



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

(Ciência dos Alimentos)

**AVALIAÇÃO DO ECOSISTEMA MICROBIANO DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON APÓS O
CONSUMO DE *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 E EXTRATO AQUOSO
DE YACON**

CAMILLA MARTINS AVI

ARARAQUARA - SP

2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
CÂMPUS DE ARARAQUARA



**AVALIAÇÃO DO ECOSSISTEMA MICROBIANO DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON APÓS O
CONSUMO DE *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 E EXTRATO AQUOSO
DE YACON**

CAMILLA MARTINS AVI

Orientadora: Profa. Dra. KATIA SIVIERI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

ARARAQUARA

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A957a Avi, Camilla Martins
Avaliação do ecossistema microbiano de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de cólon após o consumo de *Lactobacillus Acidophilus* CRL 1014 e extrato aquoso de Yacon / Camilla Martins Avi. – Araraquara, 2014
89 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Katia Sivieri

1. Probiótico. 2. Prebiótico. 3. Simbiótico. 4. Câncer De Cólon. 5. Microbiota Intestinal.
I. Sivieri, Katia, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Camilla Martins Avi

**AVALIAÇÃO DO ECOSISTEMA MICROBIANO DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À CARCINOGENÊSE QUÍMICA DE CÓLON APÓS O
CONSUMO DE *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 E EXTRATO AQUOSO
DE YACON**

Orientadora: Profa. Dra. Katia Sivieri

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Claudio e Ana Carla, que mais uma vez me apoiaram e estiveram ao meu lado durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos recebidas, e por estar comigo em todos os momentos;

À minha família, por ser presente e por me apoiar nos momentos em que mais precisei;

À Prof^ª. Dra. Katia Sivieri, por acreditar no meu trabalho, por toda sua dedicação, carinho, paciência e orientação.

À prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini e Dra. Raquel Bedani pelas sugestões ao projeto e toda atenção dada;

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela experiência concedida durante o curso de Mestrado;

À Dra. Maria Angêla Tallarico Adorno e Dra. Izabel Kimiko Sakamoto, por me receber tão bem, pela ajuda, paciência e dedicação às análises realizadas;

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Probiótico (LPP), Roseli Aparecida Pinto e Joseane Canaã, pela amizade e companheirismo;

À família do LPP, meu muito obrigada por todos os momentos, troca de conhecimentos, ajuda e companheirismo;

À amiga, Ana Paula Silva Almeida, minha companheira de protocolo experimental. Obrigada pela paciência, ajuda e por fazer essa fase ser tão prazerosa. Você é especial!

À amiga, Mariana Nougalli Roselino. Obrigada pela parceria, por toda ajuda, companheirismo, amizade, carinho, enfim, sou muito grata à você!

À querida, Fernanda Bianchi. Obrigada pela ajuda durante o mestrado, pela paciência e sua amizade.

Às minhas amigas Heloisa Pinotti, Camila Motta Grubert, Gabriela Cristina dos Santos e Marina Dantas Levy que compreenderam a minha ausência e que acima de tudo, me apoiaram e estiveram comigo quando sempre precisei.

Às amigas e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela troca de conhecimentos e amizade;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR- UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pelo auxílio concedido;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa no início do mestrado;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado;

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho. Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA à cada um de vocês.

*“A vida sem ciência é uma espécie de
morte”*

Sócrates.

RESUMO

O câncer de cólon é um dos tipos de cânceres mais prevalentes e, sua etiologia pode estar relacionada à fatores genéticos, ambientais e tipo de dieta. Por isso, o setor de alimentos investe cada vez mais no desenvolvimento de alimentos funcionais e entre esses, se destacam as bactérias probióticas e ingredientes prebióticos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do consumo de probiótico (*Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) e prebiótico (extrato de yacon) sobre a microbiota intestinal de animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon. Foram utilizados 175 ratos machos Wistar divididos aleatoriamente em cinco tratamentos: Tratamento I-GCN: animais controle negativo (animais sadios que consumiram apenas a ração comercial); Tratamento II-GCP: animais controle positivo (induzidos quimicamente ao câncer de cólon e que consumiram apenas a ração comercial); Tratamento III-GPRO: (induzidos quimicamente ao câncer de cólon e que consumiram ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014); Tratamento IV-GPRE: (induzidos quimicamente ao câncer de cólon e que consumiram ração comercial + yacon); Tratamento V-GS: (induzidos quimicamente ao câncer de cólon e que consumiram ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014+ yacon). Os animais induzidos foram inoculados semanalmente com 1,2 dimetilhidrazina durante 2 semanas, sendo 2 induções semanais na concentração de 40mg/kg de peso. O *L. acidophilus* CRL 1014, na concentração de 10⁹UFC/mL foi administrado aos animais na quantidade de 3 ml/kg de peso/dia, já o extrato aquoso de yacon foi administrado na quantidade de 10% de FOS/ração. Foram realizadas análises microbiológicas dos gêneros *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, Enterobactérias, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, aeróbios facultativos e aeróbios totais por método convencional. Foi realizada a análise de PCR- DGGE para o gênero *Lactobacillus spp.*, além da produção de ácidos graxos de cadeia curta, íons de amônia e pH fecal. Para a microbiota fecal foi observado que para o gênero *Enterococcus spp.*, no final do protocolo experimental, os grupos tratados apresentaram contagem superior aos controles. Para as Enterobactérias e *Bacteroides spp.*, o GCP foi o que apresentou as maiores contagens. Em relação às bactérias comensais, houve aumento de *Lactobacillus spp.* para GPRO e aumento de *Bifidobacterium ssp.* para GPRE e GS. Todos os grupos aumentaram a contagem de anaeróbios facultativos, e, GPRO foi o único grupo que reduziu a população de aeróbios totais e *Clostridium ssp.*, no final do protocolo experimental de 8 meses. Já para análise do ecossistema microbiano, através da PCR-DGGE, o agrupamento apresentado no dendograma separou o tempo inicial dos demais. Através da análise de riqueza, pôde-se observar que GPRO e GPRE apresentaram maior enriquecimento na população de *Lactobacillus spp.* durante os tempos intermediário e final. Com relação à produção de íons de amônia, os grupos tratados (GPRO, GPRE e GS) apresentaram valores inferiores ao grupo controle positivo (GCP). Os grupos tratados (GPRO, GPRE e GS) tiveram valores de pH fecal inferiores aos grupos controles (GCN e GCP). Para o GPRO e o GPRE observou-se uma redução no valor de pH quando comparado com o tempo inicial. Em relação à produção de ácidos graxos de cadeia curta, o GPRO foi o único grupo que não reduziu sua produção no final do protocolo, assim como, esse mesmo grupo, não reduziu a produção de acetato e, em valores absolutos, foi o grupo que apresentou maior produção de propionato e butirato. Todos os tratamentos avaliados, administração de *L. acidophilus* CRL 1014, extrato de yacon ou *L. acidophilus* CRL 1014 + extrato de yacon, aos animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon mostraram resultados positivos. Entretanto, os animais que consumiram diariamente o *L. acidophilus* CRL 1014 apresentaram melhores resultados em relação à população de *Lactobacillus spp.* verificado com métodos dependente e independente de cultivo, redução de pH fecal e produção de ácidos graxos de cadeia curta (totais, acético, propiônico e butírico) durante todo o protocolo experimental.

Palavras-chave: probiótico, prebiótico, simbiótico, câncer de cólon, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Colon cancer is one of the most prevalent types of cancer, and its etiology may be related to genetic, environmental factors and type of diet. Therefore, the food industry invests in the development of functional foods, such as probiotic bacteria and prebiotic ingredients. This research was evaluate the effects of consumption of probiotic (*Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) and prebiotic (yacon extract) on the gut microbiota on 1.2 dimethylhydrazine (DMH) induced colon carcinogenesis in Wistar rats. The animals were randomly allocated into five groups (n=35): Treatment I-GCN: negative control animals (healthy animals + commercial feed); Treatment II-GCP: positive control animals (DMH induced + commercial feed); Treatment III-GPRO: (DMH induced + commercial feed + *L. acidophilus* CRL 1014); Treatment IV-GPRE: (DMH induced + commercial feed + yacon); Treatment V-GS: (DMH induced + commercial feed + *L. acidophilus* CRL 1014+ yacon). The induced animals were inoculated with DMH twice weekly for 2 weeks at a concentration of 40mg/kg weight. The probiotic, *L. acidophilus* CRL 1014 was administered in 10⁹CFU/mL (3 ml/kg body weight) and the yacon extract (10% FOS/feed),once daily. Microbiological analysis of *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobacteriaceae, *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., total aerobes and facultative anaerobes were performed by plate count. Analysis of PCR-DGGE for the lactobacilli community, short-chain fatty acids (SCFA) production, ammonium ions and fecal pH were performed. The viable counts showed that the *Enterococcus* spp., at the end of the experimental protocol, the treated groups showed higher than controls count. The counts of Enterobacteriaceae and *Bacteroides* spp., were higher to GCP. There was an increase of *Lactobacillus* spp. for GPRO and *Bifidobacterium* spp. for GPRE and GS. All groups increased counts facultative anaerobes, and GPRO was the only group that reduced total aerobes and *Clostridium* ssp. at the end of the experimental protocol of 8 months. As for analysis of microbial ecosystem by PCR-DGGE, the dendrogram separated the initial time of the other times, and by analysis of range-weighted richness can be seen that GPRO and GPRE showed higher enrichment in the population of *Lactobacillus* spp. during intermediate and late times. About ammonium ions production, the treated groups (GPRO, GPRE and GS) were lower than the positive control group (GCP) values. Treated groups (GPRO, GPRE and GS) also had fecal pH values lower than the control groups (GCN and GCP). For GPRO and GPRE there were observed a reduction in the pH value when compared to the initial time. About total SCFA production, GPRO was the only group that has not reduced production at the end of the protocol, as well as, the same group did not reduce the production of acetate and produced most propionate and butyrate. All the treatments (*L. acidophilus* CRL 1014, yacon extract or *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon extract) showed beneficial results on improving of gut microbiota. However, the animals that consumed daily *L. acidophilus* CRL 1014 showed better results in relation to a lactobacilli community (using dependent and independent methods), reduction of fecal pH and SCFA production (total, acetic, propionic and butyric) during throughout the experimental protocol.

Keywords: probiotic, prebiotic, symbiotic, colon cancer, gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1 DESIGN EXPERIMENTAL DO PROTOCOLO DE 8 MESES	47
FIGURA 2 DENDOGRAMA E PERCENTUAL DE SIMILARIDADE (%) ENTRE OS PERFIS DE BANDAS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS DOS GRUPOS EM ESTUDO	59
FIGURA 3 (A) NÍVEL DE RIQUEZA (RR) APRESENTADA PELOS GRUPOS QUE RECEBERAM TRATAMENTO DURANTE O PROTOCOLO EXPERIMENTAL (B) NÍVEL DE RIQUEZA (RR) APRESENTADA POR TODOS OS GRUPOS EXPERIMENTAIS DURANTE O PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	60
FIGURA 4 CURVA DE PARETO-LORENZ DOS DIFERENTES GRUPOS EM ESTUDO QUE RECEBERAM TRATAMENTO EM TEMPO INICIAL, INTERMEDIÁRIO E FINAL DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	62
FIGURA 5 COEFICIENTE DE GINI.....	63
FIGURA 6 (A) PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (MMOL/G) PARA OS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS EM TEMPO INICIAL, INTERMEDIÁRIO E FINAL DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL. (B) PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO (MMOL/G) PARA OS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS EM TEMPO INICIAL, INTERMEDIÁRIO E FINAL DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL. (C) PRODUÇÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO (MMOL/G) PARA OS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS EM TEMPO INICIAL, INTERMEDIÁRIO E FINAL DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL. (D) PRODUÇÃO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (MMOL/G) PARA OS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS EM TEMPO INICIAL, INTERMEDIÁRIO E FINAL DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	67
FIGURA 7 EFEITO DOS TRATAMENTOS APÓS 8 MESES DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL NOS ANIMAIS INDUZIDOS QUIMICAMENTE AO CÂNCER DE CÓLON SOB ANÁLISE DE PH, RIQUEZA (RR), CONTAGEM DE LACTOBACILLUS SPP (UFC/G), ÍONS DE AMÔNIA (PPM) E AGCC (MMOL/G).....	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 PESO CORPÓREO MÉDIO(G) DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO.	54
TABELA 2 POPULAÇÃO DOS PRINCIPAIS GÊNEROS BACTERIANOS (MÉDIA E DESVIO PADRÃO) (LOG UFC/G) ISOLADA DAS FEZES DOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS EM DIFERENTES PERÍODOS.	58
TABELA 3 VALORES DE ÍONS DE AMÔNIA (PPM) E PH, MÉDIA E DESVIO PADRÃO, PARA DIFERENTES GRUPOS, NO TEMPO INICIAL, TEMPO INTERMEDIÁRIO E APÓS 8 MESES DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	64

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 CÂNCER DE CÓLON	19
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL	21
2.3 PROBIÓTICOS	25
2.4 PREBIÓTICOS	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	31

CAPÍTULO II

EFEITO DO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CRL 1014 E EXTRATO DE YACON NA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS À CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON.....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
PREPARO DO PROBIÓTICO E PREBIÓTICO	45
ANIMAIS	45
DESIGN EXPERIMENTAL	46
ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO, PREBIÓTICO E SIMBIÓTICO	47
COLETA DAS FEZES	48
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	48
ANÁLISES DEPENDENTE DE CULTIVO	48
ANÁLISES INDEPENDENTE DE CULTIVO	49

ANÁLISE DO ECOSISTEMA MICROBIANO	49
ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS (DENDOGRAMAS)	50
ANÁLISE ECOLÓGICA DA POPULAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP.	51
ANÁLISE DE ÍONS DE AMÔNIA	52
DETERMINAÇÃO DO PH FECAL	53
ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA	53
ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
RESULTADOS	54
CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS	54
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO (FOS).....	54
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	55
ANÁLISES DEPENDENTE DE CULTIVO.....	55
ANÁLISES INDEPENDENTE DE CULTIVO	59
ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. POR PCR-DGGE.....	59
INTERPRETAÇÃO ECOLÓGICA (RIQUEZA E FUNCIONALIDADE) DA POPULAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP.	60
AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MICROBIANO	63
VALORES DE ÍONS DE AMÔNIA	63
VALORES DE PH.....	64
PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)	65
EFEITO DOS TRATAMENTOS APÓS 8 MESES DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL NOS ANIMAIS INDUZIDOS QUIMICAMENTE AO CÂNCER DE CÓLON.....	68
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CARTA DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	89

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

As estruturas governamentais têm mudado o foco nas políticas de saúde pública, contemplando e incentivando a prevenção de doenças, o que tem levado a um grande avanço no segmento da indústria de alimentos funcionais, em todas as partes do mundo. Estes alimentos têm um importante papel na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como as cardiopatias, a osteoporose e os diferentes tipos de câncer (ALLEN et al., 2004; GILL; GUARNER, 2004; CANANI et al., 2007; SIRÓ et al., 2008; CAMPOS; RODRIGUES NETO, 2009; GRANATO et al., 2010; CASTRO E SILVA; SÁ, 2012).

Dentre os alimentos funcionais que surgiram com a finalidade de exercer um efeito fisiológico além da função básica de nutrição, estão aqueles contendo bactérias lácticas (BL), em especial as bactérias probióticas, isoladas de diferentes ecossistemas (OLIVEIRA et al., 2002; BURITI; SAAD, 2007; SILVA, 2013).

Grandes quantidades de relatos científicos têm apontado para a capacidade das BL e dos ingredientes prebióticos de reduzirem ou retardarem o desenvolvimento do câncer de cólon. Várias hipóteses são apresentadas para explicar o provável mecanismo dessa ação desenvolvida por determinadas bactérias associadas à prebióticos. Dentre os mecanismos citados estão à redução de enzimas pró-carcinogênica, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), modulação do sistema imune e da microbiota intestinal (BRADY; GALLAHER; BUSTA, 2000; HIRAYAMA; RAFTER, 2000; RAFTER, 2003; SAIKALI et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2005; DE MORENO DE LEBLANC; PERDIGON, 2005, SIVIERI et al., 2011).

Estudos mostram que a administração diária de *Lactobacillus acidophilus* pode modificar a microbiota intestinal de animais, devido à adesão desse microrganismo na mucosa do cólon e, conseqüentemente, a redução de bactérias patogênicas, assim como, pode reduzir o número de

focos de criptas aberrantes (FCA), retardar o crescimento de tumor e, reduzir o tamanho do mesmo, quando já estabelecido em ratos induzidos quimicamente ao câncer de cólon (BOLOGNANI et al., 2001; URBANSKA et al., 2009; GIANOTTI et al., 2010; CHEN et al., 2012).

Assim como os probióticos, há evidências para as propriedades protetoras dos prebióticos relacionadas ao câncer de cólon, pois o consumo desses pode estar envolvido na prevenção de danos e mutações do DNA e na proliferação e/ou a atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (BURNS; ROWLAND, 2002; SAAD, 2006; BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

O yacon, conhecido cientificamente como *Smallanthus sonchifolius*, é uma raiz tuberosa originária das regiões andinas. É composto principalmente por água e carboidratos, sendo esses armazenados na forma de frutoligossacarídeos (FOS), que são prebióticos (SANTANA; CARDOSO, 2008; DELGADO et al., 2013).

A redução do risco de desenvolver câncer de cólon pode estar ligada ao consumo de yacon, pois estudos mostram que, a fermentação promovida pelas bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. pode reduzir o pH intestinal e reestabelecer o equilíbrio bacteriano na microbiota intestinal, aumentando a população de bactérias comensais. Além disso, o consumo de FOS aumenta a produção de AGCC, em especial o ácido butírico, que é considerado um agente protetor contra o câncer de cólon (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; DE MOURA et al., 2012; DELGADO et al., 2013).

