



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

Efeitos da ingestão de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o
processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-
dimetilhidrazina em ratos Wistar.

Nelci Antunes de Moura

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Biologia Celular*
Estrutural e Funcional.

Luís Fernando Barbisan

Orientador

BOTUCATU – SP

2012



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da ingestão de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o
processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-
dimetilhidrazina em ratos Wistar.

Nelci Antunes de Moura

Prof^o. Dr Luís Fernando Barbisan

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Moura, Nelci Antunes de.

Efeitos da ingestão de Yacon (*Polymnia sonchifolia*) sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1, 2-dimetilhidrazina em ratos Wistar / Nelci Antunes de Moura. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Capes: 4010500

1. Yacon – Uso terapêutico. 2. Carcinogênese. 3. Cólon – Câncer – Prevenção. 4. Rato.

Palavras-chave: Carcinogênese de cólon; Prevenção; Ratos; Yacon (*Polymnia sonchifolia*).

ÍNDICE

Resumo.....	9
Lista de tabelas.....	10
Lista de figuras.....	11
Lista de abreviaturas.....	12

Capítulo I

Revisão da literatura

1. Câncer de cólon: epidemiologia e fatores de risco.....	15
2. Carcinogênese de cólon.....	17
2.1- Carcinogênese experimental de cólon.....	20
3. Yacon e o conceito de frutanos.....	22
3.1. Efeitos fisiológicos dos frutanos e prevenção de câncer de cólon.....	24
4. Referências.....	33
5. Objetivos.....	43

Capítulo II

Article

Abstract.....	47
1. Introduction.....	48
2. Materials and Methods	
2.1. Animal and treatment.....	50
2.2. Determination of inulin-type fructans.....	51
2.3. Colon processing and histopathological analysis.....	51
2.4. Immunohistochemical procedures.....	52
2.5. PCNA, cleaved caspase-3 and β -catenin analysis.....	52
2.6. Statistical analysis.....	53
3. Results	
3.1. General findings.....	53
3.2. Classical ACF analyses.....	54
3.3. Tumor size and histopathology analyses.....	54
3.4. Cell proliferation, apoptosis and β -catenin analyses.....	55
4. Discussion.....	56
5. References.....	60
Legends, figures and tables.....	64
Anexos:.....	72

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família e amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos.

“Sem Deus não há vida, sem família não há base e sem amigos não há mundo colorido.”

(Verena)

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder vida e caminhar junto comigo em todos os momentos.

Aos meus pais Oracy e Ruth pelo amor incondicional e apoio em tudo o que faço sempre!

Aos meus irmãos: Milton e Silas, às minhas irmãs: Maria, Silmara e Mariza pelo companheirismo, amor e amizade.

A todos meus demais familiares e amigos de Itaberá: Joir, Andréia Oto, Diogo, Daiane, Jaque e Dirce.

Ao meu namorado Marcos (Spike) pelo companheirismo, amor e disposição em me ajudar em todos os momentos.

Ao meu orientador professor Dr. Luís Fernando Barbisan, exemplo de dedicação e humildade, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e pela contribuição para minha formação.

Ao aluno de IC, Brunno Felipe Ramos Caetano, pela dedicação, responsabilidade e compromisso na colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Ao prof. Dr. Cláudio Cabello do Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Cerat) da Faculdade de Ciências Agronômicas pela obtenção das raízes de yacon.

Ao técnico de laboratório do Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Cerat) da Faculdade de Ciências Agronômicas Luís Henrique Urbano pela produção do extrato e análises de HPLC.

Ao bioterista do Departamento de Patologia da FMB Paulo Cesar Georgete (PC) pela amizade e cuidados com os animais.

Aos colegas do Laboratório de Carcinogênese Química Experimental: Tony, Marco Aurélio, Mariana, Flávia, Gisele, Joice, Bruna, Marília, Wiliam e Guilherme.

Aos colegas do departamento de morfologia e demais que de alguma forma sempre estão presentes na minha vida Carol, Flávia, Jaqueline, Karina Livia, Joyce Zapaterine, Jagger, Arruia, Dona Benta, Sinara e Miss-Pank, Obrigada pela amizade de vocês!

Aos meus colegas de graduação da Bio XLI: Marielza, Viscosa, Mel, Postinho pelas conversas e trocas de experiências.

Às meninas que moram comigo: Michely e Viviane pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários do departamento de morfologia pela disposição em ajudar a todos os alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

“Não há nada que não se consiga com a força de vontade, a bondade e, principalmente, com o amor.”

(Cícero)

RESUMO

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz originária da região dos Andes que tem se destacado pelos seus compostos bioativos principalmente frutanos como futooligossacarídeos e inulina. O presente projeto teve como objetivo determinar a atividade quimioprotetora da ingestão de Yacon sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes-FCA) induzidas pela dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos. Os animais foram divididos em seis grupos com 5 a 12 animais cada. Os animais dos Grupos 1 a 4 e Grupos 5 e 6 receberam respectivamente, quatro injeções subcutâneas de DMH (40 mg/Kg) e solução de EDTA (veículo da DMH) nas duas semanas iniciais do experimento respectivamente. Os animais receberam ração basal até a sexta semana do experimento e a partir desta os animais dos grupos 2, 3, 4, 5 receberam ração acrescida de extrato de Yacon a 0,5%, 1%, 1% e 1%, respectivamente. Os animais do grupo 4 receberam *Lactobacillus casei* ($2,5 \times 10^{10}$ de UFC por Kg de ração). O sacrifício ocorreu na vigésima semana de experimento para análise de focos de criptas aberrantes (FCA) e tumores. Nossos resultados mostraram uma redução no número, multiplicidade de FCA e no número de adenocarcinomas invasivos nos grupos tratados com 1% yacon (G3) e na combinação simbiótica (G4), ($0,05 < p < 0,001$). A multiplicidade de tumores (invasivos e não invasivos) foi significativamente menor no grupo tratado com a combinação simbiótica ($p < 0,02$). Observou-se também uma redução significativa nas taxas de proliferação celular tanto em criptas colônicas como em tumores nos grupos tratados com 1% yacon (G3) e na combinação simbiótica (G4), $p < 0,001$. Os resultados sugerem que a ingestão de extrato de yacon exerce atividade quimiopreventiva contra carcinogênese de cólon.

Palavras-chave: raízes de yacon, carcinogênese de cólon, quimioprevenção do câncer.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Efeitos anti-carcinogênicos do prebiótico do tipo inulina <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	28
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Dados gerais de peso corpóreo, consumo de ração durante o experimento, pesos relativos dos órgãos e parâmetros bioquímicos.....	66
---	----

Tabela 2 - Efeitos da dieta de yacon no desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA) em diferentes grupos.....	67
---	----

Tabela 3 – Efeitos da dieta de yacon sobre o desenvolvimento FCA displásicos (incidência) e tumores de cólon (incidência e multiplicidade) corados em HE.....	68
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estimativa do número de novos casos de câncer na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2010/ 2011.....	16
Figura 2 – Etapas da carcinogênese.....	17
Figura 3 – Raízes tuberosas de Yacon.....	23
Figura 4 - Estrutura química geral dos frutanos.....	24
Figura 5 – Metabolismo do prebiótico do tipo inulina.....	27
Figura 6 – Composição e efeitos na flora intestinal humana.....	29

CAPÍTULO II

Figura 1 A - Sobrevivência dos animais durante o experimento.....	69
Figura 1 B - Gráfico de volumes tumorais de cólon de animais tratados com DMH.....	69
Figura 2 A - Focos de criptas aberrantes (8 criptas) coradas em azul de metileno.....	70
Figura 2 B - Focos de criptas aberrantes (14 criptas) coradas em azul de metileno.....	70
Figura 2 C - Criptas colônicas não displásicas coradas em HE.....	70
Figura 2 D – Criptas colônicas displásicas coradas em HE.....	70
Figura 2 E - Adenocarcinoma de cólon corado em HE.....	70
Figura 2 F - Marcação imunoistoquímica para β -catenina em adenocarcinoma de cólon.....	70
Figura 3 A - Marcação imunoistoquímica para PCNA em criptas normais.....	71
Figura 3 B – Marcação imunoistoquímica para PCNA em tumor de cólon.....	71
Figura 3 C – Índices de PCNA em criptas normais e em tumores colônicos.....	71
Figura 4 A - Marcação imunoistoquímica para caspase 3-clivada em criptas normais.....	72
Figura 4 B - Marcação imunoistoquímica para caspase 3-clivada em tumores colônicos.....	72
Figura 4 C - Índices de caspase 3-clivada em criptas normais e em tumores colônicos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

DMH – 1,2-Dimetilhidrazina

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

FCA – Focos de criptas aberrantes

CA – Criptas aberrantes

OMS – Organização Mundial de Saúde

INCA – Instituto Nacional do Câncer

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar

HNPCC – Câncer coloretal hereditário não poliposo

APC – Adenomatous polyposis coli

DCC – Deleted in colorectal cancer

BC – β -catenina

TCF - T-cell factor family

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FOS – Frutooligossacarídeos

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

Capítulo I

Revisão da literatura

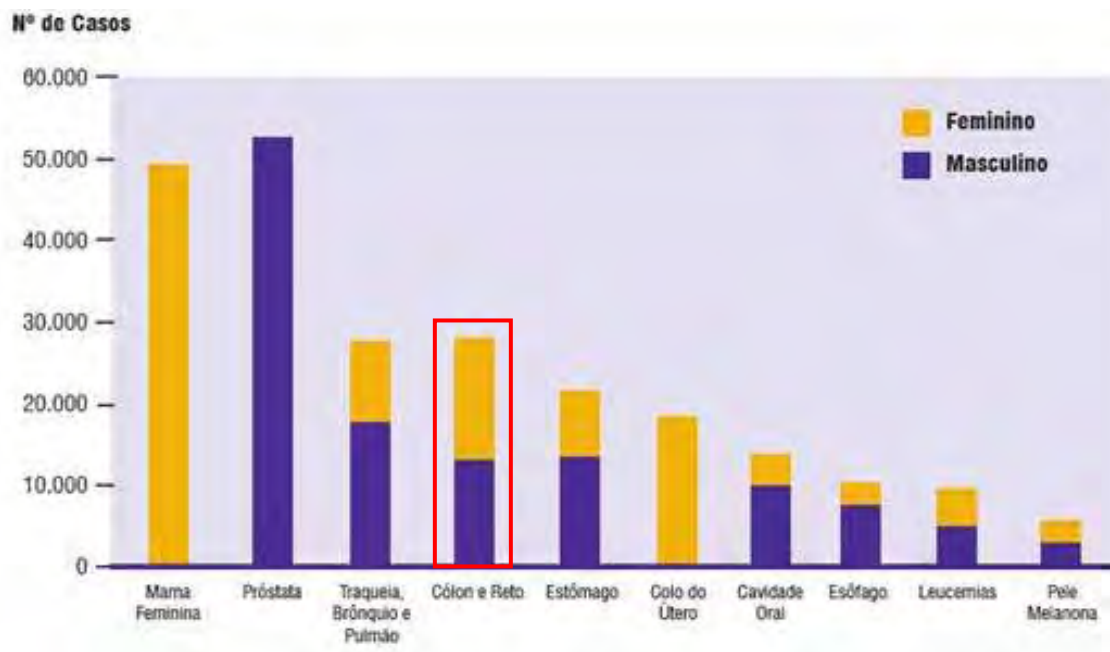
1. Câncer de cólon: epidemiologia e fatores de risco

Desde 2003 as neoplasias malignas ocupam a segunda posição entre as principais causas de morte da população brasileira. Em 2008 a OMS estimou a ocorrência de 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo; destes o mais prevalente foi o câncer de pulmão com 1,52 milhões de casos novos, mama 1,29 milhões e cólon e reto 1,15 milhões. (INCA, 2010, WHO, 2011).

O câncer de cólon é o terceiro tipo mais comum de neoplasia no mundo em homens e o segundo em mulheres com 1,2 milhões de novos casos e 608.700 mortes no ano de 2008, já nos EUA, este ocupa o segundo lugar em incidência (Jemal, 2011). Segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o número de novos casos de câncer de cólon e reto estimado para o ano de 2010/2011 foi de 13.310 casos em homens e 14.800 em mulheres (Figura 1).

Esta neoplasia apresenta prognóstico favorável e a sobrevida média dos pacientes é em torno de 5 anos em 55% dos casos em países desenvolvidos e 40% dos casos em países em desenvolvimento, quando diagnosticada em estágio inicial. Esse prognóstico faz com que o câncer de cólon mesmo estando entre os mais incidentes no mundo tenha um número elevado de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia (INCA 2010).

Podemos dizer que aproximadamente 20% de todos os casos de câncer de cólon são hereditários, podendo ser divididos em tumores de origem na Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e no câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC). Os mais freqüentes são os casos de câncer esporádicos resultante da exposição a carcinógenos ou fatores ambientais de risco (Rossi, 1998, Strachan & Read, 1999).



Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2010

Figura 1 – Estimativa do número de novos casos de câncer na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2010/ 2011.

No Brasil pode-se observar aumento na incidência nas regiões Sul e Sudeste mostrando diferenças geográficas neste tipo de câncer, o que pode ser explicado por diferentes exposições ambientais e estilos de vida (Khan, 2010). O consumo excessivo de álcool e carne vermelha, a prática do tabagismo, e a falta de atividade física estão relacionados ao alto risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (Giovannucci et al 1995, Boffeta , 2006, Buc et al 2006, Khan et al 2010).

Dentre os fatores de risco para o câncer de cólon, o padrão alimentar está diretamente relacionado a esse tipo de neoplasia, ou seja, os vícios e hábitos alimentares inadequados representam uma das grandes causas desse tipo de câncer. O consumo de alimentos gordurosos e carne vermelha ou pobre em fibras, vegetais, frutas e cereais favorecem a proliferação bacteriana e a conseqüente degradação dos ácidos biliares produzindo agentes carcinogênicos. (Van der Meer, 1997, Lieberman, 2003, Stamp, 2002, Khan, 2010).

Portanto, o câncer de cólon é mais incidente em países com estilo de vida ocidental onde predominam as dietas com alta ingestão de gorduras e carnes vermelhas e pobre em fibras, vegetais e frutas (Gibellini, 2008). Estudos apontam que a ocidentalização da dieta entre japoneses está diretamente associada ao aumento da incidência de câncer de cólon no Japão (Kuriki, 2006).

2. Carcinogênese de cólon

A carcinogênese é um processo complexo provavelmente envolvendo uma série de mudanças genéticas e epigenéticas ocorrendo em níveis morfológicos, celulares e moleculares podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção, progressão. (Pitot, 2001, 2007, Vicenti & Gatenby, 2008) (Figura 2).

