethylhydrazine-treated Rats. **Japanese journal of cancer research**, v. 92, n. 2, p. 109-118, 2001.

TURNER, N. D. et al. Oncogenic ras alters sensitivity of mouse colonocytes to butyrate and fatty acid mediated growth arrest and apoptosis. **Cancer letters**, v. 186, n. 1, p. 29-35, 2002.

TURRONI, F. et al. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 2, p. 183-203, 2014.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 2, p. 650-655, 2010.

VALENTOVÁ, K. et al. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, v. 147, n. 2, p. 119-130, 2003.

VASCONCELOS CM. **Caracterização físico-química e sensorial de iogurte “light” com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2010. (dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa; 2010.

VAZ-TOSTES, M. G. et al. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 666-672, 2014.

VENKATRAMAN, A. et al. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 35, n. 10, p. 1053-1059, 2000.

VILELA, E. G. **A influência do *Saccharomyces boulardii* na permeabilidade intestinal de pacientes com doença de Crohn em fase de remissão**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Medicina), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

VINOLO, M. A. R. **Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos**. 2010. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

WEAVER, Connie M. et al. Novel fibers increase bone calcium content and strength beyond efficiency of large intestine fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8952-8957, 2010.

WESTERBEEK, E.A.M. et al. The effect of enteral supplementation of a prebiotic mixture of non-human milk galacto-, fructo- and acidic oligosaccharides on intestinal permeability in preterm infants. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 02, p. 268-274, 2011.

WIEST, R.; RATCH, H.C. Bacterial translocation in the gut. **Best. Pract. Research Clinical Gastroenterology**. v.17, p.397-425, 2003.

WOLEVER, T. M et al. Do colonic short-chain fatty acids contribute to the long-term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high-fiber diet. **The American journal of clinical nutrition**, v. 75, n. 6, p. 1023-1030, 2002

YAN, X. et al. Extraction and Identification of Antioxidants in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4711-4713, 1999.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; NARUSZEWICZ, M. Propionate reduces the cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B (NF-

kappaB) activation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 123-131, 2009.

ZHU, H., LI, Y. R.. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 5, p. 474-480, 2012.

ZILIOOTTO, L. **Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato**. 2008. Tese. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

Anexo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 004/2014, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Impacto da utilização de frutooligossacarídeos derivados do Yacon na barreira intestinal, resposta e estresse oxidativo induzido pelo câncer de cólon, em modelo experimental."** que tem como responsável o (a) docente **Mirelle Lomar Viana**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 09/05/14.

Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 09 de maio de 2014.