Tem sido demonstrado que a associação entre os prebióticos e probióticos também traz consequências benéficas para o trato intestinal, uma vez que essa associação pode inibir o crescimento de bactérias putrefativas do cólon, modular o sistema imune, aumentar a produção de AGCC e proteger contra o câncer de cólon. (PEDRESCHI et al., 2003; ROBERFORID, et al., 2010; DE MOURA et al., 2012; DELGADO et al., 2013).

Nesse contexto, o estudo da administração diária de *L. acidophilus* CRL 1014, extrato aquoso de yacon e associação de ambos, em animais quimicamente induzidos ao câncer de cólon, torna-se interessante, no sentido que os resultados podem elucidar os possíveis efeitos e mecanismos de proteção ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE CÓLON

As transformações sociais e econômicas relacionadas à urbanização e industrialização no Brasil provocaram mudanças no perfil de morbimortalidade da população. Esse processo de mudança demográfica associada à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira (INCA, 2014).

As DCNT podem ocasionar cerca de 36 milhões de mortes anuais no mundo e, as principais doenças pertencentes a esse grupo são diabetes, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC) e câncer (WHO, 2011; MALTA; SILVA JR, 2013).

Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros, porém, há aproximadamente quatro décadas, essa situação sofre transformações, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (INCA, 2011).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. A Organização Mundial da Saúde estima que, no ano 2030 haja 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com doença (INCA, 2011; INCA, 2014).

O câncer de cólon retal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens, e em relação ao sexo feminino, essa neoplasia ocupa a segunda colocação. Presume-se que neste ano, no Brasil, ocorram 15.070 casos novos de câncer do cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres (INCA, 2014).

O desenvolvimento de vários tipos de câncer, inclusive o CCR é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais. Além disso, outros fatores como idade, prática de atividade física, consumo de bebida alcoólica, fumo, estado nutricional, presença de pólipos, história de câncer do próprio indivíduo e da família, casos de enterocolite ulcerativa e constipação intestinal crônica podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença (NEVES; MATTOS; KOIFMAN, 2005; INCA, 2008; INCA, 2014).

Outro fator envolvido na susceptibilidade do câncer de cólon é a composição da microbiota intestinal, uma vez que essa influencia as funções fisiológicas relacionadas ao risco de câncer, incluindo o controle da proliferação das células epiteliais, prevenção do aumento no número de microrganismos patogênicos, estimulação da imunidade do hospedeiro, entre outros (ZHU et al., 2011).

A maioria dos casos de câncer de cólon ocorre esporadicamente, sendo o tipo mais comum o adenocarcinoma, que se desenvolve a partir de células glandulares que cobrem a parede do intestino (HOPE et al., 2005). Os adenocarcinomas aumentam a partir do epitélio normal, através de um acúmulo de mutações que resulta na transformação maligna. A instabilidade genômica é fundamental para esse processo e está relacionada ao rearranjo de genes, perdas e ganhos de fragmentos de DNA, aneuploidias e perda de heterozigose (GRADY, 2004). Além disso, há inativação de genes supressores de tumor, tais como *APC*, *DCC*, *DPC4* e *p53*, juntamente com a ativação de oncogenes, dos quais a família dos genes *ras* são os mais bem descritos (HOPE et al., 2005).

Geralmente, o tumor de cólon é detectado pela primeira vez como um pólipó (massa de células projetadas da parede do cólon), embora seja possível detectar pequenas lesões afetando as criptas, chamadas de focos de criptas aberrantes (FCA) (HOPE et al., 2005), a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no cólon. Os FCA podem funcionar como um marcador pré-neoplásico no processo de carcinogênese (SAAD, 2006).

Os tumores podem aparecer em qualquer lugar no cólon, embora a maioria de CCR esporádicos esteja localizada no lado esquerdo do cólon distal (incluindo o reto e o sigmóide) (RABENECK; DAVILA; EL-SERAG, 2003). Evidências científicas têm mostrado que o risco de desenvolver câncer de cólon está relacionado com o alto consumo de gordura e carne vermelha e baixo consumo de fibras (COMMANE et al., 2005; ZANDONAI et al., 2012).

Um dos possíveis efeitos de uma dieta ocidental sobre o câncer de cólon relaciona-se ao aumento da excreção de ácidos biliares secundários. Além disso, a produção de amônia aumentada em ratos que consomem uma dieta rica em proteína também tem sido relacionada ao aumento do risco desse tipo de câncer em modelos animais (BARTRAM et al., 1993; MACBAIN; MACFARLANE, 1998). No entanto, o alto consumo de frutas, cereais, peixe e cálcio podem ser relacionados à redução do risco no desenvolvimento do câncer de cólon (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

O efeito da dieta sobre a carcinogênese pode ser mediado pela mudança da atividade metabólica e composição da microbiota intestinal (GUARNER; MALAGELADA, 2003). Diversos estudos tentam estabelecer relações entre bactérias e o câncer de cólon. Já se sabe que diversos metabólitos bacterianos são carcinogênicos, como por exemplo, os fecapentanos, as nitrosaminas, o fenol, o indol, as aminas, a amônia, entre outros (ZHU et al., 2011). Por outro lado, existem metabólitos bacterianos considerados benéficos, nos quais estão inclusos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, além de substâncias que impedem a colonização de microrganismos oportunistas e patogênicos (LIONG, 2007; PIMENTEL, 2011).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL

O termo microbiota intestinal refere-se ao ecossistema essencialmente bacteriano que reside normalmente nos intestinos dos organismos animais. No ser humano, sua composição

definitiva é obtida em torno dos dois anos de idade, acompanhando o ser humano pelo resto de sua vida, sob a influência dos alimentos, do estado clínico e das condições ambientais (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996; MATARESE, 2003).

A microbiota gastrointestinal humana tem influência significativa sobre a saúde e bem estar dos indivíduos. Diferentes níveis e grupos bacterianos são encontrados em todo o trato gastrintestinal (TGI), sendo estômago e intestino delgado as regiões com menor número de microrganismos, com aproximadamente 10^3 a 10^4 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g, devido à atividade germicida apresentada pelo ácido clorídrico e, o curto espaço de trânsito através do intestino delgado, que não permite maior crescimento bacteriano. Em contapartida, no cólon, as características intrínsecas desta região, tais como pH, atividade de água e nutrientes favorecem o desenvolvimento microbiano. Nesta região observa-se de 10^{11} a 10^{12} UFC/g. A maioria das espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal é anaeróbica estrita (97%) e conseqüentemente, apenas 3% são aeróbias facultativas (NOVERR; HUFFNAGLE, 2004; ALMEIDA et al., 2009).

No adulto, há 100 trilhões de bactérias com mais de 400 espécies diferentes, número 10 vezes maior que o total de células dos órgãos e tecidos do corpo humano. A microbiota intestinal é composta por 4 filos (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria), por poucos gêneros bacterianos, porém há diversidade quanto às espécies. Prevaecem no intestino os gêneros *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Coprococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. Nas fezes, há predominância dos gêneros *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Coprococcus* spp., *Enterobacteriaceae* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Veillonella* spp. Além disso, estima-se a existência de cerca de 300 a 500

diferentes espécies de bactérias, com composição variada de acordo com o indivíduo (GUARNER; MALAGELA, 2003; IANNITTI; PALMIERI, 2010).

Em geral, esses gêneros são os mais prevalentes, porém existem diferenças de quantidade de bactérias na microbiota intestinal de cada indivíduo. Assim, pode-se afirmar que cada indivíduo tem sua microbiota intestinal única (BLAUT, 2002).

A alteração da microbiota intestinal é um distúrbio conhecido como disbiose intestinal. Essa é caracterizada por disfunção colônica, na qual ocorre predomínio das bactérias patogênicas sobre as comensais. Entre as possíveis causas desta alteração estão: o uso indiscriminado de antibióticos, uso de anti-inflamatórios, bem como o abuso de laxantes, consumo excessivo de alimentos processados, as doenças consumptivas, como câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), as disfunções hepatopancreáticas, o estresse e a diverticulose (SANTOS, 2010).

Segundo Fonseca e Costa (2010), há outros fatores que também levam ao estado de disbiose intestinal, como a idade, o tempo de trânsito intestinal, pH intestinal, a disponibilidade de material fermentável e o estado imunológico do hospedeiro.

Existem múltiplas evidências de que as bactérias desempenham um papel chave no surgimento das doenças inflamatórias intestinais crônicas (BRANDT; SAMPAIO; MUIK, 2006; VIEIRA et al., 2007; PINHO, 2008). Estudos experimentais demonstram a impossibilidade do desenvolvimento desta inflamação na ausência de bactérias. Baseados nestes achados há muitos anos, tenta-se identificar os possíveis mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios intestinais e a sua relação com microbiota colônica (PINHO, 2008).

Existe uma variedade de bactérias intestinais que produzem diferentes metabólitos que podem modular o desenvolvimento normal e funcional do hospedeiro. Por outro lado, as atividades metabólicas da microbiota intestinal podem gerar compostos prejudiciais ao hospedeiro, como, por exemplo, os intermediários do oxigênio reativo. Essas moléculas, que

incluem superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio singleto e o radical hidroxil, provocam o dano oxidativo do DNA celular e podem aumentar o risco do câncer de cólon (OWEN; SPIEGELHALDER; BARTSCH, 2000) Estudos revelaram que o *Enterococcus faecalis* comensal foi capaz de produzir superóxido e peróxido de hidrogênio, provocando danos ao DNA em células epiteliais colônicas, tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (HUYCKE; ABRANS; MOORE, 2002).

Dado o papel da microbiota intestinal na carcinogênese de cólon, sugere-se que fatores que modulem benéficamente a composição e ou a atividade da microbiota possam proteger ao desenvolvimento do CCR. Sobhani et al. (2011) analisaram a microbiota intestinal de pessoas com câncer de cólon e indivíduos com colonoscopia normal. Nesse estudo encontraram-se treze gêneros de bactérias correspondentes à microbiota intestinal humana (*Alistipes* spp., *Collinsella* spp., *Bacteroides* spp., *Lachnospira* spp., *Prevotella* spp., *Subdoligranulum* spp., *Dorea* spp., *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* spp., *Coprococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Ruminococcus* spp.). A distribuição dos gêneros nas distintas microbiotas não se diferiu significativamente entre os pacientes com câncer de cólon e indivíduos saudáveis. Entretanto, observou-se um aumento significativo de *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp. em pacientes com câncer.

A microbiota comensal não patogênica têm um profundo impacto sobre a fisiologia normal do TGI. Ela garante a eficácia da motilidade intestinal, do crescimento e da imunidade, bem como a digestão de nutrientes, absorção, angiogênese e fortificação da barreira de muco (ROUND; MAZMANIAN, 2009). Outras funções da microbiota gastrointestinal incluem digestão de nutrientes mal digeridos, modificação de ácidos biliares, e a suplementação nutricional de compostos auxotróficos adicionais que não podem ser obtidos através da alimentação, tais como ácido fólico e biotina, síntese de vitaminas e AGCC (BLAUT, 2002; JONES et al., 2008).

A complexa interação entre dieta, microbiota intestinal normal e saúde tem promovido o desenvolvimento de estratégias que permitem o crescimento seletivo de microrganismos benéficos ou probióticos (LIONG, 2007).

Dentre as diferentes espécies de bactérias, as que produzem ácido láctico são sempre pesquisadas, em razão dos efeitos fisiológicos que exercem na saúde dos seres humanos e animais, cada uma apresentando diferentes benefícios (BOURLIOUX et al., 2003).

2.3 PROBIÓTICOS

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez em 1965, por Lilly e Stillwell. Segundo a Food and Agriculture Organization of United Nations e World Health Organization (2001), probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Os probióticos apresentam vários benefícios à saúde do hospedeiro, pois, podem promover a resistência gastrintestinal e urogenital à colonização por microrganismos patogênicos, estimular o sistema imunológico, aliviar a constipação intestinal, tratar alguns tipos de diarreias, produzir vitaminas, melhorar os níveis de colesterol, aumentar a absorção de minerais e reduzir o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (ROLFE, 2000; LIONG; SHAH, 2005; STEFE et al., 2008; CHANG et al., 2012).

De acordo com a lista de alegações de propriedade funcional, descrita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualizada em julho de 2008, os microrganismos considerados probióticos pela mesma são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius*

subespécie *thermophilus* foram retirados da lista, tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado. Porém, para que um produto seja considerado probiótico, a quantidade mínima viável de microrganismos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008).

Há algumas evidências de estudos *in vitro* (BODANA; RAO, 1990; NADATHUR; GOULD; BAKALINSKY, 1994) e *in vivo* (MCINTOSH; ROYLE; PLAYNE, 1999) que demonstram que algumas cepas probióticas são capazes de reduzir o risco de câncer de cólon (SAIKALI et al., 2004). De acordo com Brady, Gallaher e Busta (2000), os probióticos e o uso de leites fermentados levaram ao desenvolvimento mais lento de câncer induzido e inibiram o crescimento de células cancerígenas no intestino, bexiga e estômago.

A ação do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 foi estudada em relação ao processo de desenvolvimento do câncer de cólon em ratos induzidos quimicamente. Os resultados mostraram que a incidência de tumores foi menor nos animais que consumiram cultivo puro de *E. faecium* CRL 183 e do produto não fermentado, seguidos dos animais que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio e produto fermentado sem suplementação (SIVIERI et al., 2008).

Urbanska et al. (2009) estudaram as propriedades de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 microencapsulado em uma formulação de iogurte em ratos portadores de linhagem germinativa com mutação APC. A administração diária do iogurte probiótico resultou em significativa supressão da incidência de tumor de colón, multiplicidade e tamanho do tumor.

No Japão, pesquisadores examinaram a hipótese de que a administração de fibras e *Lactobacillus casei* poderia prevenir a ocorrência de câncer de cólon em população com risco de desenvolvimento de lesões intestinais, após remoção de pelo menos dois adenomas. Não foram

encontradas diferenças significativas no desenvolvimento de novas lesões de cólon entre 2 e 4 anos. Entretanto, após 4 anos, a ocorrência de lesões de moderada e elevada intensidade, foi significativamente reduzida no grupo que recebeu *L. casei*, diminuindo assim, as chances de progredir para um câncer de cólon (ISHIKAWA et al., 2005).

Hirayama e Rafter (2000) e Rafter (2003) sugerem vários mecanismos de atuação, incluindo o estímulo da resposta imune do hospedeiro, através do aumento da atividade fagocitária, a síntese de IgA e a ativação de linfócitos T e B, da ligação e a degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e/ou quantitativas na microbiota intestinal envolvidas na produção de carcinógenos, produção de compostos antimutagênicos no cólon, alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal, alteração das condições físico-químicas do cólon com diminuição do pH e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro.

Vários pesquisadores citam a habilidade de algumas espécies de lactobacilos e de bifidobactérias em modular a microbiota intestinal e conseqüentemente, diminuir o risco do desenvolvimento do câncer de cólon. Estes microrganismos são capazes de reduzir a atividade de algumas enzimas pró-carcinogênicas, tais como: a β -glucuronidase e a nitroreductase (HOSODA et al., 1996; DE MORENO DE LEBLANC; PERDIGON, 2005).

Rowland et al. (1998) concluíram que ratos tratados com *B. longum* reduziram em 30% a atividade da β -glucuronidase, enquanto uma redução de 55% foi observada nos ratos tratados com o probiótico *B. longum* combinado ao prebiótico (inulina), comprovando assim, melhor eficácia quando utilizados os simbióticos. Em concordância, estudos em humanos mostraram que o consumo de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus* também reduziu significativamente a atividade dessas enzimas (GOLDIN et al., 1980; SPANHAAK; HAVENAAR; SCHAAFSMA, 1998).

2.4 PREBIÓTICOS

Os prebióticos, por sua vez, são os carboidratos não-digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimularem seletivamente a proliferação e/ou a atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Para ser considerado prebiótico é necessário que o ingrediente atenda às seguintes características: não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do TGI, ser capaz de promover uma melhora intestinal, através do aumento no número de bactérias comensais e redução de patogênicas e conseqüentemente induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999; SAAD, 2006).

Evidências mais diretas para as propriedades protetoras de prebióticos na redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon podem estar relacionadas com a capacidade de inibição do crescimento e/ou metástase de tumores, produção de AGCC, principalmente o butirato produzido pela fermentação colônica, o qual pode apresentar efeito protetor para o cólon, visto que diminui a proliferação celular, estimula a diferenciação celular e induz a apoptose, além de reduzir o pH do cólon e, conseqüentemente diminuir a colonização de microrganismos patogênicos e, aumentar as bactérias comensais no cólon como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (BURNS; ROWLAND, 2002; POOL-ZOBEL, 2005; SAAD, 2006; BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

Ratos alimentados com dieta contendo 3% de lactulose e induzidos quimicamente com DMH (1,2-dimetilhidrazina) apresentaram menores danos ao DNA de células do cólon, comparados com ratos alimentados com sacarose, uma vez que nestes animais a percentagem de células com danos graves no DNA foi de 33%, comparado com apenas 12,6% daqueles tratados com lactulose (ROWLAND et al., 1996). Estes resultados evidenciam que os prebióticos possuem efeitos protetores contra os estágios iniciais de câncer de cólon (BURNS; ROWLAND, 2002).

O yacon, conhecido cientificamente como *Smallanthus sonchifolius*, é uma raiz tuberosa comumente utilizada como alimento na América do Sul. Originária das regiões andinas foi introduzida no Brasil na década de 90 (MOSCATTO; PRUDÊNCIO-FERREIRA; HAULY, 2004) e é alvo de atenção devido à sua composição nutricional. Esta raiz apresenta compostos bioativos importantes à saúde, além de ter como principais substâncias água e carboidratos, e é considerado um alimento prebiótico, devido seu alto teor de frutoligossacarídeos (FOS) e inulina (SANTANA; CARDOSO, 2008; DELGADO et al., 2013).