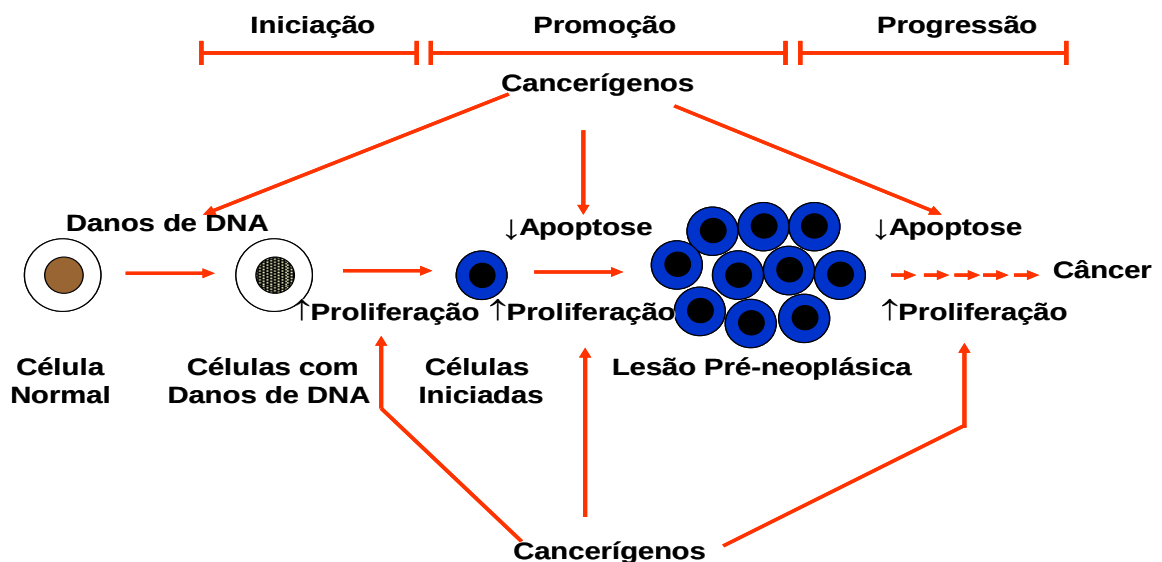


Figura 2 – Etapas da carcinogênese

A iniciação pode ser caracterizada por alterações na sequência de bases do DNA celular provocada pela exposição a um agente cancerígeno químico, físico ou biológico. Esta interação pode levar a mutações em genes controladores do ciclo celular, apoptose e

diferenciação, levando a um desequilíbrio, sendo as células sobreviventes ao estímulo mutagênico denominadas de iniciadas (Pitot, 2001, 2007, Vicenti & Gatenby, 2008).

Na etapa de promoção, as células iniciadas se multiplicam formando lesões pré-neoplásicas (displásicas e anaplásicas) sob estímulos promotores. O agente cancerígeno promotor age de forma a selecionar as células iniciadas e dessa forma ocorre a expansão clonal das mesmas, levando a um acúmulo de mutações e aumentando a instabilidade genética (i.e., alterações epigenéticas e genéticas) (Pitot, 2001, 2007, Vicenti & Gatenby, 2008).

A etapa seguinte é a progressão onde se tem células com alto grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose e auto-suficiência (i.e., independem de estímulos para crescimento e multiplicação) (Pitot, 2001, 2007, Vicenti & Gatenby, 2008). Quando essas células invadem vasos sanguíneos e linfáticos, alcançam tecidos distantes do hospedeiro formando sítios de metástases. Com as metástases, as células malignas se espalham para diversos órgãos do paciente onde competem por espaço e nutrientes com as células normais, comprimem vasos sanguíneos acarretando na falência desses órgãos e levando o paciente a óbito (Pitot, 2001, 2007, Vicenti & Gatenby, 2008).

A transformação neoplásica da mucosa colônica normal em um adenoma e, posteriormente em um adenocarcinoma envolve uma série de alterações genéticas e eventos progressivos que ficou conhecida como sequência adenoma-adenocarcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990). O desequilíbrio fisiológico e cíclico da renovação epitelial (proliferação e morte celular) resultam nas doenças neoplásicas no epitélio intestinal onde o aumento na proliferação celular é considerado o evento celular mais precoce da carcinogênese de cólon (Camplejohn et al, 2003).

Segundo o modelo da sequência adenoma-adenocarcinoma, os genes que são mutados nos estágios iniciais do câncer de cólon são o *APC* e o *Kras* e logo em seguida os supressores de tumorais *DCC* e *p53* (Fearon & Vogelstein, 1990; Takahashi & Wakabayashi, 2004). Acredita-se que a primeira alteração que ocorre é a mutação do gene *APC*, envolvido com a

regulação da β -catenina (BC), organização do citoesqueleto, apoptose, controle do ciclo celular e adesão celular. O gene *APC* é considerado o gene responsável e causador da Polipose Adenomatosa Familiar (Tanaka, 2009).

Observa-se mutação no *APC* em 80% dos adenomas e adenocarcinomas e em 4,3% dos focos de criptas aberrantes (FCAs, lesão pré-neoplásica do cólon). A proteína *apc* é o principal fator de sinalização da via *Wnt*, que regula a ligação e degradação da BC (Takahashi & Wakabayashi, Tanaka, 2009). A BC é uma proteína originalmente encontrada conjugada com a e-caderina relacionada com a adesão célula-célula além de formar um complexo com a proteína produto do gene *APC* o que leva a sua degradação por proteossomas. Quando os genes *APC* e *CTNNB1* são mutados ou a via sinalizadora *Wnt* é ativada a BC acumula-se no citosol, liga-se a proteínas do fator da transcrição *T-cell factor family* (TCF) e se move para o núcleo resultando no aumento da expressão de vários genes como *C-myc* e *cyclin D1*, importantes na carcinogênese. (Takahashi & Wakabayashi 2004, Sanford, 2009, Tanaka, 2009).

Os genes *C-myc* e *cyclin D1* foram relacionados à proliferação celular o que sugere que a via TCF é oncogênica. Mutações no *APC* ou *BC* estão relacionadas com a grande maioria dos tumores de cólon humanos e em roedores e afetam a degradação da BC que se acumula no citoplasma e no núcleo e ativa a via oncogênica BC – TCF (Tetsu & McCormick, 1999).

O segundo gene que se presume que seja mutado é o *KRAS* identificado em uma grande variedade de tumores humanos (Takahashi, 2004). Essa mutação favorece o aumento da proliferação celular, transformação neoplásica e anaplasia (Pozza, 2011). Há indícios ainda de que mutações no gene *KRAS* ocorra na fase inicial da carcinogênese e que esteja relacionada com a progressão dos adenomas e crescimento tumoral (Tanaka, 2009, Strachan & Read, 1999, Pozza, 2011). Na sequência, ocorre a mutação nos genes supressores de tumor *DCC* que codifica uma proteína homóloga a molécula de adesão celular, e o *p53* que é um

fator de transcrição que regula o ciclo celular e a apoptose, estas mutações são vistas em adenomas tardios e adenocarcinomas (Strachan & Read, 1999, Takahashi & Wakabayashi, 2004).

Existem outros genes mutados durante o desenvolvimento do câncer de cólon como os genes *MSH2*, *MSH1* mutados no HNPCC, porém, estes não estão envolvidos diretamente em estágios específicos da carcinogênese de cólon e não estão ligados as vias do modelo da seqüência adenoma-adenocarcinoma (Strachan & Read, 1999).

2.1. Carcinogênese experimental de cólon

O câncer de cólon pode ser induzido em roedores através da aplicação de diversos carcinógenos químicos, como por exemplo, a DMH (1,2-dimetilhidrazina), um carcinógeno de ação indireta, ou seja, que necessita de ações enzimáticas para convertê-lo em espécies eletrofílicas que irão se ligar ao DNA (Newell & Heddle, 2004, Tanaka, 2009).

A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção em estudos de carcinogênese de cólon, possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (Newell & Heddle, 2004, Tanaka, 2009; Femia, 2010). É um dos mais utilizados devido a alta taxa de obtenção de tumores em um período curto de latência, o que pode ser conseguido com uma dose única ou com uma série de doses semanais equivalentes (Kamaleeswari et al, 2006).

Sua ativação metabólica ocorre no fígado via CYP 2E1 e seus metabólitos são transportados pelo sangue ou pela bile para o intestino grosso, o principal alvo de ação desse agente (Tanaka, 2009). Os produtos de metabolismo da DMH induzem a formação de adutos de grupos metil no DNA, mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e induz apoptose no cólon aumentando a proliferação de colonócitos (Newell & Heddle, 2004).

Existem muitas similaridades entre os tumores humanos e os induzidos pela DMH, a cinética da proliferação celular mostra alterações análogas entre o câncer humano e o induzido quimicamente (Tanaka, 2009). Além disso, o modelo de câncer de cólon induzido pela DMH é considerado o mais indicado para se avaliar o potencial de um agente quimiopreventivo (Corpet, 2005).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) são lesões pré-neoplásicas consideradas marcadores do câncer de cólon e muito utilizados em estudos experimentais de quimioprevenção (Corpet & Pierre, 2005, Femia, 2010). Essas lesões são encontradas no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e nos seres humanos acometidos pela polipose ou câncer de cólon (Pretlow, 1991, Alrawi, 2006).

As criptas aberrantes (CA) foram primeiramente descritas por Bird (1987) no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e podem ser identificadas na mucosa do cólon como sendo mais largas, espessas e mais escuras que as demais, podem ser únicas ou na forma de focos (Tudek et al., 1989). Estas são observadas, com maior frequência, no cólon médio e distal tanto em roedores como no homem e são consideradas precursoras da carcinogênese de cólon (Di Gregorio et al., 1997; Rodrigues et al., 2002).

Os FCA apresentam índices de proliferação celular maiores que os da mucosa normal (Polyak et al., 1996; Shpitz et al., 1997). Além disso, foi também observado que os FCA apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Barrow et al., 1990; Pretlow et al., 1990) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (Uchida, 1997; Femia, 2004; Yoshimi, 2004). Acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina em FCA tem sido descrita no cólon de roedores e do ser humano (Shailender, 2010).

3. Yacon e o conceito de frutanos

O Yacon (*Smallanthus sonchifolius*. Poepp. & Endl) é uma espécie da família *Asteraceae* ou *Compositae*, originária da região dos Andes. É comum encontrar na literatura a designação de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) H. Robinson, *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. ou *Polymnia edulis* Wedd referindo-se a mesma espécie (Zardini, 1991).

O nome Yacon deriva da palavra “yaku”, da língua indígena Quéchuá, que significa água sendo conhecida na América do Sul por alguns nomes regionais como arboloco, aricoma, jicama, ilacon entre outros. Essa denominação é utilizada para designar a planta e sua raiz de reserva a qual é utilizada na alimentação humana desde a civilização Inca (Zardini, 1991, Hermann, 1997).

Suas raízes tuberosas são geralmente consumidas *in natura*, apresentando sabor semelhante ao da pêra (Figura 3). No Brasil, o Yacon foi introduzido 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 (Capito, 2001). Nos países de origem, o Yacon é considerado fruta sendo comercializado em feiras; mais recentemente, seu cultivo tem se estendido para vários continentes devido ao destaque que se tem dado aos seus compostos bioativos (Ângulo, 2001, Lachman et al., 2004, Michels, 2005, Santana, 2008).

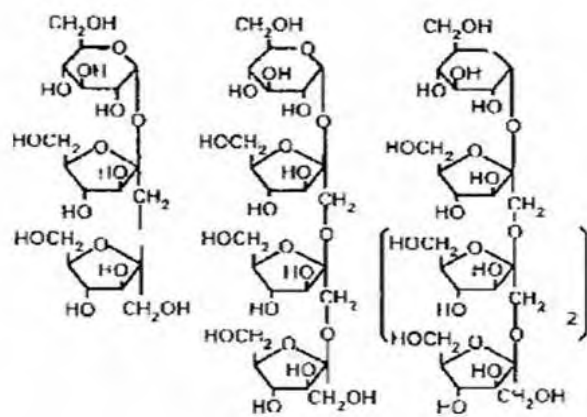


Foto: Lobo, 2004

Figura 3 – Raízes tuberosas de Yacon

As raízes do Yacon são constituídas basicamente por água e carboidratos, os quais são armazenados na forma de inulina e frutooligossacarídeos (FOS), denominados de frutanos, o que o difere dos demais tubérculos e raízes que armazenam carboidratos na forma de amido (Goto, 1995).

Os frutanos são carboidratos de reserva que contém uma ou mais unidades de frutose (até 70) ligadas ou não a uma molécula terminal de sacarose, podem apresentar estrutura linear ou ramificada unidas por ligações frutossil-frutose. (Roberfroid & Delzene, 1998, Oliveira & Nishimoto, 2004); (Figura 4). Os frutanos do tipo inulina se dividem em dois grupos: a inulina, a oligofrutose (produto da hidrólise da inulina) e os frutooligossacarídeos (FOS), sintetizados a partir da sacarose. Eles se diferenciam pelo seu grau de polimerização (GP). O GP da inulina varia de 2 a 70 unidades monossacarídicas. A oligofrutose e os FOS são frutanos com um GP menor do que 10 (Goto, 1995, Roberfroid & Slavin, 2001).



Fonte: Lobo, 2004

Figura 4 - Estrutura química geral dos frutanos.

Aproximadamente 30 mil espécies de vegetais apresentam frutanos como carboidrato de reserva; são encontrados em espécies de interesse econômico como alcachofras, aspargos, alho, banana, cebola, trigo, tomate entre outras (Roberfroid & Delzene, 1998).

Atualmente já existem estudos relatando benefícios da ingestão Yacon tanto em humanos como em modelos experimentais (Geyer, *et al*, 2008). Estudo subcrônico em animais sugere ausência de toxicidade no consumo de raízes de Yacon e ainda relata efeitos benéficos na atividade metabólica (Genta *et al*, 2005).

3.1. Efeitos fisiológicos dos frutanos e prevenção de câncer de cólon

A partir de 1980 se observou que a incidência de câncer entre os países estava intimamente associada aos fatores ambientais e estilos de vida como fumo, comportamento reprodutivo, exposição a cancerígenos e alimentação. A partir daí se chegou à conclusão de que as neoplasias malignas eram passíveis de prevenção, e que mudanças de hábito alimentar

poderiam reduzir em até 35% a mortalidade por doenças neoplásicas nos Estados Unidos (Doll & Peto, 1980, Khan, 2010).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter as etapas iniciais do processo de desenvolvimento de neoplasias (Watttemberg, 1996; Kelloff , 2000, Namasivayam, 2011). Muitos vegetais, frutas e verduras possuem componentes como carotenóides, vitaminas antioxidantes, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, indols e fibras insolúveis que podem agir de forma a bloquear, suprimir ou inibir a carcinogênese (Pellegrini, 1999, Kris-Etherton, 2002, Hail, 2008, Gibellini, 2011).

Existe um grande número de compostos químicos que apresentam atividade anti-neoplásica que dependendo da etapa do processo de carcinogênese que agem podem ser classificados como agentes bloqueadores ou agentes supressores (Watttemberg, 1993, Gibellini, 2011). Os agentes bloqueadores agem no sentido de impedir que substâncias cancerígenas se liguem a molécula de DNA através de processos ligados a alterações de absorção, biotransformação e excreção do agente cancerígeno. Já os agentes supressores agem em eventos celulares críticos das etapas de promoção e progressão prevenindo que as células iniciadas evoluam a malignidade (Numsem, 2008). Existem ainda alguns compostos que apresentam atividade tanto supressora como bloqueadora atuando de forma sinérgica apresentando um efeito protetor potencializado, são os chamados inibidores. (Watttemberg, 1993 Morse e Stoner 1993; Sporn, 2005).

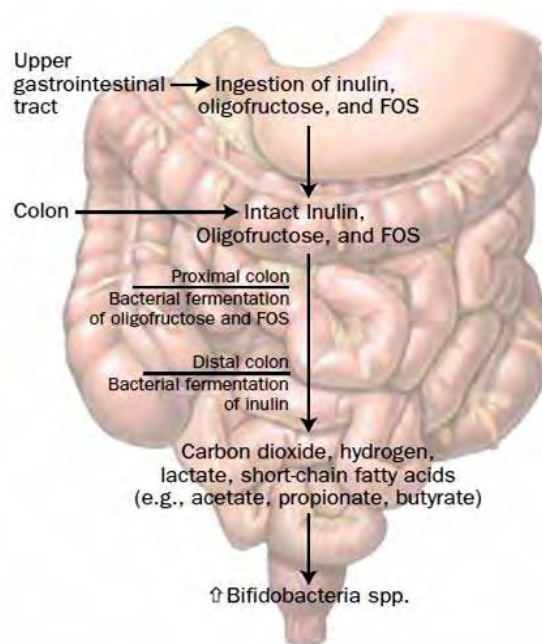
Os frutanos como a inulina, a oligofrutose e os frutooligossacarídeos (FOS) são compostos denominados prebióticos, definidos por Gibson e Roberfroid em 1995, como substâncias não digeríveis que quando consumidas conferem um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento favorável ou a atividade de um número limitado de bactérias autóctones do intestino grosso (Gibson e Roberfroid, 1995).

Em 2007, esse conceito foi reformulado para: “ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal conferindo benefícios ao hospedeiro e promovendo saúde e bem estar”. Outros compostos podem apresentar alguma atividade prebiótica, mas apenas dois grupos se encaixam dentro da definição proposta por Roberfroid; os prebióticos que se encaixam nessa definição são os do tipo inulina e os galactooligosacarídeos (GOS) (Kelly, 2008).

Existe uma dose clinicamente tolerada para o consumo de prebióticos; a dose diária recomendada para o consumo humano é de até 12,5 g / dia para uma pessoa adulta (Bouhnik *et al.* 1996). Na América do Norte o consumo diário é de 1 a 4 g, já na Europa a dose varia de 3 a 11 g; o excesso na ingestão pode causar diarreia e até levar a aumento do refluxo gastroesofágico (Marteau, 2004).

A inulina, a oligofrutose e os FOS resistem à digestão enzimática no trato gastrointestinal, sendo assim chegam até o cólon intactas onde passam por fermentação bacteriana tendo como produto final gases como dióxido de carbono e hidrogênio, lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato e butirato (Jonathan, 2002, Glenn, 2004, De Preter, 2011). 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 (Smith *et al.*, 1998; Johnson, 2002).

Segundo Gibson e Roberfroid, o consumo de prebióticos favorece seletivamente o crescimento de um número de bactérias, chamadas probióticos, como Bifidobactérias e Lactobacilos, as quais resistem ao baixo pH e a sais biliares, promovendo a saúde do hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995, Brady, 2000). O local de fermentação de cada tipo de inulina pode variar dentro do cólon, a fermentação dos FOS parece ocorrer principalmente no cólon proximal e a inulina ocorre no cólon distal (Kelly, 2008) (Figura 4).



Fonte: Kelly, 2008

Figura 5 – Metabolismo do prebiótico tipo inulina.

Múltiplos estudos em modelos animais e *in vitro* têm demonstrado a propriedade anti-carcinogênica dos prebióticos (revisado por Pool-Zobel, 2005). Na Tabela 1 estão listados os efeitos anti-carcinogênicos dos prebióticos tipo inulina já observados *in vivo* e *in vitro*.

O cólon humano abriga uma complexa comunidade de mais de 500 espécies de bactérias que podem ser classificadas em três classes: na **classe I**, encontram-se gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Mitsuokella*, *Megamonas*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Megashaera* em concentração relativamente elevada. Na **classe II**, incluem-se *Lactobacillus*, *Escherichia coli* (não patogênica), *Streptococcus* e *Veillonella* numa concentração relativamente baixa e na **classe III** encontram-se *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* patogênica e *Bacteroidaceae* (Cummings, 2002, Kudo, 2003). Essas bactérias desempenham suas funções na microbiota resultando em efeitos no trato gastrointestinal do hospedeiro (Figura 5).

Tabela 1 – Efeitos anti-carcinogênicos do prebiótico tipo inulina *in vivo* e *in vitro*.

Efeitos anti-carcinogênicos do prebiótico tipo inulina <i>in vivo</i>	Efeitos anti-carcinogênicos do prebiótico tipo inulina <i>in vitro</i> em células de cólon humano
Aumento de volume e acidez da massa fecal	Proteção de danos genotóxicos pelo butirato
Aumento do trânsito colônico	Indução de ¹ GSTs em colonócitos
Produção de ácidos graxos de cadeia curta Crescimento da bifidobactéria	Inibição GSTs e redução do crescimento de células de adenomas.
Diminuição da proliferação celular Indução de apoptose em células iniciadas	Indução de GSTs em células HT29 diferenciadas pelo butirato
Inibição do crescimento e metástase de tumores	Indução de apoptose em células tumorais de cólon humanas
Redução da incidência de carcinoma	Redução do crescimento de HT 29 pelo butirato e propionato Inibição de ² HDAC em tumores humanos pelo butirato.

¹GST – glutathione S-transferase; ² HDAC- Histona desacetilase (Adaptado de Pool-Zobel, 2005)

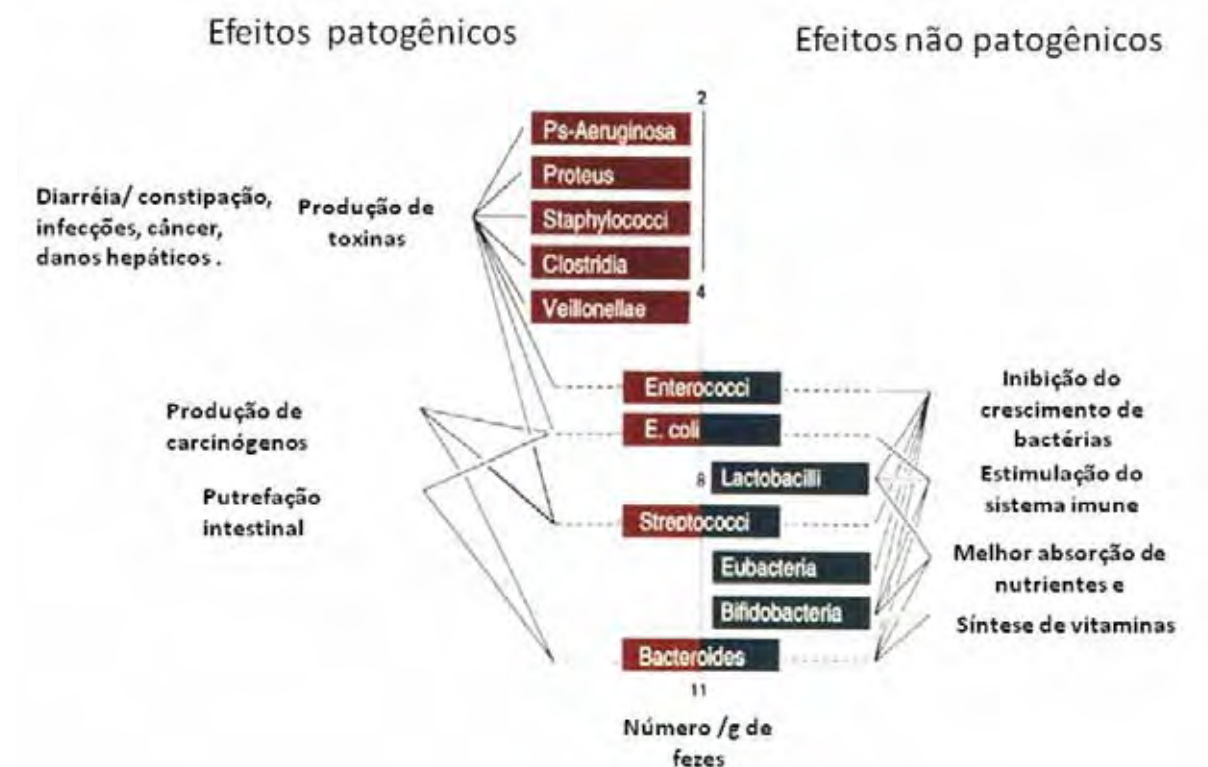


Figura 6 – Composição e efeitos da flora intestinal humana. Gibson & Roberfroid (1995).

O processo fermentativo envolve interação entre as espécies de bactérias presentes no intestino grosso num processo complexo onde o resíduo de uma serve de substrato para outra. A modulação da composição e da atividade metabólica da microbiota pela dieta tem despertado interesse; em particular pelo consumo de frutanos que estimulam o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, em detrimento de espécies nocivas para o hospedeiro. (Gibson & Roberfroid; 1995; Campbell et al., 1997; Roberfroid., 1998; Le Blay, 1999; Menne., 2000; Cummings, 2001; Kleessen, 2001; Le Blay, 2003, De Preter, 2011).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os microrganismos que mais mostraram efeitos positivos na prevenção de câncer de cólon em estudos *in vivo* e *in vitro* (Gupta, 2009). Eles apresentam baixa atividade de enzimas como a β -glucuronidase, azoredutase e nitrato-redutase, em comparação aos organismos anaeróbios no intestino, enzimas estas envolvidas na formação de agentes genotóxicos. Assim, essas bactérias quando colonizam o cólon fazem com que haja uma ação diminuída desses agentes nocivos,

aumentando a excreção de xenobióticos conjugados (Rowland, 2001). Além disso, a ingestão de prébióticos pode 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 (Pool-Zobel, 1996, Chala, 1997).

O gênero *Bifidobacterium* compõe 25% do total da microflora intestinal do adulto e 95% do recém-nascido, essas bactérias ao liberarem seus produtos da fermentação fazem com que o pH intestinal abaixe inibindo o crescimento ou atividades de bactérias patogênicas, representando uma linha de defesa contra colonização desses microorganismos. Além disso, no ambiente ácido ocorre a diminuição das amônias e aminas potencialmente tóxicas conhecidas pelo potencial promotor da carcinogênese. (Wollowski, 2001, Fotiadis, 2008, Preter, 2011).

Gibson et al, 1995 mostraram que a suplementação com 15 g diárias de FOS, divididas em três doses diárias durante duas semanas, fez com que houvesse aumento de *Bifidobacterium* e uma significativa diminuição de *Bacteroides*, *Clostridia* e *Fusobacteria* no cólon de adultos saudáveis. Em estudo com voluntários idosos recebendo dose de 8 g de FOS por dia por quatro semanas, observou-se aumento significativo na contagem de bifidobactérias, e quatro semanas após a interrupção os níveis voltaram aos basais (Bouhnik, 1996).

Pesquisas sugerem que adição de oligofrutose na dieta de recém nascidos aumentou o número de Bifidobactérias e reduziu o número de *Escherichia coli* e enterococos.(Kapiki et al, 2007). Waligora-Dupriet et al (2007) observou aumento significativo de Bifidobactérias e uma redução de Crostridia em crianças saudáveis de 7 a 19 meses de idade, quando submetidas a uma dieta suplementada com oligofrutose durante 21 dias. Pôde-se comprovar também o efeito bifidogênico da inulina através de estudos com 10 voluntários saudáveis consumindo 8 g de inulina por dia durante 14 dias (Tuohy, 2007). Apesar de poucos estudos avaliarem o efeito dose-resposta do consumo de prebióticos, pode-se concluir que há um efeito dose resposta,

principalmente em relação à contagem de bifidobactérias, porém limitado e dependente de outros fatores do indivíduo. (Pool-Zobel, 2005).

Um dos papéis da Bifidobactéria é estimular a função do sistema imune; produzir vitaminas do complexo B e ácido fólico, além de restaurar a flora intestinal normal depois da terapia com antibióticos (Roberfroid, 1995). Elas podem ainda estimular o ataque imunológico contra células malignas, agindo como imunomoduladoras (Pool-Zobel, 2005). Alguns estudos demonstram que o ácido láctico, produto da fermentação de *Lactobacilus*, apresenta atividade anti-tumoral e anti-metastática suprimindo a carcinogênese química em roedores, através da indução de diversas citocinas, como o interferon gama, IL-1b e TNF- α (Matsuzaki, 1998). Estudo *in vivo* demonstrou que o peptideoglicano produzido por *Lactobacilus* foi capaz de reduzir o crescimento de células tumorais de cólon CT26 em camundongos Balb/c aumentando as taxas de apoptose. Em contraste, nos ensaios *in vitro* não se observou tal efeito, sugerindo que a resposta foi mediada pelo sistema imune (Sun, 2005).

Estudos experimentais em animais comprovam que o consumo de prebióticos faz com que: 1) O trânsito intestinal aumente, diminuindo o tempo de contato da mucosa colônica com agentes carcinogênicos produzidos por várias espécies de bactérias patogênicas; 2) Faz com que o pH do cólon diminua significativamente devido a produção de AGCC, fazendo com que haja uma diminuição da colonização de microorganismos patogênicos e o crescimento de bactérias putrefativas (Pool-Zobel, 2005, Geyer, 2008).

O butirato produzido com a fermentação apresenta efeito protetor para o cólon visto que diminui a proliferação celular, estimula a diferenciação celular e induz a apoptose, principalmente em linhagem de células tumorais de cólon. Em estudos que comprovaram uma produção aumentada de butirato se observou uma diminuição nos FCA em ratos e um retardo na progressão tumoral (Campbell, 1997, Howland 2001, Pool-Zobel 2005). Outro mecanismo de ação do butirato é na modulação da expressão de genes pela ação da histona desacetilase, levando à mudanças no padrão de acetilação das histonas (Rajendran et al, 2011).