Os carboidratos do yacon são frutose, glicose, sacarose e oligossacarídeos de baixo grau de polimerização, com ligações do tipo β (2 \rightarrow 1), e os FOS (MOSCATTO; PRUDÊNCIO-FERREIRA; HAULY, 2004).

O FOS é formado a partir da hidrólise enzimática da inulina e consiste em unidades lineares de frutossil com ou sem a unidade final de glicose. São carboidratos resistentes às enzimas hidrolíticas da saliva e do sistema digestório do homem (ROBERFROID, 1993). A raiz mostrou características importantes com prebiótico, pois além de não serem hidrolisados e nem absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal, os mesmos influenciam positivamente a microbiota intestinal, devido ao estímulo seletivo do crescimento e atividade de bactérias intestinais promotoras de saúde (BIBAS BONET et al., 2010).

Além disso, o FOS também tem sido relacionado com a redução da glicemia, auxílio na redução da obesidade, níveis de lipídios séricos, aumento na capacidade de absorção de minerais, participa da redução do número de bactérias patogênicas e putrefativas por efeito da multiplicação das bifidobactérias, além de estar envolvido na inibição dos estágios iniciais do câncer de cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID; DELZENNE, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do consumo de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e extrato aquoso de yacon sobre a microbiota intestinal em ratos submetidos à carcinogênese química de cólon.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da ingestão de *L. acidophilus* CRL 1014 e extrato aquoso de yacon sobre microbiota intestinal de animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo;
- Avaliar o efeito da ingestão de *L. acidophilus* CRL 1014 e extrato aquoso de yacon sobre a produção ácidos graxos de cadeia curta, conteúdo de amônia e pH fecais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, S.J.; OKOKO, B.; MARTINEZ, E.; GREGORIO, G.; DANS, L.F. Probiotics for treating infectious diarrhea, **Cochrane Database Syst Rev**, v.2, 2004.

ALMEIDA, L.B.; MARINHO, C.B.; SOUZA, C.S.; CHEIB, V.B.P. Disbiose intestinal. **Rev Bras Nutr Clin**; v.24, n.1, p.58-65, 2009.

BARTRAM, H.P.; SCHEPPACH, W.; GERLACH, S.; RUCKDESCHEL, G.; KELBER, E.; KASPER, H. Does yoghurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites in healthy subjects? **Am J Clin Nutr**, v.59, p.428-432, 1994.

BERNAUD, F.S.R.; RODRIGUES, T.C. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.57, n.6, p.397-405, 2013.

BIBAS BONET, M.E.; MESON, O.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; DOGI, C.A.; CHAVES, S.; KORTSARZ, A. Prebiotic effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on intestinal mucosa using a mouse model. **Food Agric Immunol**, v.21, p.175-189, 2010.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **Eur J Nutr**, v.41, n.1, p.11-16, 2002.

BODANA, A.R.; RAO, D.R. Antimutagenic activity of milk fermented by streptococcus thermophilus and lactobacillus bulgaricus. **J Dairy Sci**, v.73, n.12, p.3379-3384, 1990.

BOLOGNANI, F.; RUMMEY, C.J.; POOL-ZOBEL, B.L.; ROWLAND, I.R. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. **Eur J Nutr**, v.40, p.293-300, 2001.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. **Am J Clin Nutr**, v.78, n.4, p.675-683, 2003.

BRADY, L.J.; GALLAHER, D.G.; BUSTA, F. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. **J Nutr**, v.130, p.410-414, 2000.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MUIK, C.J. Importância da microflora intestinal: revisões e ensaios. **Rev Bras Ped**, v.28, n.2, p.117-127, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos - IX lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em: 25 nov 2013.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **ALAN**, v.57, n.4, 2007.

BURNS, A.J.; ROWLAND, I.R. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. **Cur Issues Intest Microbiol**, v.1, n.1, p.13-24, 2002.

CAMPOS, M.O.; RODRIGUES NETO, J.F. Doenças crônicas não transmissíveis: fatores de risco e repercussão na qualidade de vida. **Rev Baiana Saúde Pública**, v.33, n.4, p.561-581, 2009.

CANANI, R.B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CASARANO, L.; SPAGNULO, M.I.; DE VINCENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; DE MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. **BMJ**, v.18, p.335-340, 2007.

CASTRO E SILVA, I.M.; SÁ, E.Q.C. Alimentos funcionais: um enfoque gerontológico. **Rev Bras Clin Med**, v.10, n.1, p.24-28, 2012.

CHANG, J.; SHIM, Y.Y.; CHA, S.; REANEY, M.J.T.; CHEE, K.M. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **J Medical Microbiol**, v.61, p.361-368, 2012.

CHEN, C.C.; LIN, W.C.; KONG, M.S.; SHI, H.N.; WALKER, W.A.; LIN, C.Y.; HUANG, C.T.; LIN, Y.C.; JUNG, S.M.; LIN, T.Y. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumor growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. **Br J Nutr**, v.107, p.1623-1634, 2012.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutat Res**, v.591, n.1-2, p.276-289, 2005.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; PERDIGON, G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, v.29, n.1, p.15-24, 2005.

DE MOURA, N.A.; CAETANO, B.F.R.; SIVIERI, K.; URBANO, L.H.; CABELLO, C.; RODRIGUES, M.A.M.; BARBISAN, L.F. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, v.50, p.290-2910, 2012.

DELGADO, C.G.T.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. **Plant Foods Hum Nutr**, v.68, p.222-228, 2013.

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.S.M.; BURINI, R.C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq Gastroenterol**, v.47, n.1, p.93-98, 2010.

FONSECA, F.C.P.; COSTA, C.L. Influência da nutrição sobre o sistema imune Intestinal. **Ceres**, v.5, n.10, p.99-110, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: < www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf >. Acesso em: 06 mar. 2014.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **Int Dairy J**, v.9, n.1, p.53-61, 1999.

GIANOTTI, L.; MORELLI, L.; GALBIATI, F.; ROCCHETTI, S.; COPPOLA, S.; BENEDEUCE, A.; GILARDINI, C.; ZONENSCHAIN, D.; NESPOLI, A.; BRAGA, M. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol**, v.14, n.2, p.167-175, 2010.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GILL, H.S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgrad Med J**, v.80, p.516-526, 2004.

GOLDIN, B.R.; SWENSON, L.; DWYER, J.; SEXTON, M.; GORBACH, S.L. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. **J Natl Cancer Inst**, v.64, n.2, p.255-261, 1980.

GRADY, W.M. Genomic instability and colon cancer. **Genomic Metastasis Rev**, v.23, n.1-2, p.11-27, 2004.

GRANATO, G.; BRANCI, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.9, p.292-302, 2010.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet** , v.361, n.9356, p.512-519, 2003.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect**, v.2, n.6, p.681-686, 2000.

HOPE, M.E.; HOLD, G.L.; KAIN, R.; EL-OMAR, E.M. Sporadic colorectal cancer – role of the commensal microbiota. **FEMS**, v.244, n.1, p.1-7, 2005.

HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; HE, F.; MORITA, H.; HOSONO, A. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. **J Dairy Sci**, v.79, n.5 p.745-749, 1996.

HUYCKE, M. M.; ABRAMS, V.; MOORE, D. R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. **Carcinogenesis**, v.23, n.3, p.529-536, 2002.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clin Nutr**, v.29, n.6, p.701-725, 2010.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2014. 124p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf> Acesso em: 06 mar.2014.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Ações de prevenção primária e secundária no controle do câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2008. 628p. Disponível em: www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap5.pdf Acesso em: 06 mar. 2014.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 122p. Disponível em: http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf Acesso em: 06 mar.2014.

ISHIKAWA, H.; AKEDO, I.; OTANI, T.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, T.; TAKEYAMA, I.; ISHIGURO, S.; MIYAOKA, E.; SOBUE, T.; KAKIZOE, T. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. **Int J Cancer**, v.116, n.5, p.762-767, 2005.

JONES, B.V.; BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.; MARCHESI, J.R. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, n.36, p.13580-13585, 2008.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Sci**, v.12, p.747-748, 1965.

LIONG, M.T. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic, and perimenopausal treatments. **Nutr Rev**, v.65, n.7, p.316-328, 2007.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. **Appl Environ Microbiol**, v.71, n.4, p.1745-1753, 2005.

MACBAIN, A.J.; MACFARLANE, G.T. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. **J Medical Microbiol**, v.47, n.5, p.407-416, 1998.

MALTA, D.C.; SILVA JR, J.B. Brazilian strategic action plan to combat chronic non-communicable diseases and the global targets set to confront these diseases by 2025: a review. **Epidemiol Serv Saúde**, v.22, n.1, p.151-164, 2013.

MATARESE, L.E. The role of probiotic in Gastrointestinal Disease. **Nutr Clin Pract**, v.18, n.6, p.507-516, 2003.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; PLAYNE, M.J. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. **Nutr Cancer**, v.35, n.2, p.153-159, 1999.

MOSCATTO, J.A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S.; HAULY, M. Farinha de Yacon e Inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Cien Tecnol Aliment**, v.24, n.4, p.634-640, 2004.

NADATHUR, S.R.; GOULD, S.J.; BAKALINSKY, A.T. Antimutagenicity of fermented milk. **J Dairy Sci**, v.77, n.11, p. 3287-3295, 1994.

NEVES, F.J.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, R.J., Mortalidade por câncer de cólon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. **Arq Gastroenterol**, v.42, n.1, p.63-70, 2005.

NOVERR, M.C.; HUFFNAGLE, G.B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiol** , v.12, n.12, p.562-568 , 2004.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **RBCF**, v.38, n.1, 2002.

OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. **Gut**, v.46, n.2, p.225-232, 2000.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZECALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential source of prebiotics. **J Agric Food Chem**, v.51, p.5278-5284, 2003.

PELCZAR JR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

PIMENTEL, T.C. Probióticos e benefícios à saúde. **SaudPesq**, v.4, n.1, p.101-107, 2011.

PINHO, M. A biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. **Rev Bras Coloproctol**, v.28, n.1, p.119-123, 2008.

POOL-ZOBEL, B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Brit J Nutr**, v.93, Suppl.1, p.S73-S90, 2005.

RABENECK, L.; DAVILA, J.A.; EL-SERAG, H.B. Is there a true “shift” to the right colon the incidence of colorectal cancer? **Am J Gastroenterol**, v.98, n.6, p.1400-1409, 2003.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.17, n.5, p.849-859, 2003.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofrutose: a review comparing their physiological effects. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.33, n.2, p.103-148, 1993.

ROBERFROID, M.B; GIBSON, G.R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK,F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M.J.; LÉOTOING, L.;

WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr**, v.104, Suppl 2, p.S1-S63, 2010.

ROBERFROID, M. B.; DELZENNE, N. M. Dietary fructans. **Annu Rev Nutr**, v.18, n.1, p.117-143, 1998.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J Nutr**, v.130, n.2, p.396-402, 2000.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.5, p.313-323, 2009.

ROWLAND, I.R.; BEARNE, C.A.; FISHER, R.; POOL-ZOBEL. The effect of lactulose on DNA damage induced by DMH in the colon of human flora-associated rats. **Nutr Cancer**, v.26, n.1, 1996.

ROWLAND, I.R.; RUMNEY, C.J.; COUTTS, J.T.; LIEVENSE, L.C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, v.19, n.2, p.281-285, 1998.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **BJPS**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SAIKALI, J.; CELINE, P.; FREITAS, M.; HOLT, P.R. Fermented Milks, Probiotic Cultures, and Colon Cancer. **Nutr Cancer**, v.49, n.1, p.14-24, 2004.

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

SANTOS, A.C.A.L. **Uso de probióticos na recuperação da flora intestinal, durante antibioticoterapia.** 2010. 30f. Dissertação (Especialização em Terapia Nutricional) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, A.M.T. **Elaboração de iogurte com propriedades funcionais utilizando *Bifidobacterium lactis* e fibra solúvel.** 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Sistema Agroindustriais) - Universidade Federal da Campina Grande.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and a consumer acceptance- a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.

SIVIERI, K.; BIANCHI, F.; ADORNO, M.A.T.; ROSSI, E.A. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. **Functional Foods in Health and Disease**, v.10, p.389-402, 2011.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **Eur Food Res Technol**, v.228, n.2, p.231-237, 2008.

SOBHANI, P.I.; TAP, J.; ROUDOT-THORAVALL, F.; ROPERCH, J.P.; LETULLE, S., LANGELLA, P.; CORTIER, G.; VAN NHIEU, J.T.; FURET, J.P. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. **Plos one**, v.6, n.1, p.1-7, 2011.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by lactobacillus casei strain shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Eur J Clin Nutr**, v.52, n.12, p.899-907, 1998.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.3, n.1, p.16-33, 2008.

URBANSKA, A.M.; BHATHENA, J.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. Estimation of the potencial antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in apc (min/+) mice. **Dig Dis Sci**, v.54, p.264-273, 2009.

VIEIRA, L.Q.; PENNA, F.J.; PÉRET FILHO, L.A.; NICOLI, J.R. The use of probiotic in the prevention and treatment of gastrointestinal infection and inflammation. **Rev Med Minas Gerais**, v.17, p.45-53, 2007.

WHO - World Health Organization . **Global status report on non communicable diseases 2010**. Geneva: World Health Organization; 2011.

ZANDONAI, A.P.; SONOBE, H.M.; SAWADA, N.O. Os fatores de riscos alimentares para câncer colorretal relacionado ao consumo de carnes. **Rev Esc Enferm USP**, v.46, n.1, p.234-239, 2012.

ZHU, Y.; LUO, T.M.; JOBIN, C.; YOUNG, H.A. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. **Cancer Letter**, v.309, n.2, p.119-127, 2011.

Capítulo II

O artigo será submetido à revista Nutrition

EFEITO DO *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* CRL 1014 E EXTRATO AQUOSO DE YACON NA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS À CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON.

Camilla Martins Avi¹, Ana Paula Silva Almeida¹, Maria Angêla Tallarico Adorno², Izabel Kimiko Sakamoto² e Katia Sivieri¹

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição. Laboratório de Pesquisa em Probióticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Araraquara, São Paulo, Brasil

² Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Engenharia Ambiental - CPDI-EA. Laboratório de Processos Biológicos – LPB. Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/USP, São Carlos, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os efeitos do consumo de probiótico (*Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) e prebiótico (extrato aquoso de yacon) sobre a microbiota intestinal em animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon retal (CCR) foram avaliados. O protocolo experimental foi de 8 meses. Os animais, ratos Wistar (n=175), foram divididos em 5 grupos experimentais. Tratamento I-GCN: animais controle negativo (animais sadios que consumiram apenas a ração comercial); Tratamento II-GCP: animais controle positivo (induzidos quimicamente ao CCR e que consumiram apenas a ração comercial); Tratamento III-GPRO: (induzidos quimicamente ao CCR e que consumiram ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014); Tratamento IV-GPRE: (induzidos quimicamente ao CCR e que consumiram ração comercial + yacon); Tratamento V-GS: (induzidos quimicamente ao CCR e que consumiram ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon). Os animais receberam 4 induções com 1,2 dimetilhidrazina na concentração de 40mg/kg de peso. O *L. acidophilus* CRL 1014 foi administrado em 10⁹UFC/mL (3 ml/kg de peso/dia) e o extrato aquoso de yacon na quantidade de 10% de FOS/ração. Mudanças na microbiota fecal foram avaliadas utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo (PCR-DGGE). Realizou-se análises de íons de amônia, pH fecal e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os grupos tratados apresentaram modificação na microbiota intestinal em relação às bactérias comensais pelo método convencional. Na análise de PCR-DGGE, os grupos GPRO e GPRE, aumentaram a riqueza de *Lactobacillus* spp. Em relação aos metabólitos bacterianos, os grupos tratados apresentaram valores inferiores aos controles em relação à produção de íons de amônia, assim como pH fecal. O GPRO foi o grupo que produziu maiores concentrações de AGCC totais, acético, propiônico e butírico. Este estudo mostrou a influência benéfica da ingestão de *L. acidophilus* CRL 1014 e yacon sobre o metabolismo microbiano e a composição da comunidade de *Lactobacillus* spp. em animais com CCR.

Palavras – chave: probiótico, prebiótico, ácido graxo de cadeia curta, câncer de cólon

Autor Correspondente em: Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. Tel. 55(16) 33016932 – (16) 982363558.

Endereço de E-mail: camilla_avi@hotmail.com

LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS CRL 1014 AND YACON AQUEOUS EXTRACT EFFECTS GUT MICROBIOTA ON DMH-INDUCED RAT COLON CANCER.