A acetilação é controlada pelas histonas acetiltransferases (HAT) e as histonasdesacetilases (HDAC), o desequilíbrio entre acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras contribui para desregulação da expressão gênica levando à carcinogênese (Huang, 2011). Os inibidores das histonas desacetilases (iHDAC) são considerados uma classe de agentes anti-tumorais que mostram efeitos benéficos na proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e angiogênese tumoral; apesar da grande maioria desses estudos terem demonstrado mais claramente a ação desses agentes como indutores de apoptose (Rajendran et al, 2011). O butirato de sódio é o primeiro (iHDAC) confirmado, apresenta efeito apoptótico, atua na diferenciação e parada do ciclo celular. Outros inibidores como os derivados do ácido hidroxâmico (Trichostatin A, isolado do fungo *Streptomyces hirsutus* e oxamflatin), tetrapeptídeos cíclicos (ampicidim (isolado do fungo *Fusarium pallidum*, depudesim, isolado do fungo *Alternaria brassicicola*) e derivados sintéticos da benzamida apresentam efeitos semelhantes (Rajendran et al, 2011).

Outro papel importante desempenhado pelo butirato é a modulação da expressão da glutathione S-transferase (GST), uma enzima que exerce papel fundamental na detoxificação de cancerígenos e compostos associados ao estresse oxidativo. Além desses efeitos, o butirato está associado com o aumento no número de células caliciformes nas criptas intestinais aumentando conseqüentemente, a secreção de mucinas para a proteção da mucosa do cólon (Shimotoyodome, 2000; Pool-Zobel, 2005; Kleessen, 2003).

Alguns estudos sugerem que a administração de prebióticos e probióticos em combinação tenha um efeito sinérgico bem maior do que administrado individualmente. Os assim chamados simbióticos apresentaram efeito potencializado na redução de FCA em modelos animais induzidos quimicamente, quando comparado à administração isolada (Brady, 2000, Zhu, 2011). Outros estudos apontam para um aumento no efeito apoptótico dos simbióticos sobre a mucosa colônica (Le Leu, 2005). Dessa forma, alguns estudos sugerem

que os prebióticos sozinhos ou associado aos probióticos representem uma grande estratégia para o tratamento e prevenção de câncer de cólon (Roller, 2004; Dias *et al.*, 2010).

4. Referências Bibliográficas

ALRAWI S.J. *et al.* . Aberrant crypt foci. **Anticancer Res.** vol. 26, n. 1A, p. 107-19, jan 2006.

ANGULO, H. El yacón. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, 2001.

BARROW, B.J. *et al.* Enzyme-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. **Cancer Res.**, v. 50, n. 6, p. 1911-6, mar 1990.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. **Cancer Lett.** vol, 37, n. 2, p. 147-51, oct 1987.

BOFFETA, P., HASHIBE. M. Alcohol and cancer. **The Lancet Oncol.**, v.7, n. 2, p. 149-156, feb 2006.

BONONI, A.P. *et al.* Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 45, n. 4, p. 13-24, 1999.

BOUHNİK Y., *et al.* Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Nutr Cancer.** v. 26, n.1, p. 21–29, aug 1996.

BUC E. *et al.* Tobacco smoking: a factor of early onset of colorectal cancer. **Dis colon & rectum**, v.49, n.12, p.1893-6, dec 2006.

CAMPBELL, J.M.; FAHEY G.C JR, WOLF, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 127, n. 1, p. 130-136, jan 1997.

CAMPLEJOHN, R.S *et al.* Apoptosis, ageing and cancer susceptibility. **Br J Cancer.** v. 88, n. 4, p. 487-90, feb 2003.

CAPITO, S.M.P.. Raiz tuberosa de Yacon (*Polymnia sonchifolia*): caracterização química e métodos de determinação de frutanos (CG e CLAE-DPA). São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo.

CHALLA A. *et al.* *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. v.18, n. 3, p. 517-521, mar 1997.

CORPET D.E, PIERRE F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **Eur J Cancer**., v. 41, n. 13, p.1911-22, sep 2005.

CUMMINGS, J.H, MACFARLANE, G.T, ENGLYST, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. **Am J Clin Nutr**. v.73, p. 415S–420S, feb 2001.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **Br. J. Nutr.**, v. 87, p. 145-151, may 2002.

De PRETER, V. *et al.*. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 55, p. 46–57, jan 2011.

DEMARZO, M.M. *et al.* Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. **Med Sci Sports Exerc**. v.40, n. 4, p. 618-21, apr 2008.

DIAS, *et al.* Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48, p. 772-780, jan 2010.

DI GREGORIO, C. *et al.* Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology**, v. 30, n. 4, p. 328-34, nov 1997.

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**,v. 66, n. 6, p. 1191-308, jun 1981.

DRAGAN, Y.P, PILOT, H.C. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J**, v. 5, p. 2280-6, jun 1991.

FAVIER, C.F. *et al.* Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Appl Environ Microbiol**. v.68, p. 219-226, jan 2002.

FEARON, E.R, VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n.5, p. 759-767, jun 1990.

FEMIA A.P., Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. **BMC Cancer**. v. 10, p. 194, may 2010.

FEMIA, A.P, DOLARA, P., CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 277-81, nov 2004.

FOTIADIS C.I. *et al.* Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* v.14, n. 42, p. 6453-6457, 2008.

GENTA, S. B. *et al.* Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 43, n. 11, p. 1657-65, nov 2005.

GEYER M. *et al.* Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. **Digestion.**, v. 78, p. 30–33, sep 2008.

GIBELLINI L. *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2011, n. 591356, apr 2011.

GIBSON, G.R, ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401-1412, jun 1995.

GIOVANNUCCI, E. *et al.* Alcohol, Low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men, **J Natl Cancer**, v. 87, n. 4, p. 265-273, feb 1995.

GOTO, K. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, p. 2346-2347, 1995.

HAGELKRUYS, A. *et al.* The Biology of HDAC in Cancer: The Nuclear and Epigenetic Components. **Handb Exp Pharmacol.** v. 206, p. 13- 37, 2011.

HAIL N. Jr. *et al.* Cancer chemoprevention: a radical perspective. **Free Radic Biol Med.** v.45, n. 2, p. 97-110, jul 2008.

HERMAN, M. HELLER, J. Andean roots tubers: Ahipa, arracacha, mscs and Yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Intitute, Rome, Italy, 1997.

HOFFMAN-GOETZ L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. **Med Sci Sports Exerc.** v. 35, n.11, p. 1828-33, nov 2003.

HUANG Y, SHAW P.G, DAVIDSON N.E. Inhibition of histone deacetylases. *Methods Mol Biol.* V.125, n. 4, p. 525-31, 2011.

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, jan 2001.

- Instituto Nacional do Cancer – **INCA**. Câncer de cólon, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>>. Acesso em: 12 nov. 2011.
- JEMAL A. *et al.* Global Center Statistic. **CA Cancer J Clin.**, v.61, n.2, p.69-90, mar-apr 2011.
- JOHNSON, I. T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem. Toxicol.*, Elmsford, v. 40, p. 1171-1178, aug 2002.
- KAMALEESWARI, M., TUVELAN, M., NALINI, N. Effects of dietary caraway (*Carum carvi L.*) on aberrant crypt foci development, fecal steroid, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2- dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 214, n. 3, p. 290-296, aug 2006.
- KANWAR S.S. *et al.* . The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. **Mol Cancer.** ,v. 6;p. 9:212, aug.2010.
- KAPIKI, A. *et al.* The effect of a fructo-oligosaccharide supplemented formula on gut flora of preterm infants. **Early Hum Dev.** v.83, n.5, p. 335-9, may 2006.
- KELLOFF, G.J., *et al.* Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.** v.130, p.467s-71s, feb 2000.
- KELLY, G. Inulin-Type Prebiotics – a review: part 1. **Altern Med Rev.**, v. 13, n. 4, p. 315-29, dec 2008.
- KHAN N, Afaq F, Mukhtar H., Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. **Cancer Letters**, v. 293, n. 2, p.133–143, jul 2010.
- KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **Brit. J. Nutr.**, v. 89, p. 597-606, may 2003.
- KUDO, S. Intestinal flora and health– Bioactive carbohydrates for food and feed. **Dietary Fibre**, p. 32-34, 2003.
- KURIKI, K., TAJIMA K. The increasing incidence of colorectal cancer and the preventive strategy in Japan. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.7, n.3, p.495-501, jul – sep 2006.
- LACHAN, L. *et al.* Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. *Plant soil environment*, v.50, n.9, p.383-390, 2004.

LE BLAY, G.M. *et al.* Enhancement of butyrate production in the rat ceco colonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. **Brit. J. Nutr.**, v. 82 , p. 419-426, nov 1999.

LE BLAY, G.M. *et al.* Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v. 129, n. 12, p. 2231-35, dec 1999.

LE LEU R. *et al.* A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. **J. Nutr.**, v. 135, n. 5, p. 996-1001, may 2005.

LIEBERMAN, D.A. *et al.* Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. **Jama**, v. 290, n. 22, p.2959-67, dec 2003.

MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales . **Arch Latinoam Nutr.** v. 57, n. 4, dec 2007.

MANNING, T.S; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v.18, n.2, p. 287–298, apr 2004.

MARKOWITZ, S. D., BERTAGNOLLI, M.M. Molecular mechanism of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. **Engl J. Med.** vol. 361, n. 25, dec 2009.

MARTEAU, P., SEKISIK P. Tolerance of probiotics and prebiotics. **J. Clin Gastroenterol.**, v. 38, n. 6, p. S67-9, jul 2004.

MATSUZAKI T. Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota. **Int J Food Microbiol.**, v. 26, n. 2, p. 133-140, may 1998.

MENNE, E., GUGGENBUHL, N., ROBERFROID, M. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. **J. Nutr.**, v. 130, n. 5, p. 1197-1199, may 2000.

MICHELS, I. Aspectos tecnológicos do processamento mínimo de tubérculos de Yacon (Polymnia sonchifolia) armazenados em embalagens com atmosfera modificada. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná), 2005.

MORSE, M.A, STONER, G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. Carcinogenesis. v. 14, n. 9, p. 1737–46, sep 1993.

NA, H.K.; OLIYNYK, S. Effects of physical activity on cancer prevention. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1229, p. 176-83, jul 2011.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1215 p. 60–71, jan 2011.

- NEWELL, L.E; HEDDLE, J.A. The potent colon carcinogen, 1, 2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mut Res.**, vol. 564, n. 1, p. 1-7, 2004.
- OLIVEIRA, M.A. DE; NISHIMOTO, E.K. Evaluation of the development of yacon plants (*Polymnia sonchifolia*) and characterization of the carbohydrates by HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 7, n. 2, p. 215-220, Jul-Dec 2004.
- PELLEGRIN, I. *et al.* Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2, 2alfa-azobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379–389, 1999.
- PITOT, H.C. Animal models of neoplastic development. **Dev Biol (Basel)**. vol.106, p. 53-7, 2001.
- PITOT, H.C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu Rev Pathol**. v. 2, p. 1-29, 2007.
- POIRIER, L. A. Stages in carcinogenesis: alteration by diet. **Am J Clin Nutr.**, v. 45, p. 185-91, jan 1987.
- POLYAK, K.,. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colo-rectal neoplasia. **Am. J. Pathol.**, v. 149, n. 2, p. 381-7, aug 1996.
- POOL-ZOBEL, B.L. *et al.* Lactobacillus- and bifidobacterium Mediated antigenotoxicity in the colon of rats. **Nutr Cancer** .v. 26, n. 3, p. 365-380, 1996.
- POOL-ZOBEL, B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Br J Nutr.**, v. 93, n. 1, p. S73–S90, apr 2005.
- POZZA A. *et al.* Colonic carcinogenesis in IBD: molecular events. **Ann Ital Chir.**, vol. 82, n. 1, p. 19-28, jan 2011.
- PRETLOW, T.P. *et al.* Colonic aberrant crypts in azoximethane-treated F344 rats have decreased hexosaminidase activity. **Am. J. Pathol.**, v. 50, n. 6, p. 1911- 6 , mar 1990.
- PRETLOW, T.P. *et al.* Aberrants crypts: Putative preneoplastic foc in human colonic mucosa. **Cancer Research**. v. 51, p. 1564-1567, 1991.
- 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. **Mol Cancer**., v. 30, p. 10:68, may 2011.
- ROBERFROID M, SLAVIN J. Nondigestible oligosaccharides. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 4, n.6 , p. 461-80, nov 2000.

ROBERFROID, M.B, DELZENNE, N.M. Dietary fructans. Annu. **Rev. Nutr.**, v. 18, n. 1, p. 117-43, jul 1998.

RODRIGUES, M.A.M. *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz J. Med. Biol. Res.** , v. 35, n. 3, 351-355, mar 2002.

ROLLER, M. *et al.* . Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. **Br J Nutr**; v. 92, n. 6, p. 931-938, dec 2004.

ROSSI, B.M. *et al.* Tumores colorretais hereditários. **Rev. Col. Bras. Cir** vol.25, n.4, p.271-80, Aug 1998.

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

SHAILENDER S. *et al.* The Wnt/ β -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. **Mol Cancer.**, v. 6, p. 212, aug 2010.

SHIMOTOYODOME, A. *et al.* Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v.125, n. 4, p. 525-31, apr 2000.

SHPITZ, B. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. **Am. J. Surg**, v. 174, n. 4, p.425-30, oct 1997.

SMITH, J. G.; YOKOYAMA, W. H.; GERMAN, B. Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 38, n. 4, p.259-297, may 1998.

SPORN, M.B, LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol.**, v. 2, n.10, p. 518-25, oct 2005.

STAMP, D.H.T. Three hypotheses linking bile to carcinogenesis in the gastrointestinal tract: certain bile salts have properties that may be used to complement chemotherapy. **Med. Hypotheses.**, v.59, n. 4, p. 398-405, oct 2002.

STRACHAN, T. **Human Molecular Genetics.** 2. ed. New York: Wiley-Liss; 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7580/>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

SUN, J. *et al.* Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. **World J Gastroenterol.** v. 11, n. 40, p. 6330-7, oct 2005.

SUNG, M.K. *et al.* Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1229, p. 61–68, jul 2011.

TAKAHASHI, M, WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci.** v. 95, n. 6, p. 475–480, jun 2004.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **J Carcinog.** vol. 8, n.5, mar 2009.

TEITELBAUM, J.E., WALKER, W.A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annu. Rev. Nutr.** v. 22, p. 107–38, jan 2002.

TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta catenin regulates expression of ciclyn D1 in colon carcinoma cells. **Nature**, v. 398, p. 422-426, ap 1999.

TUDEK, B., BIRD, R.P, BRUCE, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Res.**, vol. 49, n. 5, p. 1236-40, mar 1989.

TUOHY K.M. Inulin-type fructans in healthy aging. **J Nutr.**, v. 137, n.11, p. 2590S-2593S, nov 2007.

UCHIDA, K. *et al.* Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. **Jpn. Cancer Res.**, v. 88, n. 9, p. 807-14, sep 1997.

VAN DER MEER, R. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 114, p. 75-83, mar 1997.

VINCENT T.L, GATENBY R.A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J of Oncol.** v. 32, n. 4, p. 729-737, apr 2008.

Waligora-Dupriet, A.J. *et al.* Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. **Int J. Food Microbiol.** v.113, n.1, p. 108-13, 2007.

WATTENBERG, L.W, Prevention-Therapy-Basic Science and the Resolution of the Cancer Problem. **Cancer Res.**, v. 53, n. 24, p. 5890-96, dec 1993.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of Cancer, **Prev. Med.**v. 25, n. 1, p. 44-45, feb 1996.

WELLING, G. W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v.30, p. 61-67, 2000.

WILLETT, W.C. Diet and cancer. **JAMA.** v. 293, n. 2, p. 233-234, jan 2005.

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em: 12 nov.2011.

YOSHIMI, N. *et al.* Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. **Cancer Sci.** v. 95, n. 10, p. 792-797, oct 2004.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes of yacon, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**, v. 45, n.1, p.72-85, jan 1991.

ZHU Y. *et al.* Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis, **Cancer Lett.** v. 309, n. 2, p. 119-27, oct 2011.

Objetivos

5. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ingestão de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar.

6. Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito da ingestão de extrato de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) em duas concentrações (0,5% e 1%) sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes-FCA) e tumores induzidos pela dimetilhidrazina (DMH) na mucosa do cólon em ratos Wistar.
2. Avaliar o efeito da ingestão de extrato de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) em duas concentrações (0,5% e 1%) sobre as taxas de proliferação celular, apoptose e expressão de β -catenina na mucosa do cólon e em tumores colônicos induzidos pela dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar

Article

Suppressive effects of yacon root (*Smallanthus sonchifolius*) intake on development of
colonic aberrant crypt foci and tumor in male rat

Nelci A. de Moura¹, Bruno F.R. Caetano², Luis H. Urbano³, Claudio Cabello³, Maria A.M.
Rodrigues⁴, Luis F. Barbisan^{2*}

¹ UNESP Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Program of Post-Graduation in General and Applied Biology Program, Botucatu 18618-970, SP, Brazil.

² UNESP Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu 18618-970, SP, Brazil.

³ UNESP Sao Paulo State University, School of Agronomic Sciences, CERAT, Botucatu, 18610-307, SP, Brazil.

⁴ UNESP Sao Paulo State University, School of Medicine, Botucatu, 18610-307, SP, Brazil.

*Corresponding author

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-0970 Botucatu, SP, Brazil. Tel/Fax: +55 14 38116264.

E-mail address: barbisan@ibb.unesp.br (L.F. Barbisan).

Abstract

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a tuberous root native to the Andean region of South America which contains high amounts of inulin-type fructans. The present study investigated the beneficial potential of yacon root intake on development of colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male Wistar rats. Six groups were studied: Groups 1–4 were given four s.c. injections of DMH (40 mg/kg b.w.) twice a week, during two weeks, whereas Groups 4 and 5 received similar injections of EDTA solution (DMH vehicle). After 6 weeks of DMH-initiation, groups were fed with basal diet (G1 and G6) or basal diet containing dried extract of yacon root at 0.5% (G2), 1.0% (G3 and G5) or a synbiotic formulation (G4) (1.0% yacon root plus *Lactobacillus casei* at 2.5×10^{10} CFU per g diet) for 13 weeks. At 20 week, all animals were killed and the colons were analyzed for development of aberrant crypt foci (ACF) and tumor. A significant reduction in number and multiplicity of ACF and in number of invasive adenocarcinomas was observed in the groups orally treated with 1.0% yacon root (G3) or their synbiotic formulation (G4) ($0.05 < p < 0.001$). Tumor multiplicity (noninvasive plus invasive) was significantly lower solely in group fed with symbiotic formulation ($p < 0.02$). Also, a reduction in cell proliferation indexes in colonic crypt and tumor were observed in groups orally treated with 1.0% yacon root (G3) or their synbiotic formulation (G4) ($p < 0.001$). The findings this study suggest that yacon root intake may have potential as chemopreventive agent against colon carcinogenesis.

Key-Words: yacon root, colon carcinogenesis, cancer chemoprevention.

1. Introduction

Colon cancer is a significant cause of mortality from cancer among men and woman in industrialized Western societies (Jemal et al., 2011). Although its etiology is multifactorial and complex, it is generally accepted that the hereditary genetic component associated with dietary habits such as low intake of fibers, proteins, fruits and vegetables as well as diets with high red and processed meat and fat levels are among the greatest risk factors (Khan et al., 2010; Bastide et al., 2011; Watson and Collins, 2011). Compelling laboratory animal and epidemiologic evidences indicate that lifestyle and dietary habits have been associated with up- or down-regulation of the risk for colon cancer onset and progression (Erdelyi et al., 2009; Kim, et al. 2011). Recently, there are great scientific and public interests in colon cancer chemoprevention studies for identification of naturally occurring substances present in food (Tarapore et al., 2011; Poulsen et al., 2011), and chemically-induced models of colon carcinogenesis in rodents have been demonstrated adequate for the study of risk factors, development, and prevent of this malignance (Raju, 2008; Namasivayam, 2011).

Colon cancer has been postulated as a complex and multistage process well established in both humans and experimental animals (Takahashi and Wakabayashi, 2004; Tanaka, 2009). These stages of colon carcinogenesis are accompanied by several biochemicals, morphological and genetic and epigenetic alterations in the colonic mucosa (Takahashi and Wakabayashi, 2004). Development of rodent and human colon cancer includes a series of pathological alterations ranging from discrete microscopic mucosal lesions like aberrant crypt foci (ACF) to malignant tumors (Gupta and Schoen, 2009; Tanaka, 2009). ACF are considered to be putative preneoplastic lesions because they can be found in colonic mucosa of rodents treated with chemical carcinogens (Bird and Good, 2000; Cheng and Lai, 2003) and in patients at high risk for cancer development (Khare et al., 2009). Biochemical, genetic, and morphological analysis have shown that ACF and colon tumors share similar alterations, further supporting the hypothesis that the ACF are surrogate precursors of colon cancer (Yoshimi et al. 2004;

More et al., 2005; Suehiro and Hinoda, 2008). ACF can be easily induced in rodent colon after single or multiple administrations of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) or its metabolite azoxymethane, whereas their detection and quantification in unsectioned colon have been proposed as a biomarker for rodent short- and medium-term bioassays for identification of potential chemopreventive agents of colon cancer (Bird and Good, 2000; Raju, 2008).

Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl., Asteraceae) is a perennial plant originally native of Andean region of South America (Zardini, 1991; Valentová et al., 2006). There are reports of its cultivation in other countries, including EUA, Europe, New Zealand and Brazil (Valentová et al., 2006). Yacon has been cultivated in south-eastern Brazil as a crop since 1991 yielding up to 100 t/ha (Vilhena et al., 2000; 2006). In folk medicine, yacon tuberos roots and infusions from dried leaves are consumed by people suffering from diabetes or from various digestive or renal disorders (Valentová et al., 2006). Its tuberos roots are consumed fresh or cooked and it have been considered a functional food because of the large amounts of fructans (i.e., inulin and fructooligosaccharides) (Valentová et al., 2006). Fructans are carbohydrates reserve which contains up to 70 fructose units linked or not to a terminal sucrose molecule, may have linear or branched structure held together by bonds frutasil-fructose (Roberfroid and Delzene, 1998; Pedreschi et al., 2003). Inulin-type fructans include inulin-like fructans, oligofructose or fructooligosaccharides, which differ each other by degree of polymerization (Roberfroid and Slavin, 2001; Kelly, 2008). Inulin-type fructans are prospective prebiotics as they are fermented by beneficial species of gut bacteria (Gibson and Roberfroid, 1995; Havenaar, 2011; DuPont and DuPont, 2011). They are also used as a source of natural sweeteners and syrups suitable for persons suffering from digestive problems (Charalampopoulos and Rastall, 2012). In fact, oral treatment with yacon syrup markedly accelerated colonic transit in healthy individuals (Geyer et al., 2008) and increased defecation frequency and satiety sensation in obese and slightly dyslipidemic pre-menopausal women (Genta et al., 2009).

Considering the large amounts of inulin-type fructans detected in yacon tuberous roots and its increased popularity and consumption, the present study aimed to investigate the potential chemopreventive action of 0.5 and 1.0% dried extract of yacon root intake on the post-initiation stage of rat colon carcinogenesis induced by DMH in male Wistar rats. In addition, beneficial effects of yacon root in association with *Lactobacillus casei* (i.e., a synbiotic formulation) was also evaluated.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatment

The animals used in this study were handled in accordance with the Ethical Principles for Animals Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The experimental protocol used herein was approved by the local University Ethics Committee for Animal Research.

Four-week-old male Wistar rats were obtained from Centro de Tecnologia do Paraná (TECPAR, Araucária PR, Brazil). The animals were housed in polypropylene cages covered with metallic grids in a room maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ humidity under a 12-h light-dark cycle. After a 2-week acclimation period to the housing environment, the animals were randomly distributed into six groups (5 or 12 rats each): Groups 1 to 4 were treated with four subcutaneous injections of 40mg/kg body weight of 1,2-dimethylhydrazine hydrochloride (DMH, Tokyo Kasei Industries Co., Tokyo, Japan) (Dias et al., 2006, 2010), twice a week for two weeks. Groups 5 and 6 received similar injections of EDTA solution at pH 6.0 (DMH vehicle). At week 7, G1 and G6 groups were fed with basal diet (Nuvilab-CR-1, Curitiba-PR, Brazil) and G2, G3, G4 and G5 groups received basal diet containing dried extract of root yacon at 0.5%, 1.0%, a synbiotic formulation (dried extract of root yacon at 1.0% plus *Lactobacillus casei* at 2.5×10^{10} de CFU per g diet) or dried extract of root yacon at 1.0%, respectively, for 13 weeks. At week 20, the animals were killed by exsanguination under

sodium pentobarbital anesthesia (45 mg/kg body weight). Individual body weight and food consumption were recorded twice a week during the experimental period.

2.2. Determination of inulin-type fructans

Samples of dried extract of root yacon were obtained by spray dryer process using maltodextrin as a carrier agent. The inulin-type fructans was analyzed by high performing liquid chromatography (HPLC) using ProStar Varian model (Hubbardston, MA, USA). The sugars separation was achieved on a Biorad Aminex HPX-87P model column and RI350 detector. Mobile phase consisted of deionized water and detection of maltodextrin, inulin, sucrose, glucose and fructose (12.120, 13.307, and 19.608, 24.425 and 37.926 retention time) were detected at flow rate of 0.8 mL/min. The concentrations of maltodextrin, inulin, sucrose, glucose and fructose were calculated from standard curves prepared with purified standards (Sigma–Aldrich, Co, USA). The chemical analysis revealed that dried extract of root yacon used in this study contained 20.4% inulin, 4.8% sucrose, 2.8% glucose, 6.8% fructose and 16.7% maltodextrin. Equivalent quantities from sucrose, glucose, fructose and maltodextrin were added into basal diet from G1 and G6 groups. Thus, control diet and diet containing dried extract root yacon at 1.0% were formulated in order to provide proximate caloric energy.

2.3. Colon processing and histopathological analysis

At necropsy, the colon was removed, opened longitudinally and gently rinsed with saline to remove residual bowel contents and, then, fixed flat in 10% buffered formalin for 24 h at room temperature. The localization and volume of each tumor were registered. Then middle and distal colon were stained with 1.0% methylene blue dissolved in phosphate-buffered salt solution (PBS) for analysis and quantification of classical ACF (Dias et al., 2006, 2010). ACF were identified as preneoplastic lesions composed by enlarged, slightly elevated, oval or slit-like lumen, and higher intense staining intensity of aberrant crypts when compared

to the surrounding normal colonic crypt, according to Bird criteria (Bird, 1987). The number of ACF/colon, number of aberrant crypts in each ACF (multiplicity)/colon and the number of ACF with ≥ 4 or ≥ 9 /colon were determined under light microscopy at 40x magnification. After ACF evaluations were completed, the colons were Swiss-rolled (4 to 6, 2-mm width segments) and embedded in paraffin. Histological evaluation was carried out on hematoxylin-eosin (HE)-stained colon sections and ACF were classified as conventional or dysplastic lesions, according to Yoshimi et al. (2004). Colon tumors were classified as adenomas or adenocarcinomas, according to Hamilton and Aaltonen (2000).

2.4. Immunohistochemical procedures

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cleaved caspase-3 and β -catenin expression in colon sections was immunohistochemically detected using a polymer system (MACH 4 Universal HRP polymer Detection, Biocare, CA, USA). Briefly, deparaffinated 5- μ m colon sections on silanized slides were treated sequentially with 0.01M citrate buffer (pH 6.0) at 120°C for 5 min time in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation Denmark A/S), 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, nonfat milk for 60 min, mouse anti-PCNA (clone PC10, 1:200 dilution, DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark), rabbit polyclonal cleaved anti-caspase-3 (clone Asp 175, 1:100 dilution, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) or anti- β -catenin (clone ab16051, Abcam, MA, USA) antibodies overnight at 40C, mouse probe and HRP polymer for 30 min each at room temperature. Chromogen color development was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Co, USA). The slides were counterstained with Harris haematoxylin.

2.5. PCNA, cleaved caspase-3 and β -catenin analysis

At least 20 perpendicular well-oriented normal-appearing crypts from the middle and distal colons were examined in each animal (groups G1 to G6) under light microscopy. The index of colonic crypt cells expressing proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or cleaved caspase-3 was evaluated as the percentage among the total number of cells analyzed in a perpendicular colonic crypt. Also, PCNA and cleaved caspase-3 indexes (~500 cells) and β -catenin expression were assessed in tumor colons. The abnormal localization of β -catenin (i.e. cytoplasm and nucleus) was evaluated in each colon tumor according to Yoshimi et al. (2004) and Femia et al. (2004).

2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the Jandel Sigma Stat software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Data from body weight gain, food consumption, ACF and tumor number and multiplicity/colon, cell proliferation and apoptosis indexes were compared among DMH-initiated groups. Besides, incidence of conventional and dysplastic ACF and colon tumor were compared by chi-square or the Fischer test. The differences among groups were considered significant when $p < 0.05$.

Results

3.1. General findings

The mean body weights of respective DMH- and vehicle-treated groups fed with dried extract of yacon root or their synbiotic formulation throughout 13 weeks were comparable with those of the groups receiving basal diet (data not showed). Among DMH-initiated groups (G1 to G4), the survival rate was higher in the group orally receiving synbiotic formulation (G4) when compared to the group fed with basal diet (G1) (Figure 1A), although without a significant difference. Ten DMH-treated animals were found dead during the course of the

experiment: four rats from the group fed with basal diet (G1), four rats from the group fed with 0.5% dried extract of yacon root (G2) and two rats from the fed 1.0% dried extract of root yacon (G4). A complete necropsy was not performed due to advanced postmortem changes.