Camilla Martins Avi¹, Ana Paula Silva Almeida¹, Maria Angêla Tallarico Adorno², Izabel Kimiko Sakamoto² e Katia Sivieri¹

¹ Department of Food and Nutrition. Probiotics Research Laboratory. Faculty of Pharmaceutical Science (UNESP) - Araraquara, São Paulo, Brazil

² Center for Research, Development and Innovation in Environmental Engineering - CPDI-EA. Laboratory of Biological Processes - LPB. School of Engineering of São Carlos - EESC / USP, São Carlos, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The effects of probiotic (*Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) and prebiotic (yacon aqueous extract) on the gut microbiota on DMH-induced colon rectal cancer (CRC) in rats were evaluated. The experimental protocol was performed in 8 months. The animals, Wistar rats (n = 175) were randomly allocated into 5 groups. Treatment I-GCN: negative control animals (healthy animals + commercial feed), Treatment II-GCP: positive control animals (DMH induced + commercial feed), Treatment III-GPRO: (DMH induced + commercial feed + *L. acidophilus* CRL 1014), Treatment IV-GPRE: (DMH induced + commercial feed + yacon), Treatment V-GS: (DMH induced to CRC + feed + *L. acidophilus* CRL 1014+ yacon). The animals were induced four times with 1.2 dimethylhydrazine (DMH) at a concentration of 40mg/kg/weight. The *L. acidophilus* CRL 1014 was administered at 10⁹CFU/mL (3 ml/kg body weight/day) and aqueous yacon extract (10 % FOS/feed). Changes in the gut microbiota were evaluated using methods dependent and independent growth (PCR- DGGE). Analysis of ammonium ions, fecal pH and production of short chain fatty acids (SCFA) was performed on different groups' feaces. The treated groups change the gut microbiota in respect to commensal bacteria by plate count. In PCR-DGGE analysis, the GPRO and GPRE increased the richness in lactobacilli community. About bacterial metabolites, the treated groups showed lower values than the controls in ammonium ions production as well fecal pH. The GPRO was the group that produced the highest concentrations of total SCFA, acetic , propionic and butyric. This study demonstrated the beneficial influence of the ingestion of *L. acidophilus* CRL 1014 and yacon on microbial metabolism and *Lactobacillus* spp. community in CRC animals.

Keywords: probiotics, prebiotics, short chain fatty acid, colon cancer

Corresponding Author: Faculty of Pharmaceutical Sciences (UNESP) - Araraquara-Jau Highway 1 Km, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel 55 (16) 33016932 and 55 (16) 982 363 558.
E-mail: camilla_avi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O câncer de cólon é o quarto tipo de tumor mais frequente em todo o mundo. Além disso, tem se tornado uma das principais causas de morte por câncer entre homens e mulheres nos países ocidentais (JEMAL et al., 2011). No Brasil, essa doença é o segundo e terceiro tipos de câncer mais frequente diagnosticado em mulheres e homens, respectivamente (INCA, 2014). Portanto, é importante identificar os agentes de prevenção que poderiam inibir ou minimizar seu risco de desenvolvimento. Estudos mostram que a dieta baseada no consumo de frutas, vegetais e bebidas lácteas pode ter um papel importante no controle da carcinogênese do cólon humano (POULSEN et al., 2011; TARAPORE; SIDDIQUI; MUKHTAR, 2012).

Mudanças no padrão alimentar e suplementação com substâncias bioativas têm demonstrado efeitos benéficos na redução do risco de câncer de cólon (KUMAR et al., 2010). Há uma forte correlação entre os hábitos alimentares, a microbiota intestinal e o câncer de cólon (IANNITTI; PALMIERI, 2010). Além disso, estudos mostram uma relação positiva entre a ingestão de probióticos, prebióticos e simbióticos e câncer de cólon (SAIKALI et al., 2004; FOTIADIS et al., 2008; DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010).

Alguns estudos têm mostrado que o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* pode reduzir o risco de desenvolvimento do câncer de cólon (BOLOGNANI et al., 2001; BALDWIN et al., 2010; KIM et al., 2010; CHANG et al., 2012; VERMA; SHUKLA, 2013). Assim como, observa-se efeito anticarcinogênico de alimentos contendo frutooligosacarídeos (FOS) (ROBERFROID, 2002; POOL-ZOBEL, 2005; SANTANA; CARDOSO, 2008).

Essa redução do risco de desenvolvimento do câncer de colón também pode ser resultado da produção de metabólitos gerados a partir do consumo de probióticos e

prebióticos. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato são os produtos finais da fermentação de carboidrato realizada pelas bactérias presentes no cólon. Autores relatam que o butirato pode induzir à apoptose e, inibir a proliferação de células carcinogênicas (HAMER et al., 2008; LEONEL; ALVAREZ-LEITE, 2012). Conseqüentemente, a produção de AGCC acidifica o meio, diminuindo o pH luminal, e assim, favorece a redução de algumas espécies patogênicas (MANNING; GIBSON, 2004).

O yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. e Endl., Asteraceae) é um tubérculo originário da região andina da América do Sul e apresenta uma raiz tuberosa comestível com alto teor de FOS (VALENTOVÁ et al., 2006; DELGADO et al., 2013). Estudos com animais têm demonstrado que o consumo de yacon tem vários efeitos biológicos, tais como a redução dos níveis de glicose plasmática e melhora dos os níveis de insulina, além da diminuição dos níveis de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O consumo de yacon também reduziu o pico da glicemia pós-prandial em ratos machos diabéticos, além de reduzir de forma significativa, o número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes (FCA) em ratos induzidos quimicamente ao câncer de cólon, uma vez que alguns autores acreditam que esses FCA podem ser lesões precoces e precursores de câncer de cólon (AYBAR et al., 2001; PARK et al., 2009; HABIB et al., 2011; DE MOURA et al., 2012).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a administração diária de *L. acidophilus* CRL 1014, extrato aquoso de yacon e a associação de ambos, em animais quimicamente induzidos ao câncer de cólon além de elucidar os possíveis efeitos e mecanismos de proteção ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

PREPARO DO PROBIÓTICO E PREBIÓTICO

O cultivo puro de *L. acidophilus* CRL 1014 (CERELA, Tucumã, Argentina) foi preparado semanalmente em laboratório utilizando meio MRS caldo. As bactérias foram coletadas por centrifugação (5000g/10min/4°C) e lavadas com água peptonada fosfatada estéril. As células foram mantidas na concentração de 10⁹ UFC/ml nesta solução até o momento da administração (SIVIERI et al., 2007).

O extrato aquoso de yacon foi preparado segundo metodologia apresentada por PAULY-SILVEIRA (2009) e, a determinação da concentração de FOS foi realizada utilizando método enzimático previamente descrito por KORAKLI et al. (2003).

ANIMAIS

Foram utilizados 175 ratos machos Wistar com 4 semanas de idade, obtidos do biotério da Faculdade de Medicina, campus Botucatu. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de 35 ratos e alocados em caixas opacas de prolipoleno acomodadas em estantes ventiladas providas de filtração de ar e controle interno de temperatura (22°C ± 1°C) e, ambiente mantido com ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. Durante o experimento, os animais consumiram água e ração comercial *ad libitum* (23% de proteína, 49% de carboidrato, 4% de gordura, 5% de fibra, 7% de cinzas e 6% de vitamina C). Todos os procedimentos com os animais estavam de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp, nº 16/2010.

DESIGN EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 5 grupos: Tratamento I - Grupo Controle Negativo (GCN): animais sadios que consumiam apenas a ração comercial; Tratamento II - Grupo Controle Positivo (GCP): animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; Tratamento III - Grupo Probiótico (GPRO): animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; Tratamento IV - Grupo Prebiótico (GPRE): animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + extrato aquoso de yacon; Tratamento V - Grupo Simbiótico (GS): animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + extrato aquoso de yacon.

Uma semana após o início da ingestão das suspensões em estudo, os ratos dos tratamentos II, III, IV e V foram inoculados com 1,2 dimetilhidrazina (DMH- Sigma®, St Louis, USA), via subcutânea, semanalmente, em duas doses de 40mg/kg peso corpóreo, durante 2 semanas (Figura 1). O DMH foi dissolvido em uma solução salina 0,9% e o pH foi ajustado a 6,5 com solução de hidróxido de sódio (SIVIERI et al., 2008).

Mensalmente, cinco animais pertencentes a cada grupo experimental foram sacrificados em câmara com atmosfera modificada de CO₂ após jejum de 24 horas.

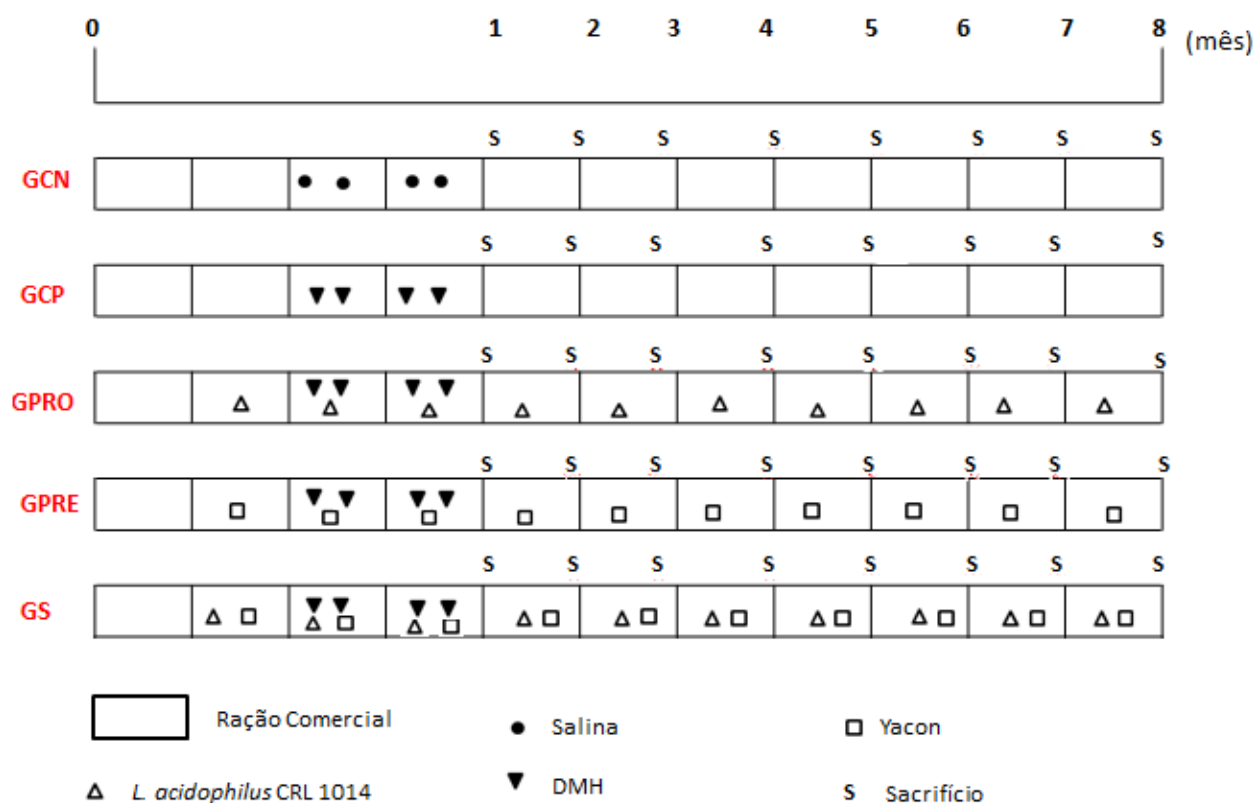


Figura 1. Design Experimental do protocolo de 8 meses.

ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO, PREBIÓTICO E SIMBIÓTICO

Os animais do GPRO e GS receberam o *L. acidophilus* CRL 1014 na quantidade de 3 ml/kg de peso/dia. Para GPRE e GS foi administrado diariamente o extrato aquoso de yacon. A quantidade de extrato aquoso de yacon administrada aos grupos GPRE e GS foi calculada em relação à ingestão de ração diária, como descrito a seguir: 10% x (quantidade de ingestão de ração/dia/grupo), de acordo com Pool-Zobel (2005).

COLETA DAS FEZES

As fezes foram separadas por grupos de animais e coletadas quinzenalmente com o auxílio de uma pinça estéril durante os 8 meses de protocolo experimental. Foram utilizadas para as análises microbiológicas dependentes e independentes de cultivo, análise de íons de amônia, pH fecal e ácidos graxos de cadeia curta. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos com fecho hermético, identificadas para posterior armazenamento. Os sacos foram armazenados em ultrafreezer com temperatura de -70°C (BEDANI et al., 2010).

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISES DEPENDENTE DE CULTIVO

A análise da composição da microbiota intestinal foi baseada na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobactérias, *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp. Pesaram-se vinte e cinco gramas de fezes, as quais foram suspensas em 225 ml de água peptonada e homogeneizadas em homogeneizador para amostras (*Stomacher* Nova Ética). Diluições seriais foram preparadas e a inoculação foi realizada em meios de cultura seletivos: aeróbios e anaeróbios totais: ágar Standard Methods (Acumedia, EUA; 37°C/48h); *Enterococcus* spp.: ágar KF *Streptococcus* (Acumedia, EUA; 37°C/48h) (EDLUND et al., 2000); *Lactobacillus* spp.: ágar MRS (Merck, Alemanha; 37°C/48h, anaerobiose) (YOSHIOKA; ISEKI; FUJITA, 1983); *Bifidobacterium* spp.: *Bifidobacterium* medium 25-BIM-25 (37°C/72h, anaerobiose) (MUNOA; PARES, 1988), Enterobactérias: ágar MacConkey (Acumedia, EUA; 37°C/48h) (BRIGIDI et al., 2001), *Clostridium* spp.: ágar RCA (Difco, França; 37°C/48h, anaerobiose) (MARZOTTO et al., 2006) e *Bacteroides* spp.: ágar BBE (Acumedia, EUA, 37°C/72h, anaerobiose) (LIVINGSTON et al., 1978).

ANÁLISES INDEPENDENTE DE CULTIVO

ANÁLISE DO ECOSISTEMA MICROBIANO

O DNA foi extraído de 2 g de amostras de fezes usando QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade do DNA foi quantificada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Willmington, EUA) (SIVIERI et al., 2013). Na presente pesquisa, o protocolo utilizado para extração de DNA foi “Isolation of DNA from Stool for Human DNA” (QIAGEN, 2010).

A diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp., foi avaliada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), usando PCR como previamente descrito por Heilig et al. (2002). Esta operação envolve uma primeira reação de PCR com primers Bact27f (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') (LANE, 1991) e 1492R (5'- CGG CTA CCT TGT TAC GAC-3') (FELSKE; WELLER, 2001), seguido de uma segunda reação com primers Lab159f (5'-GGAAACAGATGCTAATACCG-3') e Lab677-GCr (5' GCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGCACCGCTACA CATGGAG-3') (HEILIG et al. 2002).

A PCR foi realizada utilizando Taq Polimerase Brasil (Invitrogen, Brasil). As amostras foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems, EUA) utilizando-se os seguintes parâmetros: desnaturação inicial à 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento do primer específico à 56°C durante 40 segundos, extensão à 72°C por 5 minutos, seguido de resfriamento final à 4°C. A eletroforese previamente descrita por Heilig et al. (2002), foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 8% com gradiente desnaturante de 30-50% por 16h à 85V em Tampão TAE (0,5%), numa temperatura constante de 60°C. Os géis foram corados com

brometo de etídio pelo método de Sanguinetti et al. (1994), digitalizados em 400dpi, e, analisados pelo Software BioNumerics 6.0 (Applied Maths, Bélgica).

ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS (DENDOGRAMAS)

O dendograma é um gráfico gerado por uma técnica que separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade gerada pela presença e ausência obtida dos dados dos géis de DGGE. Neste gráfico estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade que agruparam pares de espécies ou de variáveis (ALVES et al., 2007).

A similaridade do padrão de bandas intra-gel foi verificada utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard. Para a avaliação do perfil da diversidade das amostras e cálculo do coeficiente de Jaccard, utilizou-se o programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica).

O índice de Jaccard é um coeficiente de similaridade binário que expressa a proporção de caracteres que dois objetos possuem mutuamente quando comparados e é representado pela seguinte equação (GOMES; FERREIRA, 2004):

$$IJ = a / (a + b + c)$$

onde:

a = as duas espécies ocorrem

b = somente a primeira ocorre

c = somente a segunda ocorre

ANÁLISE ECOLÓGICA DA POPULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SPP.

Para a análise ecológica da população de *Lactobacillus* spp., foram utilizados os parâmetros da riqueza (Rr) e a funcionalidade (Fo) desta população nos diferentes grupos experimentais e distintos tempos do protocolo experimental.

O cálculo da riqueza da população estudada foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$Rr = (N^2 \times Dg) \text{ (MARZORATI et al., 2008)}$$

onde:

N= número total de bandas na linha de DGGE

Dg = gradiente desnaturante compreendido entre a primeira e a última banda

Esta fórmula, de acordo com Marzorati et al. (2008), é baseada no fato de que se um ambiente é muito habitável, ele pode hospedar elevada quantidade de diferentes microrganismos e, portanto, apresentará elevada variabilidade genética e, como consequência, um maior gradiente de desnaturação será necessário para descrever a diversidade microbiana total. Por outro lado, se o ambiente é adverso ou exclusivo, uma menor quantidade de microrganismos irá fazer parte da comunidade microbiana e, portanto, será necessário um gradiente de desnaturação mais estreito para descrever a diversidade total.

Outro parâmetro utilizado para descrever a população de *Lactobacillus* spp. foi a organização funcional. A organização funcional (Fo) é um valor numérico utilizado para descrever a uniformidade da comunidade microbiana. Para representar graficamente a uniformidade das comunidades de *Lactobacillus* spp., foram criadas curvas de distribuição de Lorenz (LORENZ, 1905) com base nos perfis de DGGE, como previamente descrito (MERTENS; BOON; VERSTRAETE, 2005). Resumidamente, para cada linha de DGGE, as respectivas bandas são classificadas com base em suas

intensidades. Consecutivamente, a proporção acumulada de espécies é utilizada como o eixo x, e o eixo y é representado pelas proporções acumuladas de intensidades das bandas. Matematicamente, isto gera uma curva convexa. Quanto mais a curva de Lorenz desvia da linha teórica perfeita de equilíbrio (isto é, 45°), uma menor uniformidade pode ser observada na estrutura da comunidade estudada. A baixa uniformidade significa que uma pequena fração das diferentes espécies está presente em quantidades predominantes. Neste estudo, a curva de Lorenz foi também avaliada com base no princípio de Pareto (PARETO, 1897). Segundo este princípio, o valor cumulativo do eixo y (no caso, a proporção de intensidades de bandas) corresponde à 20% da proporção cumulativa da espécie avaliada (eixo X). Na economia, onde se originou a curva de Pareto, observou-se que apenas 20% da população de um país possuem 80% de sua riqueza (PARETO, 1897). Refere-se às curvas de Lorenz, avaliadas no nível de 20% do eixo do x, como "curva de Pareto Lorenz." (WITTEBOLLE et al., 2008).

Além disso, através da curva de Pareto Lorenz foi calculado o coeficiente de Gini, o qual representa um valor numérico para uniformidade de espécies (MERTENS; BOON; VERSTRAETE, 2005).

ANÁLISE DE ÍONS DE AMÔNIA

Pesou-se 1 g de fezes, que foi suspensa em 100 ml de água destilada e, homogeneizadas em homogeneizador para amostras (*Stomacher Nova Ética*). O conteúdo de amônia foi determinado utilizando-se um medidor de íon seletivo (modelo 710A, marca Orion) acoplado a um eletrodo de íon seletivo para amônia (modelo 95-12, Orion). O aparelho foi calibrado utilizando soluções padrão de cloreto de amônio 0,1 M, nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/l de amônia. Em 25 ml de amostra foi adicionado 0,5 ml de solução ISA (ammonia pH adjusting Ionic Strength Adjuster

(Orion) – solução ajustadora de pH e força iônica). Todas as medidas foram realizadas a 25°C (BEDANI, 2008).

DETERMINAÇÃO DO PH FECAL

Pesou-se 1 g de fezes, que foi suspensa em 100 ml de água destilada e, homogeneizadas em homogeneizador para amostras (*Stomacher* Nova Ética). O pH fecal foi determinado para cada grupo experimental, com o auxílio de pHmetro, com eletrodo combinado de vidro (Qualxtron, Brasil) (TOIT et al., 1998).

ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

Pesou-se 1 g de fezes, que foi homogeneizada com 5 ml de água destilada em homogeneizadas em homogeneizador para amostras (*Stomacher* Nova Ética) por 3 minutos. Com uma solução de HCl 5 M, ajustou-se o pH das amostras, os quais permaneceram entre 2 e 3. As amostras já acidificadas foram centrifugadas por 20 minutos a 5000 g (ZHAO; NYMAN; JONSSON, 2006). Os AGCC foram extraídos com dietil éter e determinados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama e injetor capilar split/splitless (Shimadzu GC2010) e coluna HP-INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, usando hidrogênio como gás de arraste com um fluxo de 1,56 mL/min. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram 170, 250 e 280°C, respectivamente (VAN DE WIELE et al., 2004).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de todos os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e teste de médias Tukey com significância mínima de 5%, utilizando o programa estatístico Bio Stat 5.0.

RESULTADOS

CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS

Em relação ao consumo médio de ração durante os 8 meses de protocolo experimental, não foi encontrada diferença estatística ($p < 0,01$) entre os distintos grupos estudados.

Quando se compara peso inicial e após término do protocolo, há diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos, com ganho de peso médio de $362,30 \text{ g} \pm 22,64 \text{ g}$. Também, observa-se que os grupos que sofreram indução química ao câncer de cólon, apresentaram ganho de peso inferior, quando comparado ao grupo sadio, com exceção de GS (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corpóreo médio(g) dos animais dos diferentes grupos de estudo.

Grupos	Peso Inicial(g)	Peso Final (g)
GCN	$69,40 \pm 11,84^{Ba}$	$469,80 \pm 37,70^{Aa}$
GCP	$70,46 \pm 9,42^{Ba}$	$412,00 \pm 3,46^{Ab}$
GPRO	$72,63 \pm 8,14^{Ba}$	$424,40 \pm 18,28^{Ab}$
GPRE	$70,77 \pm 6,73^{Ba}$	$425,60 \pm 8,91^{Ab}$
GS	$74,06 \pm 6,72^{Ba}$	$437,00 \pm 26,24^{Aab}$

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

GCN: animais sadios que consumiam apenas a ração comercial; GCP: animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO.

Mensalmente, determinou-se a concentração de FOS presente no extrato aquoso de yacon e a média encontrada foi de $37,67\% \pm 7,09$, sem diferença estatística entre os lotes analisados.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISES DEPENDENTE DE CULTIVO

Na Tabela 2, observa-se as populações bacterianas referentes aos principais gêneros pertencentes à microbiota intestinal, no tempo inicial (T0), ou seja, antes da administração dos tratamentos, tempo intermediário, que é referente à 4 meses de protocolo experimental (TI) e após 8 meses de protocolo experimental, ou seja, tempo final (TF).

Para o gênero *Enterococcus* spp., nota-se que todos os grupos com exceção de GS, aumentaram de forma significativa a população desse gênero bacteriano, quando compara-se T0 e TI. Esse foi maior que 1 ciclo log, exceto para GCP, que aumentou 0,39 ciclo log. No final do protocolo experimental (TF), os grupos tratados apresentaram contagem superior (GPRO: 7,52±0,06 log UFC/g, GPRE: 7,46±0,05 log UFC/g e GS: 8,48±0,03 log UFC/g) à encontrada em T0 (GPRO: 7,12±0,08 log UFC/g, GPRE: 6,56±0,01 log UFC/g e GS: 8,48±0,00 log UFC/g). E os grupos GCN e GCP apresentaram contagem inferior à T0, mostrando redução significativa nessa população de microrganismos (6,49±0,03 log UFC/g e 7,75±0,03 log UFC/g, respectivamente).

Em relação às enterobactérias, apenas o GS apresentou redução na contagem dessa população no tempo intermediário, sendo essa de 0,45 ciclo log ($p < 0,005$). Os outros grupos aumentaram a contagem desse gênero, porém o aumento apresentado pelo GCP foi de apenas 0,14 ciclo log. Já em relação ao tempo final, os grupos GCN, GPRO e GPRE reduziram a contagem, de 0,8 ciclo log, 2,87 ciclos log e, 3,12 ciclos log, respectivamente. Em relação à contagem apresentada por GPRO e GPRE, essas foram as menores encontradas durante todo o protocolo experimental (GPRO: 4,69±0,02 log UFC/g e GPRE: 5,28±0,02 log UFC/g).

Já para a população de *Lactobacillus* spp., todos os grupos, com exceção de GS apresentaram redução da população do tempo inicial para tempo intermediário. O GS aumentou a contagem desse gênero em 0,69 ciclo log, porém no final do protocolo, para esse mesmo grupo, houve redução de 0,54 ciclo log em sua contagem. O grupo que recebeu somente o *L. acidophilus* CRL 1014, no final do protocolo experimental, apresentou aumento de 0,63 ciclo log. O aumento também foi encontrado pelo GCP, porém em 0,50 ciclo log. Os demais grupos, reduziram a contagem de *Lactobacillus* spp., no final do protocolo experimental. Para *Bifidobacterium* spp., todos os grupos, exceto o GS aumentaram a contagem no tempo intermediário, sendo que GPRO, foi o grupo que apresentou maior contagem em relação à esse gênero, ou seja, apresentou o aumento de 1,42 ciclo log. No final do protocolo experimental, GPRE e GS aumentaram a contagem de *Bifidobacterium* spp, sendo 0,06 ciclo log e 0,40 ciclo log, respectivamente. Os demais grupos experimentais reduziram a contagem desse microrganismo.

Com relação aos *Bacteroides* spp., no final do protocolo experimental, todos os grupos aumentaram a contagem desse gênero, porém, o resultado de GS foi o que menos se diferiu do T0, uma vez que seu aumento foi apenas de 0,03 ciclo log. Já o GCP foi o grupo que apresentou contagem mais alta, sendo essa de 5,47 UFC/g e seu aumento foi de 0,61 no final do protocolo experimental.

Em relação aos anaeróbios facultativos, todos os grupos experimentais aumentaram sua população tanto no tempo intermediário, quanto no tempo final, sendo que GPRO foi o único grupo experimental que obteve aumento inferior à 1 ciclo log, quando comparado TI e TF. Ao comparar T0 e TF, encontrou-se aumento de houve aumento para todos GCN: 2,88 log UFC/g para GCN, 1,23 log UFC/g para CGP, 1,84 log UFC/g para GPRO, 1,91 log UFC/g para GPRE e, 2,65 log UFC/g para GS.

Para os aeróbios totais, os grupos CGN e GS apresentaram comportamento semelhante, uma vez que, ambos apresentaram redução da contagem no tempo intermediário e aumento no tempo final do protocolo experimental. Comportamento semelhante também foi encontrado entre GCP e GPRE, pois esses aumentaram a contagem de aeróbios totais tanto no tempo intermediário quanto no tempo final. O único grupo que apresentou redução na contagem dessa população (1 ciclo log) no tempo final do protocolo experimental foi GPRO.

Em relação ao *Clostridium* spp., no tempo intermediário, todos os grupos em estudo apresentaram aumento na contagem desse gênero, porém esse aumento só permanece no final do protocolo para GCN (0,54 ciclo log), GCP (1,47 ciclo log), GPRE (0,75 ciclo log) e GS (0,42 ciclo log). Já o grupo que recebeu *L. acidophilus* CRL 1014, foi o único grupo que reduziu a contagem de *Clostridium* spp, no final do protocolo, sendo essa de 0,63 ciclo log.

Tabela 2. População dos principais gêneros bacterianos (média e desvio padrão) (log UFC/g) isolada das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais em diferentes períodos.

Gêneros Bacterianos	GCN	GCP	GPRO	GPRE	GS
T.0					
<i>Enterococcus</i> spp.	6,63±0,06 ^{Bd}	7,97±0,00 ^{Bb}	7,12±0,08 ^{Cc}	6,56±0,01 ^{Cd}	8,40±0,00 ^{Ba}
Enterobactérias	5,40±0,00 ^{Cd}	7,40±0,00 ^{Ca}	5,40±0,00 ^{Bd}	6,52±0,01 ^{Bb}	6,04±0,04 ^{Bc}
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,08±0,04 ^{Ae}	8,26±0,00 ^{Bd}	8,36±0,02 ^{Bc}	8,84±0,05 ^{Ca}	8,59±0,03 ^{Cb}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,19±0,02 ^{Cd}	7,84±0,04 ^{Bc}	8,31±0,04 ^{Bb}	8,39±0,03 ^{Bb}	8,78±0,01 ^{Aa}
<i>Clostridium</i> spp.	6,51±0,03 ^{Cc}	8,40±0,00 ^{Ba}	6,54±0,05 ^{Cc}	7,11±0,02 ^{Cb}	8,40±0,00 ^{Ca}
Aeróbios Totais	8,40±0,00 ^{Bd}	8,46±0,07 ^{Bc}	8,87±0,03 ^{Ca}	6,75±0,05 ^{Ce}	8,76±0,02 ^{Bb}
Anaeróbios Facultativos	6,30±0,00 ^{Ce}	8,46±0,07 ^{Ba}	6,59±0,11 ^{Bd}	7,61±0,04 ^{Cb}	7,40±0,00 ^{Cc}
<i>Bacteroides</i> spp.	4,40±0,00 ^{Cbc}	4,86±0,02 ^{Ba}	3,78±0,00 ^{Bd}	4,30±0,09 ^{Cc}	4,46±0,01 ^{Bb}
T.I					
<i>Enterococcus</i> spp.	8,17±0,03 ^{Ac}	8,36±0,02 ^{Ab}	8,44±0,01 ^{Aa}	8,47±0,01 ^{Aa}	8,35±0,02 ^{Bb}
Enterobactérias	6,50±0,01 ^{Ac}	7,54±0,05 ^{Bb}	7,56±0,04 ^{Ab}	8,40±0,00 ^{Aa}	5,59±0,26 ^{Cd}
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,00±0,04 ^{Ac}	8,08±0,01 ^{Cc}	8,36±0,03 ^{Bb}	8,01±0,00 ^{Bc}	9,28±0,04 ^{Aa}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,00±0,02 ^{Ae}	8,20±0,02 ^{Ad}	9,73±0,03 ^{Aa}	8,45±0,01 ^{ABb}	8,34±0,06 ^{Bc}
<i>Clostridium</i> spp.	8,24±0,01 ^{Bc}	8,31±0,06 ^{Cc}	9,11±0,04 ^{Aa}	8,57±0,05 ^{Bb}	8,53±0,02 ^{Bb}
Aeróbios Totais	7,80±0,03 ^{Ce}	8,53±0,04 ^{Bc}	9,48±0,02 ^{Aa}	8,62±0,03 ^{Bb}	8,36±0,00 ^{Cd}
Anaeróbios Facultativos	7,96±0,08 ^{Bc}	8,53±0,04 ^{Ba}	8,28±0,02 ^{Ab}	8,46±0,07 ^{Ba}	8,37±0,01 ^{Bab}
<i>Bacteroides</i> spp.	4,51±0,03 ^{Bbc}	4,63±0,01 ^{Cab}	4,52±0,06 ^{Abc}	4,45±0,02 ^{Bc}	4,58±0,00 ^{Ab}
T.F					
<i>Enterococcus</i> spp.	6,49±0,03 ^{Cd}	7,75±0,03 ^{Cb}	7,52±0,06 ^{Bc}	7,46±0,05 ^{Bc}	8,48±0,03 ^{Aa}
Enterobactérias	5,67±0,06 ^{Bc}	8,43±0,03 ^{Aa}	4,69±0,02 ^{Ce}	5,28±0,02 ^{Cd}	6,61±0,02 ^{Ab}
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,59±0,02 ^{Bd}	8,58±0,03 ^{Ac}	8,99±0,01 ^{Aa}	7,67±0,05 ^{Ad}	8,74±0,04 ^{Bb}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,24±0,01 ^{Be}	7,61±0,03 ^{Cd}	8,15±0,04 ^{Cc}	8,51±0,06 ^{Ab}	8,74±0,02 ^{Aa}
<i>Clostridium</i> spp.	8,78±0,01 ^{Ad}	9,78±0,02 ^{Aa}	8,48±0,03 ^{Bc}	9,32±0,04 ^{Ab}	8,95±0,01 ^{Ac}
Aeróbios Totais	8,58±0,03 ^{Ac}	9,69±0,04 ^{Ab}	8,48±0,07 ^{Bc}	9,60±0,01 ^{Ab}	9,83±0,03 ^{Aa}
Anaeróbios Facultativos	9,18±0,01 ^{Ad}	9,69±0,04 ^{Aa}	8,43±0,03 ^{Ac}	9,52±0,06 ^{Ac}	10,05±0,01 ^{Ab}
<i>Bacteroides</i> spp.	4,83±0,03 ^{Ab}	5,47±0,02 ^{Aa}	4,48±0,02 ^{Ad}	4,69±0,01 ^{Ac}	4,49±0,01 ^{Bd}

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05).

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05).

GCN: animais sadios que consumiam apenas a ração comercial; GCP: animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

T0: tempo inicial do protocolo experimental; TI: tempo intermediário do protocolo experimental; TF: tempo final do protocolo experimental.

ANÁLISES INDEPENDENTE DE CULTIVO

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SPP. POR PCR-DGGE

Com o intuito de comparar o efeito dos diferentes tratamentos em relação à composição da população de *Lactobacillus* spp., nos diferentes tempos de protocolo experimental, foi gerado um dendograma (Figura 2). Nesse, houve a formação de dois principais agrupamentos, os quais se separam de acordo com a similaridade encontrada nos perfis de bandas. A análise de similaridade foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Assim, no grupo denominado como Grupo 1, juntou-se os tratamentos dos tempos intermediário e tempo final de protocolo experimental. Já no Grupo 2, houve a junção dos tratamentos No tempo inicial do protocolo experimental.

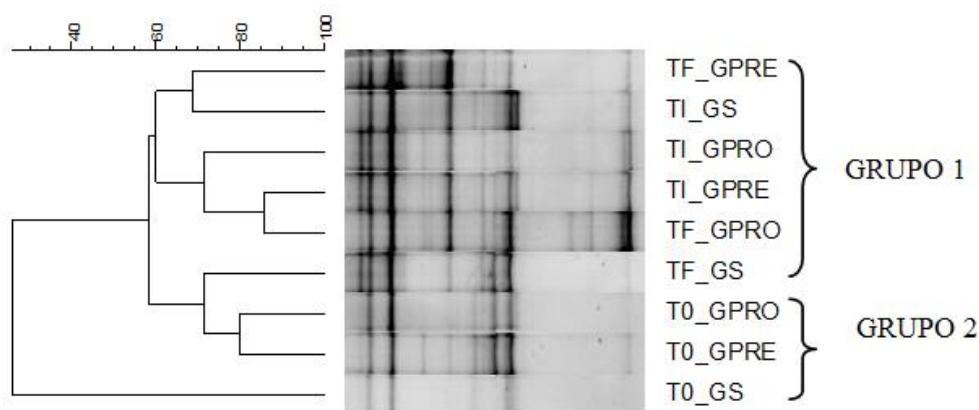


Figura 2. Dendograma e percentual de similaridade (%) entre os perfis de bandas dos diferentes tratamentos dos grupos em estudo.

T0 PRO: GPRO em tempo inicial de protocolo experimental; T0 PRE: GPRE em tempo inicial de protocolo experimental; T0 S: GS em tempo inicial de protocolo experimental; TI PRO: GPRO em tempo intermediário de protocolo experimental; TI PRE: GPRE em tempo intermediário de protocolo experimental; TI S: GS em tempo intermediário de protocolo experimental; TF PRO: GPRO em tempo final de protocolo experimental; TF PRE: GPRE em tempo final de protocolo experimental; TF S: GS em tempo final de protocolo experimental.

INTERPRETAÇÃO ECOLÓGICA (RIQUEZA E FUNCIONALIDADE) DA POPULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SPP.