Oral treatment throughout 13 weeks with dried extract root yacon or their synbiotic formulation did not change body-weight gain or food consumption (Table 1). At week 20, serum glucose, triglycerides and total cholesterol levels were similar among the different groups, but the relative liver weight was significantly lower ($p = 0.04$) in the group receiving synbiotic formulation (G4) than in the DMH-treated and fed with basal diet (G1) (Table 1). The mean daily intake estimated of inulin-like fructans was approximately 73.90, 150.74, 147.65 and 123.26 mg/kg of body weight for G2, G3, G4 and G5 groups, respectively.

3.2. *Classical ACF analyses*

Classical ACF were evaluated in methylene blue-stained whole mount colon after 18 weeks of DMH administration. Data from the number and multiplicity of stereoscopically-analyzed ACF for the different groups are summarized in Table 2. All DMH-initiated animals developed classical ACF in the colon (G1-G4) while no preneoplastic lesion was detected in the colon from vehicle-treated groups (G5 and G6).

The total number of AC and ACF and multiplicity (AC/ACF) were significantly lower ($p = 0.013$, $p < 0.05$ and $p = 0.003$, respectively) in the groups orally treated with 1.0% dried extract of root yacon (G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the group fed with basal diet (G1). The number of ACF containing 4-9 AC was significantly lower ($p = 0.018$) in the group receiving 1.0% dried root yacon (G3) and their synbiotic formulation (G4) when compared to the respective control group (G1). Also, the number of ACF containing ≥ 9 AC was significantly lower ($p = 0.001$) in groups orally treated with 0.5% and 1.0% dried root yacon (G2 and G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the respective control group fed with basal diet (G1).

3.3. Tumor size and multiplicity and histopathology analyses

At sacrifice, all macroscopic tumors were measured and classified into three categories: small, medium and large (Figure 1B). A reduction in the mean tumor size (cm³) was observed in groups orally receiving 1.0% dried extract of root yacon (G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the only DMH-treated group (G1) (Table 3), although without a significant difference.

In all HE-stained Swiss-rolling colon section from the DMH-treated groups (G1 to G4) were observed nondysplastic ACF, but a few number of animals presented dysplastic ACF (Figure 1 C and D). A significant reduction ($p < 0.05$) in incidence of dysplastic ACF was observed in groups orally treated with 1.0% dried extract of root yacon (G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the respective control group fed with basal diet (G1) (Table 3). Also, the histopathological analysis by HE-staining revealed that > 95% of colon tumors were adenocarcinomas and the resting were carcinoma in situ. In addition, the colonic adenocarcinomas were classified into invasive and non-invasive type (i.e., based on invasion into submucosa and muscularis) and their incidence (% rats with tumor), and multiplicity (number of tumor/rat) were also calculated.

The results of the present study indicated that dietary 1.0% dried extract of root yacon or their synbiotic formulation significantly inhibited ($p = 0.02$) the mean number of invasive adenocarcinomas while solely the group receiving a synbiotic formulation presented a significant reduction ($p = 0.02$) in tumor multiplicity (noninvasive and invasive tumor) (Table 3). No colon tumor was macroscopically or microscopically detected in non-initiated groups fed with basal diet (G6) or fed with 1.0% dried extract of root yacon (G5).

3.4. Cell proliferation, apoptosis and β -catenin analyses

The colonic cell proliferation (PCNA-positive epithelial cells, Figure 2A and B) and apoptosis (cleaved caspase-3-positive epithelial cells, Figure 3A and B) indexes were analyzed in the “normal-appearing” crypts and tumors colon (Figure 2C and 3C). The proportion of PCNA and cleaved caspase-3 immunoreactivity was markedly and significantly higher ($p < 0.001$) in tumors colon than “normal-appearing” colonic crypts (Figure 2C and 3C). Also, a significant reduction ($p < 0.001$, $p = 0.039$, respectively) in the cell proliferation indexes was observed in groups DMH-initiated and orally receiving 1.0% dried extract of root yacon (G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the respective control group (G1) for both “normal-appearing” colonic crypts and tumors analyses (Figure 2C). However, the apoptosis indexes was not modified by dietary dried extract of yacon root (G2 and G3) or their synbiotic formulation (G4) when compared to the respective control group fed with basal diet (G1) (Figure 3C).

Altered β -catenin expression was analyzed in colon tumors and compared to the “normal-appearing” crypts. All adenocarcinomas expressed high levels of β -catenin in the cytosol and some malignant tumors also presented nuclear positivity (Figure 1 E), differently from surrounding colonic crypt that showed only membrane β -catenin positivity. A significant reduction (40 and 50%, $p < 0.001$) in the incidence of colon tumors showing altered β -catenin expression was observed in groups orally treated with 1.0% dried extract of root yacon (G3) or their synbiotic formulation (G4), respectively when compared to the respective control group fed with basal diet (G1 and G5).

4. Discussion

The present study evaluated the potential protective effects of yacon root or a synbiotic formulation intake against chemically-induced colon carcinogenesis in male Wistar rats. A significant reduction in development of the classical and dysplastic ACF and in number of invasive colon tumors was observed in the group orally treated with 1.0% yacon root. These protective effects of yacon root feeding were associated with a significant antiproliferative activity and reduction in incidence of colon tumors expressing altered β -catenin. Cancer chemoprevention is classically defined as the prevention or reversion of multistage carcinogenesis process by the administration of natural or synthetic agents, including functional foods (Stoner et al., 1997; De Flora and Ferguson, 2005). Chemopreventive compounds may inhibit cancer development either by limiting exposure to carcinogens (e.g., carcinogen-formation inhibitors and blocking agents) or by decreasing tumor promotion/progression stages (e.g. suppressing agents) (Stoner et al., 1997; De Flora and Ferguson, 2005). Therefore, the findings of present study indicate that dietary yacon root acted as a suppressing agent against rat colon carcinogenesis under the present experimental conditions.

Yacon root or syrup intake is apparently well-tolerated without evident toxic effects in experimental and human studies (Genta et al., 2004, 2009; Valentova'et al., 2008; Geyer et al., 2008). The recommended and safety daily consumption of yacon syrup with no undesirable gastrointestinal effect is 0.14 g fructooligosaccharides/kg in obese and slightly dyslipidemic pre-menopausal women that participated in a intervention study (Genta et al., 2009). In other human intervention study, the intake of yacon tubers capsules at daily dose of 2.4 g was safety and well tolerated in people suffering from or at risk of metabolic syndrome (Valentova'et al., 2008). However, yacon syrup intake at dose of 20 g daily (equal to 6.4 g fructooligosaccharides) induced a marked acceleration of colonic transit time in healthy volunteers included in a placebo-controlled crossover study (Geyer et al., 2008). The results of present study indicate that daily dose of fructooligosaccharides derived of 1.0% yacon root

intake was ~ 150 mg (0.15g/kg). This dose did not cause any deleterious effects in gastrointestinal system of male Wistar rats and it was a safety dose similar to ones recommended for humans (Genta et al., 2009).

Various evidences from experimental and human studies suggest that probiotics (i.e., Lactobacilli or Bifidobacteria), prebiotics (i.e., fructooligosaccharides or fructans) or their combination (synbiotics) modulate the host immunological resistance against intestinal inflammatory diseases and provide protective effects against colon cancer development (Roller et al., 2004; Nishino et al., 2004; Pool-Zobel and Sauer, 2007). Probiotics are viable microbial dietary supplements considered beneficial to human health through their physiological effects in the colon (Yan and Polk, 2010). In laboratory studies, probiotics have shown antimutagenic/anticarcinogenic properties in colon carcinogenesis models (Pool-Zobel et al., 1996; Horie et al., 2003; Park et al., 2007). In addition, prebiotics are non-digestible food carbohydrates that selectively stimulate the growth of probiotics and increase the beneficial effects of these microorganisms in the colon (Van Loo et al., 1999; Roberfroid, 2000; Roberfroid et al, 2010).

Several rodent studies have shown that prebiotics, probiotics and their combination (synbiotics) provide protective effects against early biomarkers and tumor development in the colon of carcinogen-treated rats (Reddy et al., 1997; Reddy, 1998; Pool-Zobel et al., 2002; Verghese et al., 2002; Pool-Zobel and Sauer, 2007). Importantly, the prebiotics and the probiotics survive and transit through the human and rodent gastrointestinal tract (Femia et al., 2002; Roberfroid et al, 2010; Yan and Polk, 2010). In special, the fermentation of inulin-type fructans by gut flora produce short chain fatty acids (SCFA), of which butyrate has been shown to have various biological properties against rat colon carcinogenesis (Pool-Zobel and Sauer, 2007). Yacon root saccharides, particularly β -D-fructooligosaccharides appear to be a good candidate as a prebiotic supplement (Valentová et al., 2006). In addition, *Lactobacillus acidophilus* NRRL-1910, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, and

Bifidobacterium bifidum ATCC 15696 were able to ferment yacon root fructooligosaccharides under anaerobic conditions (Pedreschi et al., 2003). Thus, the protective action of yacon root intake against rat colon carcinogenesis may be associated with the great content of fructooligosaccharides contained in the dried extract used in our study.

Dietary administration of prebiotics, alone or in combination with probiotics, reduced the development of ACF and/or colonic tumors in rats initiated with specific carcinogens (Gallaher and Khil, 1999; Femia et al., 2002; Dias et al., 2010). In general, synbiotic treatment is more beneficial for reducing colon carcinogenesis than the treatments with probiotics or prebiotics alone in isolation (Gallaher and Khil, 1999; Femia et al., 2002; Klinder et al., 2004). In the present study, dietary synbiotic formulation administered during the post-initiation stage of DMH-induced colon carcinogenesis significantly reduced the development of large ACF (> 9AC), dysplastic ACF and invasive colonic tumor similar to the 1.0% yacon root oral treatment. However, our data based in survival rate and tumor size and multiplicity indicate that the synbiotic formulation containing 1.0% dried extract of yacon root demonstrated a better efficacy for colon prevention.

β -catenin is a structural protein encoded by CTNNB1 gene, that acts as a component of the cadherin-mediated cell-cell adhesion complex and as a transcriptional activator mediating *Wnt* signal transduction of immediate genes targets, including cell proliferation genes (Tarapore et al. 2011). Free β -catenin in the cytoplasm binds to the glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 β)-axin-adenomatous polyposis coli (APC) protein complex and it is phosphorylated by GSK-3 β occurring their proteasome-mediated degradation (26S proteasome) (Barkers and Clevers, 2007). Nuclear β -catenin active transcription factors such as T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) where it serves as a transcription regulator for several genes which regulates tumor progression and invasion. β -catenin mutations that results in their stabilization and aberrant expression is frequently detected in carcinogens-induced colon tumors in rats and mice (Ochiai et al., 2003; Hata et al., 2004; Takahashi and Wakabayashi,

2004) and human colon cancer (Hao, et al, 2000) suggesting that alterations of β -catenin are early events in rodent and human colorectal carcinogenesis. Altered cytoplasmatic and nuclear staining of β -catenin is frequently observed in rodent colon adenocarcinomas (Ochiai et al., 2003; Hata et al., 2004; Takahashi and Wakabayashi, 2004). Some chemopreventive agents such as pterostilbene and sphingolipids are effective in reducing the abundance of β -catenin expression (Simon et al., 2009; Paul et al., 2010). The findings the present study indicate that the oral treatment with 1.0% yacon root or their symbiotic formulation was effective in reducing the abundance of β -catenin in the cytoplasm and to some extent in the nucleus of tumor epithelial cells and consequently reducing cell proliferation as demonstrated by lowered PCNA labeling indexes.

In conclusion, the findings this present investigation suggest that yacon root intake may have potential as chemopreventive agent against colon carcinogenesis. The underlying mechanisms of chemoprevention of colon carcinogenesis by yacon root still must be investigated.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP grants. Nelci A de Moura, Brunno F.R. Caetano and Luis F Barbisan were recipients of fellowships from FAPESP (2009/12239-2, 2011/01126-2) and CNPq (301585/2009-1) respectively.

5. References

- Barker N., Clevers H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 25, 1003-7.
- Bird R.P., Good C.K., 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* 112, 395-402.

- Charalampopoulos D., Rastall R. A., 2012. Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotechnol.* In press.
- Cheng L., Lai M. D., 2003. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 9, 2642-9.
- De Flora S., Ferguson L. R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 591, 8-15.
- Dias M. C., Vieirals N. F., Gomes M. I., Salvadori D. M., Rodrigues M. A., Barbisan L. F., 2010. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology.* 48, 772-780.
- Dias M. C., Spinardi-Barbisan A. L., Rodrigues M. A., de Camargo J. L., Terán E., Barbisan L. F., 2007. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Food Chem Toxicol.* 44, 877-84.
- DuPont A. W., DuPont H. L., 2011. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16, 523-31.
- Erdelyi I., Levenkova N., Lin E. Y., Pinto J. T., Lipkin M., Quimby F.W., Holt P. R., 2009. Western-style diets induce oxidative stress and dysregulate immune responses in the colon in a mouse model of sporadic colon cancer. *J Nutr.* 139, 2072-8.
- Femia A. P., Luceri C., Dolara P., Giannini A., Biggeri A., Salvadori M., Clune Y., Collins K. J., Paglierani M., Caderni G., 2002. 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.* 23,1953-60.
- Femia A. P., Dolara P., Caderni G., 2003. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 25, 277-81.
- Gallaher D. D., Khil J., 1999. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J Nutr.* 129, 1483S-7.
- Genta S., Cabrera W., Habib N., Pons J., Carillo I. M., Grau A., Sánchez S., 2009. Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clin Nutr.* 28, 182-7.
- Geyer M., Manrique I., Degen L., Beglinger C., 2008. Effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on colonic transit time in healthy volunteers. *Digestion.* 78, 30-3.
- Gupta A. K., Schoen R. E., 2009. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of coloncarcinogenesis in humans? *Curr Opin Gastroenterol.* 25, 59-65.