Com o objetivo de realizar uma interpretação ecológica dos resultados de DGGE, foi utilizada uma abordagem baseada em duas análises, a de riqueza (Rr), e a de organização funcional (Fo) (MARZORATI et al., 2008; MARZORATI et al. 2010).

A Figura 3a apresenta os resultados da análise de riqueza da comunidade de *Lactobacillus* spp. durante os tempos inicial, intermediário e final do protocolo experimental nos animais que receberam tratamento.

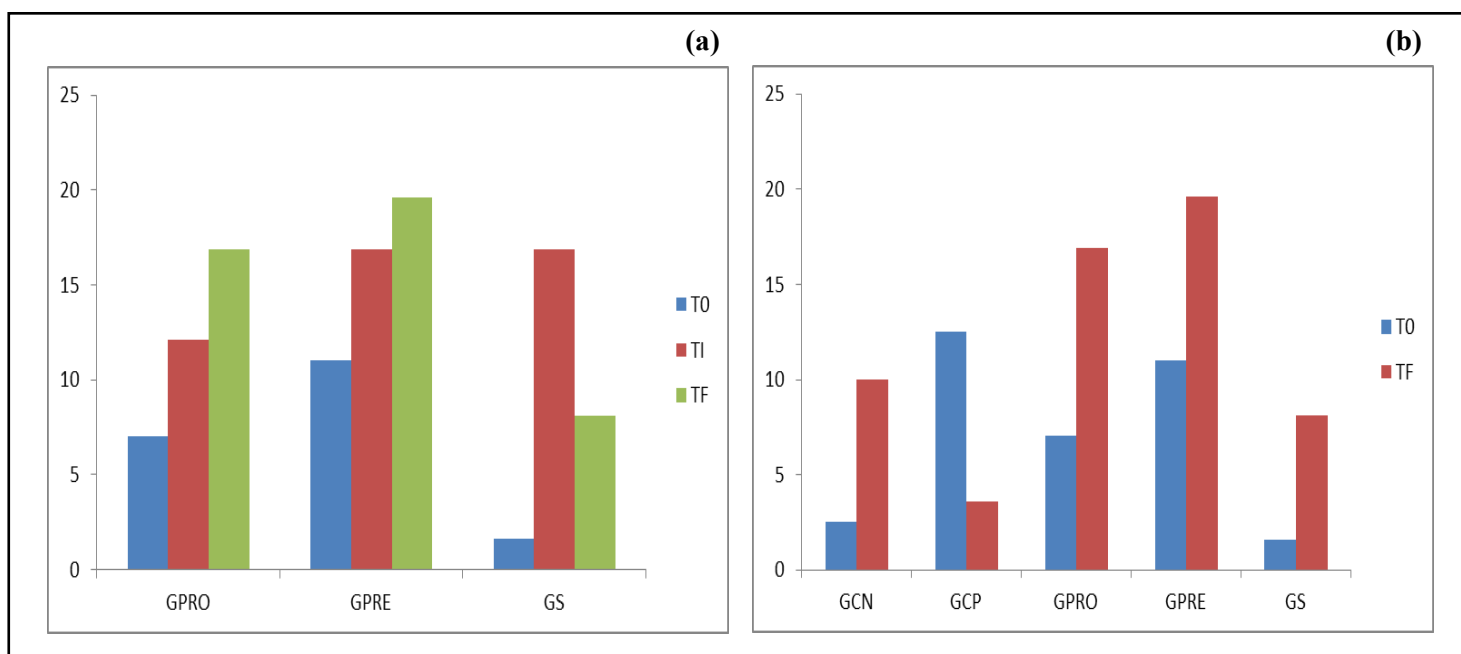


Figura 3a. Nível de riqueza (Rr) apresentada pelos grupos que receberam tratamento durante o protocolo experimental. **3b.** Nível de riqueza (Rr) apresentada por todos os grupos experimentais durante o protocolo experimental.

GCN: animais sadios que consumiam apenas a ração comercial; GCP: animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon. TO: tempo inicial do protocolo experimental; TI: tempo intermediário do protocolo experimental; TF: tempo final do protocolo experimental.

A Figura 3a mostra que houve maior enriquecimento na população de *Lactobacillus* spp. nos grupos que consumiram probiótico (GPRO) e prebiótico (GPRE) e, esse enriquecimento é presente tanto no tempo intermediário, quanto no tempo final do protocolo experimental. Em relação ao grupo que foi tratado com simbiótico (GS),

houve enriquecimento na população de *Lactobacillus* spp. apenas no tempo intermediário do protocolo experimental, pois no tempo final, há uma queda na população desse microrganismo. Ao comparar essa queda com os resultados apresentados na análise microbiológica convencional, nota-se que nesse mesmo período a contagem de *Lactobacillus* spp., estava em $9,28 \pm 0,04$ UFC/g e passa para $8,74 \pm 0,04$ UFC/g no final do protocolo experimental.

A Figura 3b, mostra que ao comparar o tempo inicial do protocolo experimental com o tempo final, todos os grupos experimentais com exceção do GCP apresentaram um maior enriquecimento em relação à população de *Lactobacillus* spp., sendo que, os grupos GPRO e GPRE, apresentaram uma riqueza classificada como média, esse resultado não foi encontrado nos demais grupos.

A Figura 4 mostra os resultados da funcionalidade da população de *Lactobacillus* spp. apresentada pelos grupos GPRO, GPRE e GS, durante os diferentes tempos estudados no protocolo experimental, ou seja, tempo inicial, tempo intermediário e tempo final.

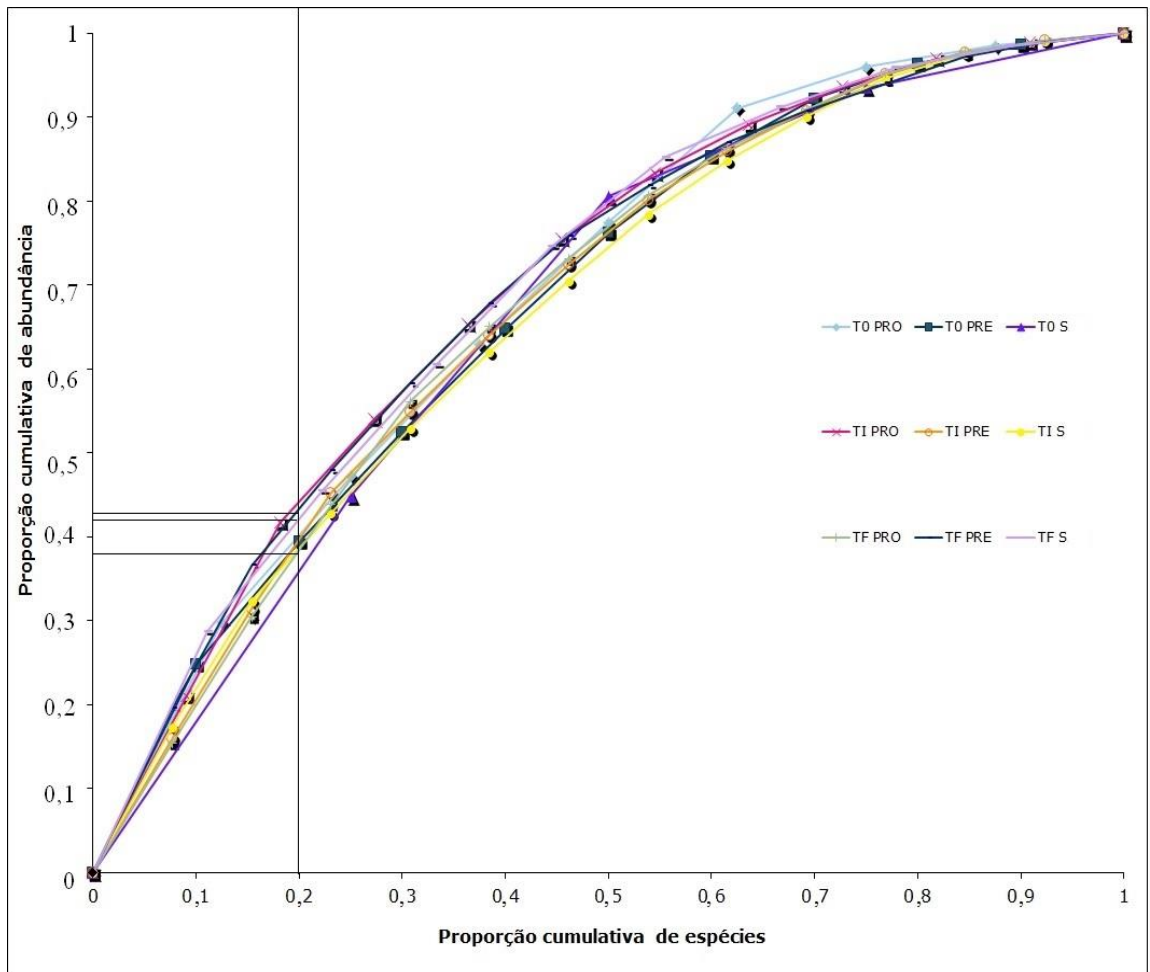


Figura 4. Curva de Pareto-Lorenz dos diferentes grupos em estudo que receberam tratamento em tempo inicial, intermediário e final de protocolo experimental.

T0 PRO: GPRO em tempo inicial de protocolo experimental; T0 PRE: GPRE em tempo inicial de protocolo experimental; T0 S: GS em tempo inicial de protocolo experimental; TI PRO: GPRO em tempo intermediário de protocolo experimental; TI PRE: GPRE em tempo intermediário de protocolo experimental; TI S: GS em tempo intermediário de protocolo experimental; TF PRO: GPRO em tempo final de protocolo experimental; TF PRE: GPRE em tempo final de protocolo experimental; TF S: GS em tempo final de protocolo experimental.

De uma maneira geral, todos os grupos independente do tratamento e do tempo do protocolo experimental analisados, encontram-se acima de PL 20-25%. No entanto, na mesma figura, nota-se que GPRO, GPRE e GS, após os 8 meses de protocolo experimental, apresentam seus pontos próximos ao de 40%.

Em relação ao coeficiente de Gini, a Figura 5 mostra que o único grupo em estudo que reduziu o valor de Gini durante o protocolo experimental de 8 meses foi GPRO.

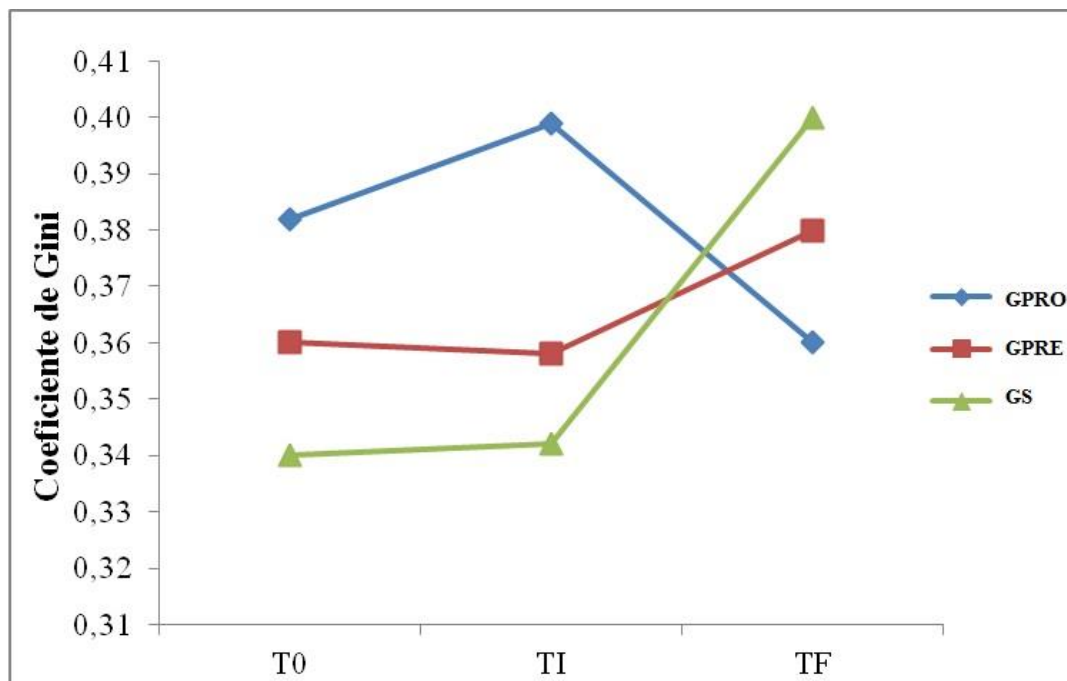


Figura 5. Coeficiente de Gini

GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

T0: tempo inicial do protocolo experimental; TI: tempo intermediário do protocolo experimental; TF: tempo final do protocolo experimental.

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MICROBIANO

VALORES DE ÍONS DE AMÔNIA

Em relação à produção de íons de amônia (Tabela 3), houve aumento dos valores ($p < 0,05$) em todos os grupos em relação ao tempo inicial e tempo intermediário, porém os valores encontrados nos grupos tratados (GPRO, GPRE e GS) são menores em comparação ao GCP, porém sem diferença significativa. No tempo final do protocolo experimental, todos os grupos aumentaram a produção de íons de amônia, porém o GS foi o único grupo que não apresentou aumento significativo em relação ao tempo intermediário do protocolo experimental, além disso, foi o grupo que apresenta menor valor de incremento de amônia.

Tabela 3. Valores de íons de amônia (ppm) e pH, média e desvio padrão, para diferentes grupos, no tempo inicial, tempo intermediário e após 8 meses de protocolo experimental.

Grupos	Íons de amônia (ppm)			
	T.0	T.I	T.F	Incremento
GCN	13,90±0,82 ^{Cb}	44,71±0,97 ^{Ba}	55,20±0,79 ^{Ac}	41,30±1,35 ^c
GCP	13,73±1,80 ^{Cb}	47,49±7,13 ^{Ba}	78,67±1,47 ^{Aa}	64,93±2,46 ^a
GPRO	14,93±1,29 ^{Cb}	41,66±3,13 ^{Ba}	65,40±0,66 ^{Ab}	50,47±1,36 ^b
GPRE	9,71±0,70 ^{Cc}	41,92±2,47 ^{Ba}	62,60±0,92 ^{Ab}	52,82±1,31 ^b
GS	28,93±0,40 ^{Ca}	46,56±0,47 ^{Ba}	48,97±1,17 ^{Ad}	20,03±0,78 ^d

Grupos	pH			
	T.0	T.I	T.F	Incremento
GCN	7,08±0,03 ^{Cd}	8,11±0,27 ^{Ba}	8,47±0,04 ^{Aa}	1,39±0,06 ^a
GCP	7,14±0,02 ^{Cc}	8,03±0,29 ^{Ba}	8,49±0,04 ^{Aa}	1,35±0,04 ^a
GPRO	7,42±0,03 ^{Ba}	8,23±0,08 ^{Aa}	6,65±0,02 ^{Cd}	-0,74±0,05 ^d
GPRE	7,20±0,01 ^{Bb}	7,45±0,05 ^{Ab}	7,00±0,01 ^{Cc}	-0,20±0,01 ^c
GS	7,07±0,02 ^{Cd}	7,64±0,11 ^{Aab}	7,18±0,03 ^{Bb}	0,11±0,03 ^b

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

GCN: animais saudáveis que consumiam apenas a ração comercial; GCP: animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

Cálculo de Incremento: Produção de íons de amônia em T.F – Produção de íons de amônia em T.0

T0: tempo inicial do protocolo experimental; TI: tempo intermediário do protocolo experimental; TF: tempo final do protocolo experimental.

VALORES DE PH

Para os valores de pH, pode-se observar que de uma maneira geral, quando comparados os tempos inicial e intermediário, há aumento nestes valores para todos os grupos em estudo (Tabela 3). Também, verifica-se que, no tempo final do protocolo, houve diferença significativa entre os valores encontrados nos diferentes grupos, porém, aqueles que receberam tratamento (GPRO, GPRE e GS) apresentaram valores inferiores aos grupos controles (GCN e GCP).

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)

Encontrou-se em média 78,94; 86,52 e 83,28% de ácido acético, nos tempos inicial, intermediário, e final, respectivamente, o que corresponde a 84,09% total de ácidos graxos de cadeia curta produzidos. A Figura 6a mostra que, no tempo inicial, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais em relação à produção de ácido acético, uma vez que nesse período os animais eram sadios, apresentando comportamento semelhante na produção desse ácido. Além disso, observa-se que, todos os grupos aumentaram a produção de acetato no tempo intermediário do protocolo experimental de forma significativa, porém apenas os grupos que receberam *L. acidophilus* (GPRO e GS), foram os que não apresentaram redução de forma significativa no final do protocolo experimental.

Em relação à produção de ácido propiônico (Figura 6b), observou-se um aumento ($p < 0,05$) todos os grupos no tempo intermediário do protocolo experimental. No entanto, no final dos 8 meses de protocolo, os grupos GCN e GS, reduziram a produção desse AGCC. Em contrapartida, GPRO foi o grupo que mais produziu esse AGCC em valor absoluto ($6,33 \pm 2,31$ mMol ácido propiônico/g).

Para o ácido butírico (Figura 6c), observa-se que em relação aos diferentes tempos do protocolo experimental que foram analisados, apenas o GCP aumentou de forma significativa a produção de butirato. A produção de ácido butírico no tempo final do protocolo experimental foi semelhante ao ácido propiônico, uma vez que, o grupo probiótico foi o que apresentou maior produção em valores absolutos ($2,04 \pm 1,32$ mMol ácido butírico/g).

Referente à produção total de AGCC (Figura 6d), pode-se observar que no tempo inicial do protocolo experimental, todos os grupos em estudo apresentaram semelhança na concentração total de AGCC, pois não houve diferença estatística significativa entre esses. Já, em relação à produção de AGCC no tempo intermediário, todos os grupos aumentaram de forma significativa à produção desses, porém, o aumento só prevaleceu para GPRO no final do protocolo experimental.

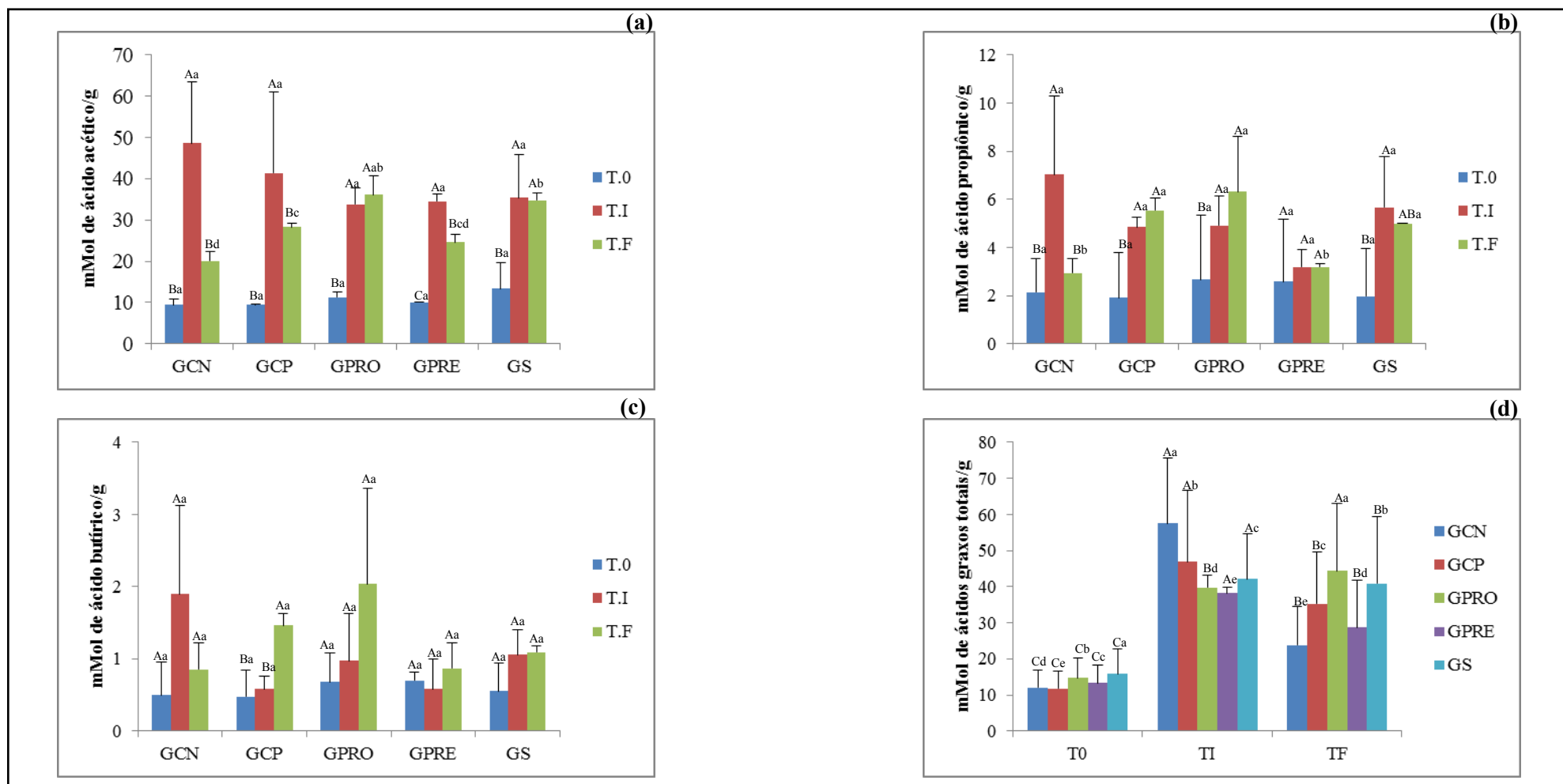


Figura 6a. Produção de ácido acético (mMol/g) para os diferentes grupos estudados em tempo inicial, intermediário e final de protocolo experimental. **6b.** Produção de ácido propiônico (mMol/g) para os diferentes grupos estudados em tempo inicial, intermediário e final de protocolo experimental. **6c.** Produção de ácido butírico (mMol/g) para os diferentes grupos estudados em tempo inicial, intermediário e final de protocolo experimental. **6d.** Produção total de ácidos graxos de cadeia curta (mMol/g) para os diferentes grupos estudados em tempo inicial, intermediário e final de protocolo experimental.

Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre os grupos ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre os tempos ($p < 0,05$).

GCN: animais saudáveis que consumiam apenas a ração comercial; GCP: animais induzidos com DMH que consumiam apenas a ração comercial; GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

T0: tempo inicial do protocolo experimental; TI: tempo intermediário do protocolo experimental; TF: tempo final do protocolo experimental.

EFEITO DOS TRATAMENTOS APÓS 8 MESES DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL NOS ANIMAIS INDUZIDOS QUIMICAMENTE AO CÂNCER DE CÓLON.

Após os 8 meses de protocolo experimental foram analisadas as diferentes variáveis estudadas na presente pesquisa. A Figura 7 mostra que, em relação à população de *Lactobacillus* spp., o GPRO foi o que apresentou maior contagem no final do protocolo experimental, sendo essa de 8,99 UFC/g, além disso, observa-se no GPRO redução de pH fecal, aumento na produção total de AGCC e de riqueza para a população de *Lactobacillus* spp.

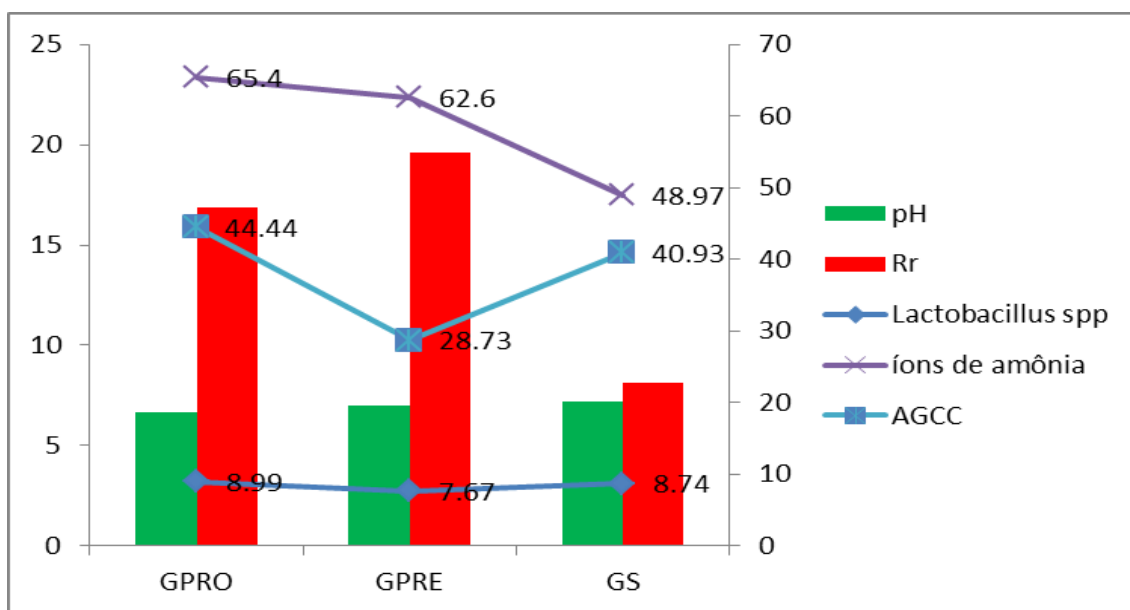


Figura 7. Efeito dos tratamentos após 8 meses de protocolo experimental nos animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon sob análise de pH, riqueza (Rr), contagem de *Lactobacillus* spp (UFC/g), íons de amônia (ppm) e AGCC (mMol/g).

GPRO: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014; GPRE: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + yacon; GS: animais induzidos com DMH que consumiam ração comercial + *L. acidophilus* CRL 1014 + yacon.

Já o GPRE, foi o grupo o qual apresentou maior riqueza na população de *Lactobacillus* spp, em relação à análise do ecossistema microbiano e, GS, foi o grupo experimental que apresentou menor produção de íons de amônia.

DISCUSSÃO

Vários estudos vêm demonstrando que o consumo de probióticos pode modular a microbiota residente, e, conseqüentemente, alterar a atividade metabólica da microbiota intestinal (RAFTER, 2003; GUEIMONDE; SALMINEN, 2006).

Alguns autores conseguiram verificar modificações na microbiota intestinal em animais que consumiram probióticos, como *Enterococcus faecium* (SIVIERI et al., 2008), *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium longum* (SALAZAR et al., 2011) e *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus plantarum* (HAKANSSON et al., 2012), prebióticos como inulina (ROOLER et al., 2004; SZABADOSOVA et al., 2013) e simbióticos, com associação de FOS e *Lactobacillus acidophilus* (SWANSON et al., 2002) e associação de FOS, GOS ou inulina com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus casei* (SU; HENRIKSSON; MITCHELL, 2007).

Na presente pesquisa, houve modificação da microbiota em relação às bactérias comensais nos grupos que receberam *L. acidophilus* CRL 1014 (GPRO e GS).

Estudos clínicos mostram os efeitos benéficos na modulação da microbiota intestinal após o consumo de *L. acidophilus* ou FOS. Savard et al., (2011) avaliaram o impacto do consumo de quatro semanas de iogurte comercial com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), e *Lactobacillus acidophilus* (LA 5) sobre a população bacteriana nas fezes de adultos saudáveis. Foi observado um aumento de bactérias comensais (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), *Lactobacillus acidophilus* (LA5), *Lactobacillus* spp., e redução daquelas consideradas potencialmente patogênicas (*Enterococcus* spp.). A utilização de FOS foi eficaz no trabalho realizado por Gibson et al. (1995), pois o consumo desse prebiótico por indivíduos saudáveis (15 g/dia) por 15 dias resultou no aumento significativo de *Bifidobacterium* spp., e na redução de *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp.

É importante ressaltar também que a redução na população do gênero *Clostridium* spp., é benéfica ao organismo, pois algumas bactérias pertencentes a esse gênero podem ser prejudiciais devido a sua atividade metabólica ou caráter patogênico de algumas espécies. O mesmo ocorre para algumas espécies de enterobactérias, além de apresentarem potencial patogênico, estão associadas à disbiose intestinal, quando encontradas em elevadas contagens (MONTESI et al., 1988; ALMEIDA et al., 2008).

Os grupos GPRO e GPRE apresentaram redução significativa (0,71 ciclo log e, 1,24 ciclo log, respectivamente) na contagem de enterobactérias no final do protocolo experimental, porém, em relação ao gênero *Clostridium* spp., não foi encontrada redução no tempo final do experimento, apesar de a menor contagem dessa população ter sido apresentada pelo GPRO.

Aproximadamente 70-80% da microbiota intestinal é incultivável em meios de cultura tradicionais, portanto, para se analisar de forma mais precisa o comportamento do ecossistema de *Lactobacillus* spp., foi realizada a análise molecular independente de cultivo (PCR-DGGE). (POSSEMIERS et al., 2004). Esse método utilizado nos estudos de ecologia microbiana com resultados representativos na identificação da riqueza e abundância de diferentes filotipos das amostras e possibilita estimativas reais da diversidade microbiana (HUYS; VANHOUTTE; VANDAMME, 2008).

O resultado dessa análise se dá a partir da formação de um dendograma que separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes. Sendo assim, houve a formação de 2 grandes grupos, sendo que em um deles houve o agrupamento dos tratamentos dos tempos intermediário e tempo final de protocolo experimental (Grupo 1), já no outro grupo (Grupo 2), houve a junção dos tratamentos no tempo inicial do protocolo experimental. Esse resultado se justifica pelo fato dos animais no início do protocolo experimental apresentarem o mesmo tratamento, ou seja, foram alimentados apenas com a ração comercial. Sendo assim, encontrou-se uma alta similaridade na população de *Lactobacillus* spp. entre os grupos. Em

contra partida, o agrupamento dos tempos intermediários e finais mostra que com a administração de probiótico, prebiótico e simbiótico, houve mudança na microbiota intestinal desses animais em relação à população de *Lactobacillus* spp., uma vez que, houve aumento no número de bandas nesses tratamentos quando comparados ao tempo inicial do protocolo experimental.

Em relação à riqueza, todos os grupos em estudo apresentaram-se mais ricos ao longo do protocolo experimental, com exceção do GCP para o gênero *Lactobacillus* spp. Segundo Morzarati et al. (2008), uma população com Rr abaixo de 10 é considerada de baixa riqueza, já uma população com Rr entre 10 e 30 e acima de 30 são consideradas de média e alta riqueza, respectivamente. Esta última caracteriza-se como uma população típica de ambientes muito saudáveis, caracterizada por uma alta diversidade microbiana. Desta forma, pode-se afirmar que a administração de probiótico e prebiótico gerou um ambiente mais saudável nos animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon, uma vez que durante o protocolo experimental, a riqueza desses tratamentos aumentou (Rr entre 10 e 30), porém o mesmo não ocorreu para o GS. A indução química ao câncer de cólon aos animais pertencentes ao GCP pode ter influenciado na redução da riqueza a esse grupo, uma vez que o GCN (animais saudáveis) também aumentou sua riqueza ao longo do protocolo experimental.

Para maior compreensão do comportamento da população microbiana dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, foi construída uma curva de Pareto-Lorenz. De acordo com Marzorati et al. (2008), a interpretação destas curvas está baseada na hipótese de que a distribuição das espécies dentro de uma determinada população microbiana relata a capacidade de otimizar e conservar sua funcionalidade, mesmo diante de condições adversas. A organização funcional (Fo) é um valor numérico utilizado para descrever a uniformidade de uma população microbiana como descrito na curva de Pareto-Lorenz (PL) (MARZORATI et al., 2008). Utilizou-

se como padrão de referência o ponto das abscissas de 20% (MARZORATI et al., 2008; WITTEBOLLE et al., 2008).

Todos os grupos, independente do tratamento e tempo do protocolo experimental (tempo inicial, tempo intermediário ou tempo final), apresentaram valores superiores ao de PL 20-25%. Segundo Marzorati et al. (2008), em termos ecológicos, uma curva PL entre 20-25% , representa uma comunidade de elevada uniformidade, que pode não apresentar uma estrutura interna bem estabelecida em termos de espécies dominantes. Como não há espécies presentes em altas concentrações, pode ser necessária uma longa fase lag para combater exposições repentinas ao estresse. Desta forma, esta comunidade é comumente relatada como sendo uma comunidade de baixa organização funcional. Os resultados encontrados no tempo final do protocolo experimental mostraram que os grupos GPRO, GPRE e GS, apresentam seus pontos próximos ao de 40%, mostrando que há uma população com baixa uniformidade quando comparada à descrita anteriormente; entretanto, é comumente relatada como uma população bastante balanceada, com grande potencial em lidar com alterações ambientais, preservando sua funcionalidade (MARZORATI et al., 2008; CARBALLA et al., 2011). Também, vale ressaltar que, uma curva PL igual ou acima de 80% representa uma comunidade especializada, na qual pequena quantidade de espécies é dominante e todas as outras estão presentes em baixas quantidades, com grande diferença entre os dois grupos. Esta comunidade apesar de ter uma alta organização funcional, costuma ser frágil à mudanças externas em decorrência da necessidade de uma longa fase lag, assim como a primeira comunidade relatada (MARZORATI et al., 2008; CARBALLA et al., 2011).

Em relação ao coeficiente de Gini, seus valores podem variar entre 0 a 1, sendo que esse valor é o único que descreve um grau específico de uniformidade. Segundo Wittebolle et al. (2009), quanto maior for o valor encontrado no coeficiente de Gini, mais desigual é uma comunidade microbiana. Os resultados encontrados na presente pesquisa mostraram que o único

grupo em estudo que reduziu o valor de Gini durante o protocolo experimental de 8 meses foi o grupo que recebeu diariamente somente o *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, ou seja, GPRO.

Os produtos da degradação de proteínas no cólon são considerados prejudiciais à saúde intestinal. Entre esses produtos estão compostos nitrosos, fenóis, indóis e amônia (RICHARDSON; MCKAIN; WALLACE, 2013).

A amônia é uma toxina resultante da quebra de proteínas pelas bactérias intestinais, fazendo parte dos metabólitos bacterianos que são considerados carcinogênicos; portanto, acredita-se que ela esteja relacionado com neoplasias no intestino (BEDANI, ROSSI, 2009). Esse metabólito é encontrado em maior concentração no cólon descendente e, está relacionada com a oxidação de AGCC, ou seja, elevadas concentrações de íons de amônia, reduzem a produção de AGCC no cólon, metabólitos envolvidos na diminuição de risco de câncer de cólon (HOPE et al., 2005; DAVILA et al., 2013).

Na presente pesquisa, não houve redução na produção de íons de amônia por nenhum dos diferentes grupos em estudo; porém, vale ressaltar que todos os grupos que receberam tratamento (GPRO, GPRE e GS) apresentaram resultados inferiores ao apresentado pelo GCP, no final do protocolo experimental.

Goldin e Gorbach (1984), em seu estudo com modelo animal, verificaram que a administração de *L. acidophilus* foi capaz de reduzir a concentração de amônia fecal. Rowland et al., (1998) verificaram que a associação de *B. longum* na concentração de 4×10^8 UFC/g e inulina foi capaz de diminuir a concentração de íons de amônia em ratos.