- Hamilton S. R., Aaltonen L. A., 2000. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC.
- Hao X. P., Pretlow T. G., Rao J. S., Pretlow T. P., 2001. Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 15, 8085-8.
- Hata K., Yamada Y., Kuno T., Hirose Y., Hara A., Qiang S. H., Mori H., 2004. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.* 95, 316-20.
- Havenaar R., 2011. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Benef Microbes.* 2, 103-14.
- Horie H., Zeisig M., Hirayama K., Midtvedt T., Möller L., Rafter J., 2003. Probiotic mixture decreases DNA adduct formation in colonic epithelium induced by the food mutagen 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole in a human-flora associated mouse model. *Eur J Cancer Prev.* 12,101-7.
- Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E., Forman D., 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.*, 61, 69-90.
- Joo, M., Shahsafaie, A., Odze, R.D., 2009. Paneth cell differentiation in colonic epithelial neoplasms: evidence for the role of APC/b-catenin/Tcf pathway. *Human Pathology* 40, 872–880.
- Kelly, G., 2008. Inulin-Type Prebiotics – a review: part 1. *Altern Med Rev.* 13, 315-29.
- Khan N., Afaq F., Mukhtar H., 2010. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Letters*, 293, 133–143.
- Khare S., Chaudhary K., Bissonnette M., Carroll R., 2009. Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. *Methods Mol Biol.* 472, 373-86.
- Kim M. C., Kim C.S., Chung T. H., Park H. O., Yoo C.I., 2011. Metabolic syndrome, lifestyle risk factors, and distal colon adenoma: a retrospective cohort study. *World J Gastroenterol.* 17, 4031-7.
- Kim M. Smits, Gerrit A. Meijer, and James G. Herman., 2011. Colorectal Cancer Epigenetics: Complex Simplicity Manon van Engeland, Sarah Derks, *Journal of Clinical Oncology* , 29.
- Klinder A., Förster A., Caderni G., Femia A. P., Pool-Zobel B. L., 2004. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer.* 49, 144-55.

- Mori H, Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hara A. 2005. Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact. Review.* 155,1-9.
- Namasivayam, N., 2011. Chemoprevention in experimental animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1215, 60–71.
- Nishino N., Wada H., Yoshida M., Shiota H., 2004. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J Dairy Sci.* 87, 2563-70.
- Pedreschi R., Campos D., Noratto G., Chirinos R., Cisneros-Zevallos L., 2003. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *J Agric Food Chem.* 51, 5278-84.
- Poulsen M., Mortensen A., Binderup M. L., Langkilde S., Markowski J., Dragsted L. O., 2011. The effect of apple feeding on markers of colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 63, 402-9.
- Raju J., 2008. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol.* 21, 6632-5.
- Roberfroid M., Slavin J., 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 4, 461-80.
- Roberfroid, M. B., Delzenne, N. M., 1998. Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 117-43.
- Suehiro Y., Hinoda Y., 2008. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci.* 99, 1071-6.
- Takahashi, M., Wakabayashi, K., 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95, 475–480.
- Tanaka, T., 2009. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog.* 8, 5.
- Tarapore R. S., Siddiqui I. A., Mukhtar H., 2011. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis*, In press.
- Valentová K., Lebeda A., Dolezalová I., Jirovský D., Simonovska B., Vovk I., Kosina P., Gasmanová N., Dziechciarková M., Ulrichová J., 2006. The biological and chemical variability of yacon. *J Agric Food Chem.* 22; 1347-52.
- Vilhena, S. M. C., Câmara, F. L., Kadihara, S.T., 2000. O cultivo do yacon no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 18, 5-8.
- Watson A.J., Collins P.D., 2011. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis.* 29, 222-8.
- Yoshimi N., Morioka T., Kinjo T., Inamine M., Kaneshiro T., Shimizu T., Suzui M., Yamada Y., Mori H., 2004. Histological and immunohistochemical observations of mucin-

depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. Cancer Sci. 95, 792-7.

Zardini, E., 1991. Ethnobotanical notes of yacon, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). Economic Botany, 45,72-85.

Legend for Figures

Figure 1- A) Kaplan-Meier analysis of animal survival in the different groups during experimental design. B) Data from tumor size (cm³) of macroscopically detected in the colon of DMH-treated animals.

G1= DMH-treated and fed with basal diet, G2= DMH-treated and fed with basal diet containing 0.5% yacon, G3= DMH-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon; G4= DMH-treated and fed with basal diet containing synbiotic formulation (*L. casei* at 2.5×10^{10} UFC/kg basal diet *plus* 1.0% yacon), G5= Vehicle-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon, G6= Untreated. DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x 40mg/kg b.wt., s.c.); yacon = 0.5% or 1.0% dried extract of root yacon in the basal diet for 13 weeks.

Figure 2- A-B) Topographic view of classical ACF in a methylene blue-stained colon whole mount containing eight and fourteen aberrant crypts, respectively (20x objective). C-D) Nondysplastic and dysplastic ACF detected in HE-stained Swiss-rolling sections, respectively (20x objective). E) Microscopic details from one HE-stained colonic adenocarcinoma (40x objective). F) Altered β -catenin expression into cytoplasm and nucleus from colonic adenocarcinoma (40x objective).

Figure 3- A-B) “Normal-appearing” crypt and tumor immunoreactivity for PCNA (arrows, 40x objective), respectively. C) PCNA labeling indexes for “normal-appearing” crypt and colon tumor in the different groups. G1= DMH-treated and fed with basal diet, G2= DMH-treated and fed with basal diet containing 0.5% yacon, G3= DMH-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon; G4= DMH-treated and fed with basal diet containing synbiotic formulation (*L. casei* at 2.5×10^{10} CFU/kg basal diet *plus* 1.0% yacon), G5= Vehicle-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon, G6= Untreated. DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x

40mg/kg b.wt., s.c.); yacon = 0.5% or 1.0% dried extract of root yacon in the basal diet for 13 weeks.

* Different from G1 group, $p < 0.001$, $p = 0.039$, colonic crypt and tumor, respectively.

Figure 4- A-B) “Normal-appearing” crypt and tumor immunoreactivity for cleaved caspase-3 (arrows, 40x objective), respectively. C) Apoptosis indexes for “normal-appearing” crypt and colon tumor in the different groups. G1= DMH-treated and fed with basal diet, G2= DMH-treated and fed with basal diet containing 0.5% yacon, G3= DMH-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon; G4= DMH-treated and fed with basal diet containing synbiotic formulation (*L. casei* at 2.5×10^{10} CFU/kg basal diet *plus* 1.0% yacon), G5= Vehicle-treated and fed with basal diet containing 1.0% yacon, G6= Untreated. DMH = 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x 40mg/kg b.wt., s.c.); yacon = 0.5% or 1.0% dried extract of root yacon in the basal diet for 13 weeks.

Table 1- Effects of dietary yacon on general, relative weight organs and biochemical parameters in DMH-initiated and non-initiated groups¹.

Parameters	Group/ Treatment ²						
	DMH-initiated			Non-initiated			
	(G1) Untreated 12/08 ³	(G2) Yacon 0.5% (G3) 12/08	Yacon 1.0% 12/10	(G4) Syn 12/12	(G5) 1.0% yacon 05/05	Untreated 05/05	(G6) Untreated 05/05
<i>General data</i>							
Final body weight (g)	388.0 ± 18.27	401.37 ± 10.55	401.70 ± 11.02	422.0 ± 12.70	479.0 ± 13.25 ^{*b}	452.6 ± 13.84	
Body-weight gain (g)	78.0 ± 17.04	99.29 ± 10.70	95.22 ± 16.50	91.92 ± 7.72	104.80 ± 6.35	79.40 ± 2.31	
Food consumption (g/rat/day) ⁴	25.53 ± 0.61	23.62 ± 0.83	23.89 ± 0.84	24.37 ± 0.71	23.22 ± 0.76	24.52 ± 1.14	
Yacon consumption (mg/rat/day)	0	125.16 ± 4.06	252.97 ± 8.09	254.86 ± 7.44	243.05 ± 8.97	0	
<i>Relative weight organs (%)</i>							
Liver	2.86 ± 0.17 ^a	2.42 ± 0.10	2.56 ± 0.11	2.37 ± 0.11*	2.42 ± 0.12	2.59 ± 0.12	
Right kidney	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01	
Left kidney	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	
<i>Biochemical data</i>							
Glucose (mg/dL)	111.85 ± 7.84	104.06 ± 11.35	106.72 ± 4.91	102.01 ± 7.55	112.94 ± 7.04	114.60 ± 17.21	
Triglycerides (mg/dL)	68.94 ± 3.32	60.10 ± 5.18	66.54 ± 6.19	66.10 ± 4.77	69.80 ± 6.07	62.50 ± 6.49	
Cholesterol (mg/dL)	68.00 ± 2.86	64.33 ± 2.98	64.28 ± 3.27	61.87 ± 1.94	74.79 ± 2.73	78.18 ± 5.28	

¹ Values are mean ± SE; ² DMH = 1,2 dimethylhydrazine (4 x 40mg/kg b.wt., s.c.); Yacon = 0.5% or 1.0% of yacon root extract in the basal diet for 14 weeks; Syn= Synbiotic (*L. casei* at 2.5 x 10¹⁰ FCU/kg basal diet *plus* 1.0% yacon). ³ Initial and final number of animals * Different from G1 group, 0.04 < p < 0.03.

Table 2- Effects of dietary yacon on development of colonic aberrant crypt foci (ACF) in colon whole mount methylene blue stained¹.

Group/Treatment ²	Number of rats ³	Number of ACF			Total number		
		1-3 crypt	4-9 crypts	>9 crypts	AC ⁴	ACF	AC/ACF
<i>DMH-initiated</i>							
(G1) Untreated	12/8	30.78 ± 4.79	15.33 ± 4.47	1.89 ± 0.48	304.26 ± 51.27	91.63 ± 11.58	3.25± 0.31
(G2) 0.5% yacon	12/8	23.62 ± 5.60	6.37 ± 1.53	0.25 ± 0.25*	153.82 ± 32.44	62.73 ± 11.85	2.40± 0.33
(G3) 1.0% yacon	12/10	22.60 ± 5.90	4.10 ± 1.00*	0.30 ± 0.15*	110.04 ± 19.41*	52.82 ± 12.10*	2.19± 0.24*
(G4) Syn	12/12	16.08 ± 2.90	3.17 ± 0.90*	0.33± 0.26*	103.04 ± 22.08*	51.11 ± 10.03*	1.79± 0.20*,**
<i>Non-initiated</i>							
(G5) 1.0% yacon	5/5	0	0	0	0	0	0
(G6) Untreated	5/5	0	0	0	0	0	0

¹Values are mean ± SE; ²DMH= 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4x 40mg/kg b.wt., s.c.); Yacon= 0.5% and 1.0% of root yacon extract in the basal diet for 14 weeks; Syn= Synbiotic (L. casei at 2.5 x 10¹⁰ UFC/kg basal diet plus 1% yacon); ³ Initial and final number of animals;

⁴AC= aberrant crypt. *, ** Different from G1 group and G2 groups, respectively, 0.05 < p < 0.001.

Table 3 - Effects of dietary yacon on development of histologically detected dysplastic ACF (incidence) and colon tumors (incidence and multiplicity) in colonic HE-sections staining.

Group/Treatment ¹	Number of rats ²	Displastic ACF ³ (%)	Tumor (%)	Multiplicity ⁴			Tumor volume ⁴ (cm ³)
				Invasive	Non-invasive	Total	
<i>DMH-initiated</i>							
(G1) Untreated	12/10	10 (100)	7 (70)	4.1 ± 1.2	1.5 ± 0.5	5.0 ± 1.4 (38) ⁵	0.61 ± 0.14
(G2) 0.5% yacon	12/8	5 (63)	8 (100)	2.2 ± 0.6	1.5 ± 0.3	3.4 ± 0.4 (27)	0.32 ± 0.12
(G3) 1.0% yacon	12/11	5 (45)*	7 (64)	1.3 ± 0.7*	0.8 ± 0.6	2.9 ± 1.3 (20)	0.27 ± 0.06
(G4) Syn	12/12	3 (25)*	9 (75)	1.2 ± 0.2*	0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2*(16)	0.22 ± 0.10
<i>Non-initiated</i>							
(G5) 1.0% yacon	5/5	0	0	0	0	0	0
(G6) Untreated	5/5	0	0	0	0	0	0

¹DMH= 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride (4 x 40mg/kg b.wt., s.c.); yacon = 0.5% and 1.0% of dried extract of root yacon in the basal diet for 14 weeks; Syn= Synbiotic (*L. casei* at 2.5 x 10¹⁰ CFU/kg basal diet plus 1% yacon); ² Initial and final number of animals; ³ACF= Aberrant crypt foci; ⁴Values are mean ± SE; ⁵Total number of colon tumors. *, ** Different from G1 group and G1 and G2 groups, respectively, 0.02 < p < 0.001.

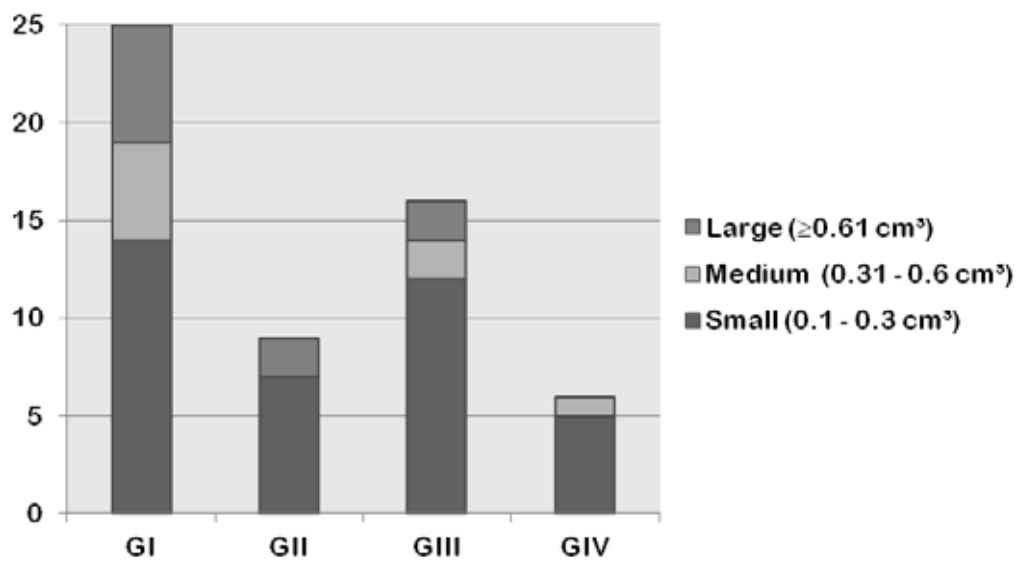
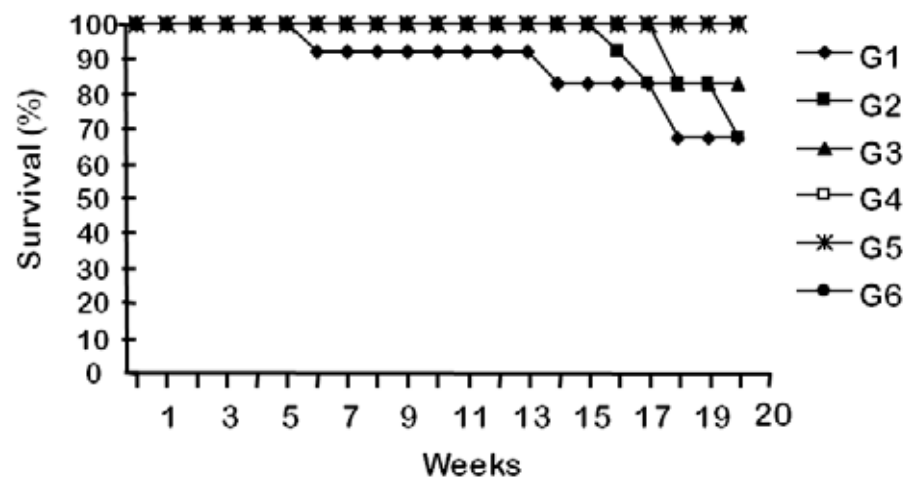


Figura 1

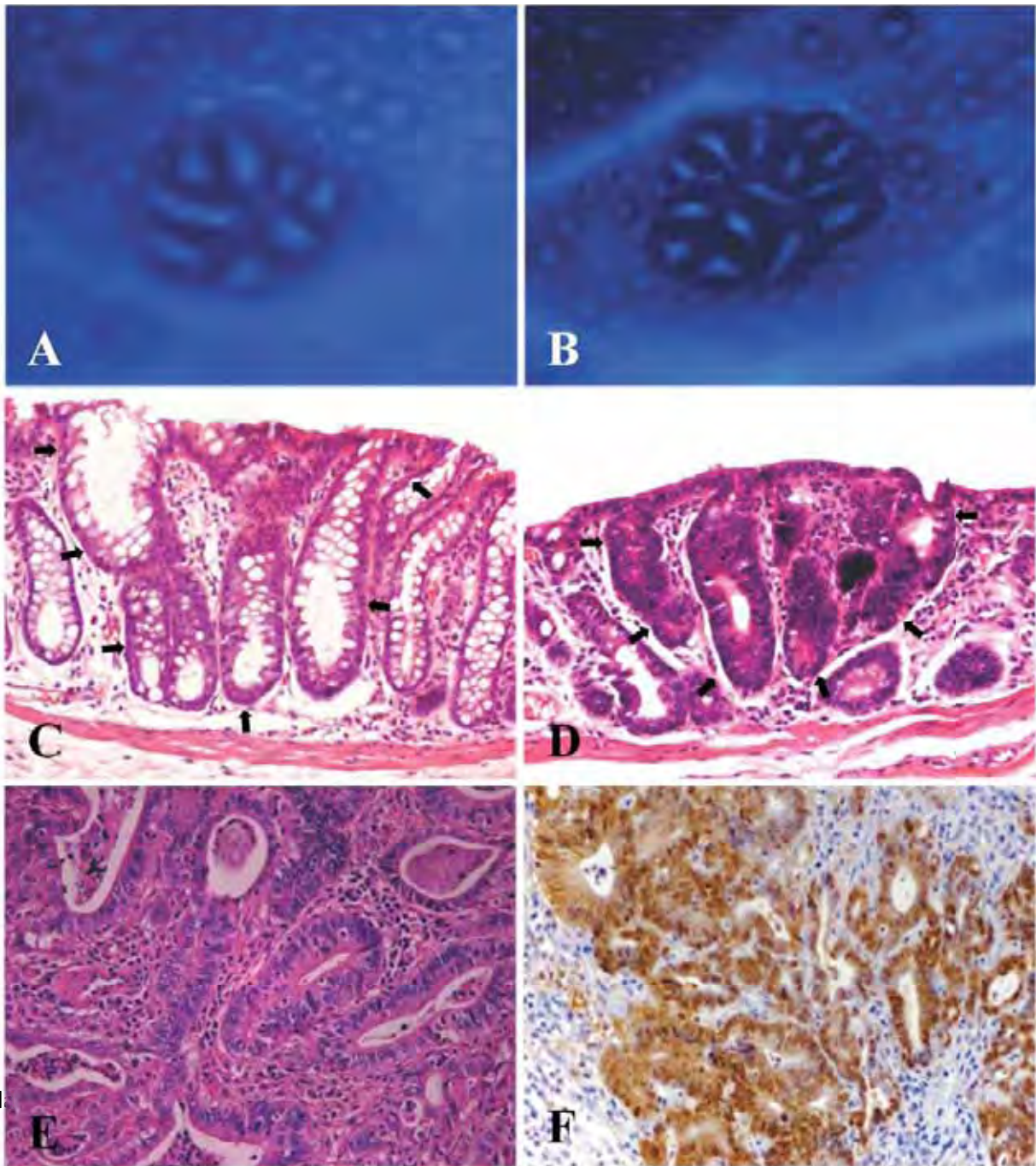


Figure 2

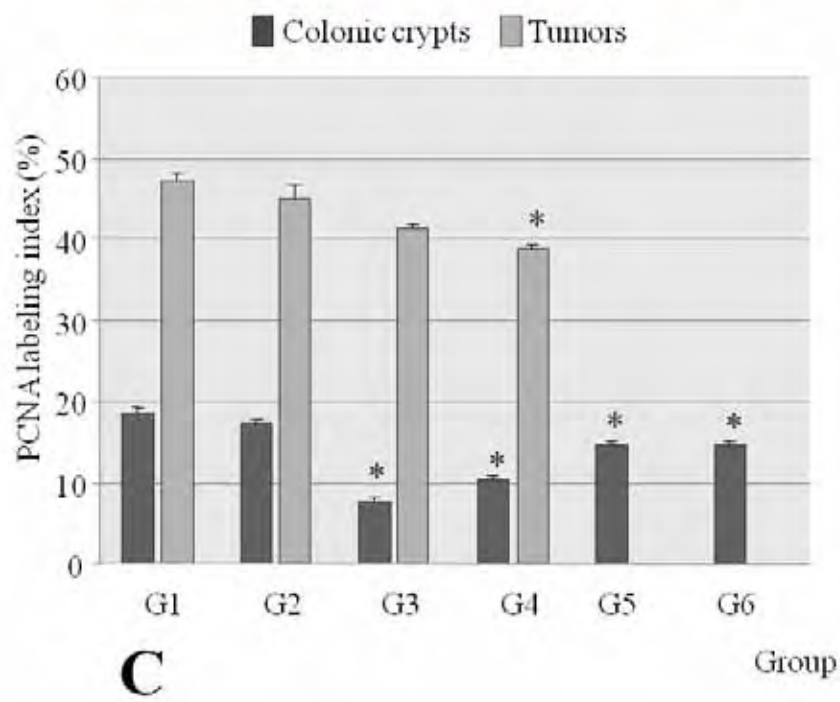
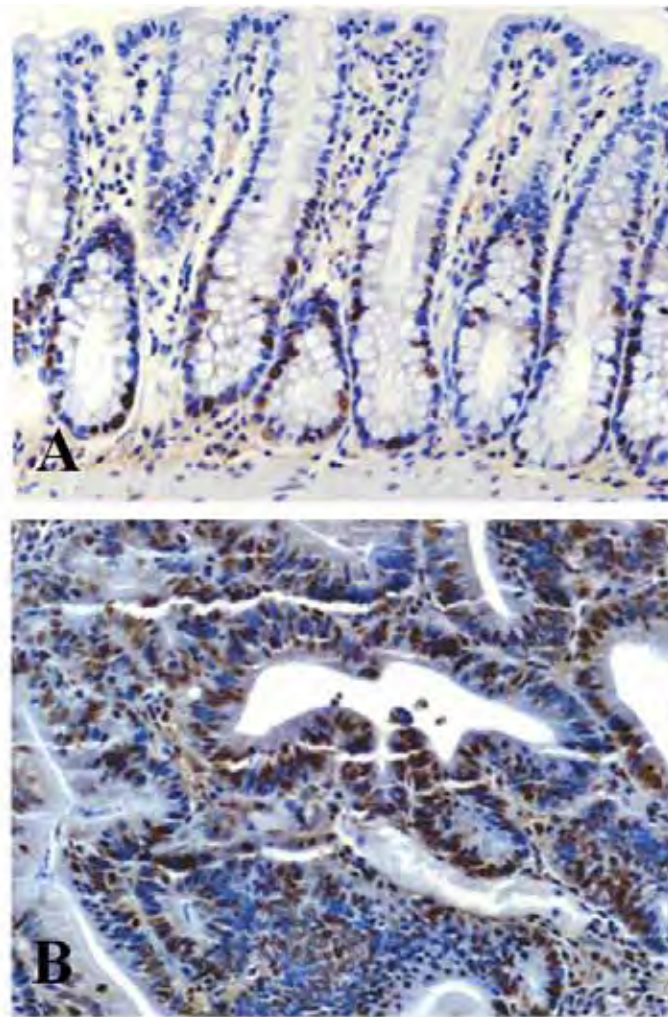


Figure 3

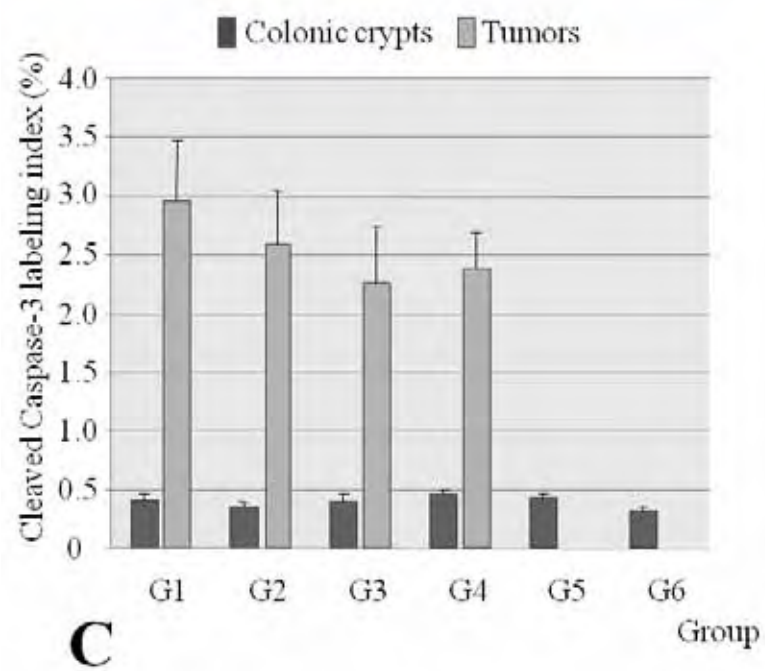
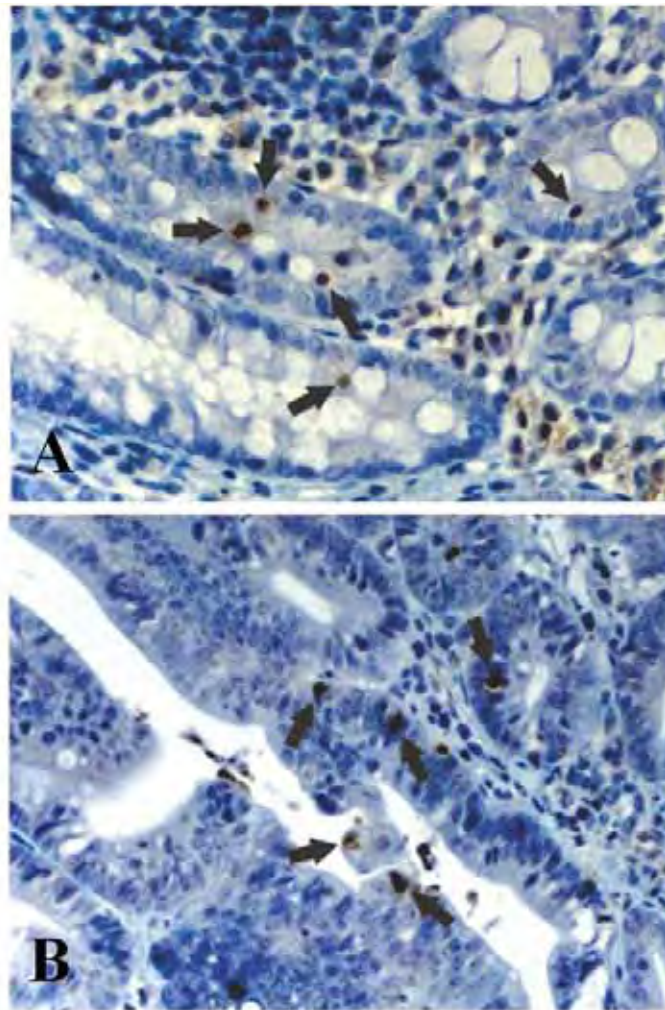


Figure 4

Anexo 1

1. Preparo do extrato seco de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*).

O extrato seco de Yacon foi preparado no Laboratório de Processamento do Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT) da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Botucatu. As raízes de yacon foram fornecidas por um produtor da cidade de Capão Bonito – SP e, imediatamente, processadas, para que não ocorresse degradação de seus compostos. Elas foram higienizadas, cortadas em fatias finas e adicionadas em um reator de aço inoxidável R.A.B. Ranazzi e Cia Ltda (Fig. 1 A), com água potável previamente aquecida a 90 °C onde permaneceu em agitação por 10 minutos; após esse tempo as raízes foram removidas e o líquido foi descartado.



Fig. 1 (A) Reator com raízes de yacon, (B) Filtro a vácuo.

Em seguida as raízes foram trituradas em liquidificador industrial por 1 min., a polpa foi passada em tela de inox sendo posteriormente retornada ao reator permanecendo sob agitação por 10 min. à temperatura de 90 °C. Após esse tempo a polpa recebeu carvão ativado adquirido da empresa CARBOMAF 346-5 e terra diatomácea da marca DIATOMITA CIEMIL tipo CA/150 e CA/500 permanecendo em agitação por 24 horas sem aquecimento, o filtrado foi coletado, adicionado 0,5% de ácido cítrico e estocado sob refrigeração por 24 h. Após esse tempo realizou-se um novo processo de filtração a vácuo (fig. 1 B) e armazenado sob refrigeração.

A secagem foi feita em secador por aspersão, “*spray-drier*”, inoxidável fabricado pela A.B Ranazzi e Cia Ltda (Fig. 2). Para auxiliar a secagem foi acrescentado ao filtrado 5% de maltodextrina de mandioca produzida no CERAT. O extrato seco foi armazenado em pote hermeticamente fechado e protegido da luz até o momento do uso no preparo das dietas.



Fig. 2. Secador do tipo *Spray Dryer*.

2. Dosagem dos carboidratos do extrato seco de Yacon

A determinação dos perfis de açúcares do extrato foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com cromatográfico da marca VARIAN, modelo PRO STAR, com duas bombas binárias, injetor automático (AUTO SAMPLER 410) e colunas BIORAD HPX- 42 A com detector de IR (índice de refração). A fase móvel foi de água deionizada e filtrada em membrana PVDF 0,22 μm com 40 mm de diâmetro da marca MILLIPORE a um fluxo de 0,42 cm. minuto⁻¹, a temperatura da coluna foi de 85 °C (Fig.. 3).