Segundo Benno e Mitsouka (1992), há uma ampla variedade de microrganismos produtores de amônia, como por exemplo, enterobactérias, *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp. A análise microbiológica mostrou que os grupos que receberam tratamento GPRO e GPRE, foram os que apresentaram redução na contagem de enterobactérias no tempo final do protocolo experimental. O GPRO também foi o único grupo experimental que reduziu a contagem de *Clostridium* spp., no tempo final do protocolo experimental, já o GS foi o único grupo que no tempo final de protocolo não apresentou diferença significativa em relação a população de *Bacteroides* spp. Sendo assim, pode-se supor que a administração de probiótico, prebiótico ou a combinação simbiótica ajudou no controle da produção de íons de amônia, bem como, da multiplicação de algumas espécies patogênicas.

Para os valores de pH, alguns autores propõem que níveis elevados de pH fecal podem estar relacionados ao aumento do risco de câncer de cólon, assim como a acidificação do cólon pode prevenir a formação de carcinógenos pela inibição do crescimento de espécies bacterianas potencialmente patogênicas (*Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., e *Proteus* spp.) em detrimento de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (THORNTON, 1981; MODLER; MCKELLAR; YAGUCHI, 1990; PYE et al., 1990; GIBSON, 2004).

Os resultados da presente pesquisa mostraram que os grupos que receberam o probiótico (GPRO) e o prebiótico (GPRE) reduziram de forma significativa os valores de pH fecal no final do protocolo experimental e, o GCP foi o que apresentou maior valor de pH. Resultados semelhantes foram encontrados por Szabadosova et al. (2013), que observaram redução de pH no grupo que recebeu prebiótico e aumento no grupo induzido por DMH. Essa redução pode ser devida à fermentação de frutanos, cujo resultado é a formação de ácidos (AGCC e ácido láctico), que acidificam o cólon e, conseqüentemente, reduzem o pH fecal (MANNING; GIBSON, 2004; BIBAS BONET et al., 2010).

A redução de pH fecal também ocorreu em um estudo clínico realizado por Benno e Mitsouka (1992), no qual foi administrado *B. longum* por 5 semanas a homens saudáveis. Em contrapartida, Búrigo et al. (2007), em estudo clínico, verificaram o efeito bifidogênico do FOS em pacientes com neoplasias hematológicas e não encontraram diferença significativa nos valores de pH fecal entre os grupo controle e suplementado com FOS; porém, notou-se uma pequena redução do pH no grupo suplementado e uma discreta elevação no grupo controle.

Com o crescente interesse em se estudar probióticos e prebióticos, aumentou também consequentemente o mesmo em relação aos AGCC. Esses são produzidos a partir da ação de bactérias do cólon num processo de fermentação de fibras ingeridas na dieta. A definição de fibra dietética sugere a inclusão de oligossacarídeos e outros carboidratos não digeríveis, entre esses, o FOS. A fermentação envolve várias reações e processos metabólicos na degradação microbiana anaeróbia da matéria orgânica, produzindo energia metabolizável para multiplicação microbiana e outros produtos finais para a utilização por parte do hospedeiro (SAAD, 2006; WONG et al., 2006).

Experimentos com animais, principalmente ratos e porcos, mostram que há maior produção de AGCC no intestino, devido à fermentação de carboidratos. Porém, os ratos são considerados animais coprofágicos, ou seja, se alimentam das próprias fezes, mas, trata-se de uma prática natural de algumas espécies de animais. Por isso, há certa limitação nos valores de AGCC encontrados em estudos utilizando ratos como modelo animal (TOPPING; CLIFTON, 2001). Segundo alguns autores, a absorção de AGCC ocorre no ceco e no cólon e, apenas 5% a 10% é excretado nas fezes (ROBERFROID, 2007; WONG et al., 2006).

Os principais ácidos graxos de cadeia curta são: ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, os quais exercem papel fundamental na manutenção da saúde intestinal. Pesquisas mostram que a produção de AGCC fecal é encontrada na ordem de ácido acético > ácido propiônico \geq ácido butírico. Essa relação geralmente é constante, embora alterações possam

ocorrer devido à mudança na dieta (TOPPING; CLIFTON, 2001; HINNEBUSCH et al., 2002; PRYDE et al., 2002; HUDA-FAUJAN et al., 2010; DELGADO et al., 2013).

O ácido acético é o AGCC mais encontrado em fezes. Esse pode ser absorvido por tecidos periféricos e, bactérias presentes no intestino humano tem a capacidade de usar esse AGCC para sintetizar ácido butírico (DUNCAN et al., 2002). Os resultados de ácido acético encontrado na presente pesquisa, estão de acordo com os resultados de Duncan et al. (2012), uma vez que a média encontrada nos diferentes tempos estudados foi de 84,09%. O mesmo ocorreu na pesquisa realizada por de Moura et al. (2012), pois o acetato foi o AGCC mais encontrado nas fezes dos animais. Porém, esses pesquisadores encontraram maior concentração de acetato nos grupos experimentais que receberam prebiótico e simbiótico, o que diverge dos resultados encontrados na presente pesquisa, uma vez que o GPRO foi o grupo que mais produziu esse AGCC.

O ácido propiônico também está relacionado com a apoptose de células cancerígenas, tendo em vista que, sua ação é em menor grau, quando comparada com o butirato (TOPPING; CLIFTON, 2001; WONG et al., 2006).

Em relação ao propionato, no tempo intermediário de protocolo experimental, foi observado aumento significativo para todos os grupos experimentais, porém esse aumento só permanece no tempo final do protocolo nos grupos GCP, GPRO e GPRE. Esse resultado é divergente aos encontrados por de Moura et al. (2012), uma vez que não foi observada diferença significativa na produção de propionato entre os diferentes grupos em estudo.

O GPRO foi o grupo que apresentou, em valores absolutos, a maior produção de ácido propiônico. Esse resultado é diferente dos encontrados por Szabadosova et al., (2013). Esse grupo de pesquisa encontrou a maior produção (em valores absolutos) de propionato nas fezes de animais não induzidos quimicamente ao câncer de cólon.

Segundo alguns autores (BIRD; BROWN; TOPPING, 2000; HINNEBUSCH et al., 2002; WONG et al., 2006) o ácido butírico está relacionado com a diminuição do risco de câncer de cólon, uma vez que, é capaz de promover diferenciação celular, inibir atividades genotóxicas e induzir à apoptose de colonócitos.

As maiores concentrações de butirato foram observadas no GPRO. De Moura et al., (2012) observaram que os grupos que receberam probiótico (yacon 1%) e simbiótico (*L. casei* + yacon) aumentaram a concentração de butirato ($p < 0,05$).

Outas pesquisas, também mostraram o efeito positivo do consumo probiótico (FOS e inulina) sob a produção de butirato (RODRIGUES et al., 2012; SZABADOSOVA et al., 2013). Porém, esses resultados diferem-se dos encontrados na presente pesquisa, uma vez que GPRE foi o que menos produziu ácido butírico ao final do protocolo experimental.

Aumentos na produção de AGCC, podem resultar em diminuição do pH, o que influencia indiretamente a composição da microbiota do cólon pois, com o pH mais ácido, há redução de *Clostridium* spp. (WONG et al., 2006). Em concordância com o autor citado anteriormente, o GPRO foi o grupo que apresentou maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e o menor incremento em relação aos valores de pH. Em relação à microbiota intestinal, o GPRO apresentou redução de 0,63 ciclo log na população de *Clostridium* spp., ao final do protocolo experimental.

Assim, os resultados encontrados apontam que uma redução do risco de desenvolvimento do câncer de colón pode ser resultado da ação do consumo de probiótico e prebiótico, pois esses podem modular beneficamente a microbiota intestinal.

CONCLUSÃO

O estudo mostrou que a administração de probiótico, prebiótico e simbiótico modificou significativamente a microbiota intestinal de ratos Wistar induzidos quimicamente ao câncer de

cólon, pelos métodos dependentes e independentes de cultivo e reduziu o pH fecal dos grupos probióticos e prebióticos além de apresentarem aumento inferior aos controles em relação à produção de íons de amônia.

O consumo de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 influenciou de forma positiva a produção de AGCC. O GPRO foi o único que aumentou a produção de AGCC totais durante todo o protocolo e, em valores absolutos, aumentou também a produção de acetato, propionato e butirato.

Conclui-se que a administração diária de *L. acidophilus* 1014 ou extrato aquoso de yacon ou a associação de ambos, foi capaz de modificar positivamente os metabólitos bacterianos; porém, GPRO apresentou melhores resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.B.; MARINHO, C.B.; SOUZA, C.S.; CHEIB, V.B.P. Disbiose intestinal. **Rev Bras Nutr Clin**, v.24, n.1, p.58-65, 2009.

ALVES, L.B.; BELDERRAIN, M.C.N.; SCARPEL, R.A. Tratamento multivariado de dados por análise de correspondência e análise de agrupamentos. **Anais do 13º Encontro de iniciação científica e pós-graduação do ITA- XII ENCITA**, 2007.

AYBAR, M.J.; SÁNCHEZ RIERA, A.N.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S.S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v.4, p.125-132, 2001.

BALDWIN, C.; MILLETTE, M.; OTH, D.; RUIZ, M.T.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* mix sensitive colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. **Nutr Cancer**, v.62, p.371-378, 2010.

BEDANI, R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus Faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 122f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição - Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; DE VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. **J Sci Food Agric**, v.90, p.233-238, 2010.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A. Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre câncer de cólon. **J Port Gastrebterol**, v.15, p.19-28, 2009.

BENNO, Y.; MITSUOKA, T. Impact of Bifidobacterium on human fecal microflora. **Microbiol Immunol**, v.36, p.683-694, 1992.

BIBAS BONET, M.E.; MESON, O.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; DOGI, C.A.; CHAVES, S.; KORTSARZ, A. Prebiotic effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on intestinal mucosa using a mouse model. **Food Agric Immunol**, v.21, p.175-189, 2010.

BIRD, A.R.; BROWN, I.L.; TOPPING, D.L. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. **Curr Issues Intest Microbiol**, v.1, p.25-37, 2000.

BOLOGNANI, F.; RUMMEY, C.J.; POOL-ZOBEL, B.L.; ROWLAND, I.R. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. **Eur J Nutr**, v.40, p.293-300, 2001.

BRIGIDI, P.; VITALI, B.; SWENNEN, E.; BAZZOCCHI, G.; MATTEUZZI, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Res Microbiol**, v.152, n.8, p. 735-74, 2001.

BÚRIGO, T.; FAGUNDES, R.L.M.; TRINDADE, E.B.S.M.; VASCONCELOS, H.C.F.F. Efeito bifidogênico do frutooligosacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Rev Nutr**, v.20, n.5, p. 491-497, 2007.

CARBALLA, M.; SMITS, M.; ETCHEBEHERE, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.89, n.2, p.303-314, 2011.

CHANG, J.; SHIM, Y.Y.; CHA, S.; REANEY, M.J.T.; CHEE, K.M. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **J Medical Microbiol**, v.61, p.361-368, 2012.

DAVILA, A.M.; BLACHEIR, F.; GOTTELAND, M.; ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTI, P.H.; SANZ, Y.; TOMÉ, D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacol Res**, v.68, p.95-107, 2013.

DE MOURA, N.A.; CAETANO, B.F.R.; SIVIERI, K.; URBANO, L.H.; CABELLO, C.; RODRIGUES, M.A.M.; BARBISAN, L.F. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, v.50, p.2902-2910, 2012.

DELGADO, G.T.C; TAMASHIRO, W.M.S.C.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. **Plant Foods Hum Nutr**, v.68, p.222-228, 2013.

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.S.M.; BURINI, R.C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq Gastroenterol**, v.47, n.1, p.93-98, 2010.

DUNCAN, S.H.; BARCENILLA, A.; STEWARTS, C.S.; PRYDE, S.E.; FLINT, H.J. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA), acetate-CoA transferase in butyrate producing bacteria from the human large intestine. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p.5186-5190, 2002.

EDLUND, C.; BEYER, G.; HIEMER-BAU, M.; ZIEGE, S.; LODE, H.; NORD, C.E. Comparative effects of mixifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. **Scand J Infect Dis**, v.32, p.81-85, 2000.

FELSKE, A.; WELLER, R. Cloning 16S rRNA genes and utilization to bacterial communities. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Eds.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.5, p.1-16, 2001.

FOTIADIS, C.I.; STOIDIS, C.N.; SPYROPOULUS, B.G.; ZOGRAFOS, E.D. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v.14, p.6453-6457, 2008.

GIBSON, G.R. Fiber and effect on prebiotics (The prebiotic concept). **Clin Nutr Suppl**, v.1, p.25-31, 2004.

GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, n.4, p.975-982, 1995.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S. L. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and Lactobacillus: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. **J Natl Cancer Inst**, v.73, n.3, p.689-695, 1984.

GOMES, A. S.; FERREIRA, S. P. **Análise de Dados Ecológicos**. Universidade Federal Fluminense Instituto de Biologia Centro de Estudos Gerais Departamento de Biologia Marinha. Niterói, 2004. Disponível em: < .uf f.br ecosed apostila.pdf> Acesso em: 28 jun. 2013.

GUEIMONDE, M.; SALNINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Dig Liver Dis**, v. 38, n.2, p. 42-47, 2006.

HABIB, N.C.; HONORÉ, S.M.; GENTA, S.B.; SÁNCHEZ, S.S. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: biochemical approach. **Chem Biol Interact**, v. 194, p.31-39, 2011.

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

HAKANSSON, A.; BRANNING, C.; MOLIN, G.; ADAWI, D.; LOUISE-HAGSLATT, M.; JEPPSSON, B. NYMAN, M.; AHRNÉ, S. Blueberry husks and probiotics attenuate colorectal

inflammation and oncogenesis, and liver injuries in rats exposed to cycling DSS-treatment. **Plos one**, v.7, n.3, p.1-14, 2012.

HEILIG,H.G.H.J.; ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A.D.L.; DE VOS,W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Appl Environ Microbiol**, v.78, n.3, p.114-123, 2002.

HINNEBUSCH, B.F.; MENG, S.; WU, J.T.; ARCHER, S.Y.; HODIN, R.A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **J Nutr**, v.5, p.1012-1017, 2002.

HOPE, M.E.; HOLD, G.L.; KAIN, R.; EL-OMAR, E.M. Sporadic colorectal cancer – role of the commensal microbiota. **FEMS**, v.244, n.1, p.1-7, 2005.

HUDA-FAUJAN, N.; ABDULAMIR, A.S.; FATIMAH, A.B.; MUHAMMAD ANAS, O.; SHUHAM, M.; YAZID, A.M.; LOONG, Y.Y. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. **Open Biochem J**, v.4, p.53-58, 2010.

HUYS, G.; VANHOUTTE, T.; VANSAMME, P. Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed?. **J Biol Chem**, v.278, p.5509-5512, 2008.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clin Nutr**, v.29, n.6, p.701-725, 2010.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2014. 124p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf> Acesso em: 06 mar.2014.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Center Statistic. **CA Cancer J Clin**, v.61, p.69-90, 2011.

KIM, Y.; OH, S.; YUN, H.S.; OH, S.; KIM, S.H. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumor cells. **Lett Appl Microbiol**, v.51, p.123-130, 2010.

KORAKLI, M.; HINRICHS, C.; EHRMANN, M.A.; VOGEL, R.F. Enzymatic determination of inulin and fructooligosaccharides in food. **Eur Food Res Technol**, v.217, n.6, p.530-534, 2003.

KUMAR, M.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; MOHANIA, D.; BEHARE, P.; VERMA, V.; KUMAR, P.; PODDAR, D.; AGGARWAL, P.K.; HERY, C.J.; JAIN, S.; YADAV, H. Cancer preventing attributes of probiotics: an update. **Int J Food Sci Nutr**, v.61, p.473-496, 2010.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M (Ed.). Nucleic acid techniques in bacterial systematic. **John Wiley & Sons**, Chichester, 1991.

LEONEL, A.J.; ALVAREZ-LEITE, J.J. Butyrate: implications for intestinal function. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.15, n.5, p.474-479, 2012.

LIVINGSTON, S.J.; KOMINOS, S.D.; YEE, R.B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **J Clin Microbiol**, v.7, p.448- 453, 1978.

LORENZ, M.O. Methods of measuring concentration of wealth. **JASA**, v.9, n.70, p.209-219, 1905.

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

MARZORATI, M., VERHELST, A.; LUTA, G.; SINNOTT, R.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T.; POSSEMIERS, S. In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. **Int J Food Microbiol**, v.139, n.3, p.168-176, 2010.

MARZORATI, M.; WITTEBOLLE, L.; BOON, N.; DAFFONCHIO, D.; VERSTRAETE, W. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for environmental microbiology. **Environ Microbiol**, v.10, n.6, p.1571-1581, 2008.

MARZOTTO, M.; MAFFEIS, C.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R.; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Res Microbiol**, v.157, n.9 p.857-866, 2006.

MERTENS, B.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. **Environ Microbiol**, v.7, n.5, p.660-669, 2005.

MODLER, G.M.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **CIFST**, v.23, p.29-41, 1990.

MONTESI, A.; GARCÍA-ALBIACH, R.; POZUELO, M.J.; PINTADO, C.; GONI, I.; MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Appl Environ Microbiol**, v.54, n.7, p.1715-1718, 1988.

MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Appl Environ Microbiol**, v.54, n.7, p.1715-1719, 1988.

PARETO, V. **Le cours d'économie politique**. London: Macmillan, 1897. 589 p.

PARK, J.S.; YANG, J.S.; HWANG, B.Y.; YOO, B.Y.; HAN, K. Hypoglycemic effect of yacon tuber extract and its constituent, chlorogenic acid, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomol Ther**, v.17, p.256-262, 2009.

PAULY-SILVEIRA, N. D. **O emprego da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um novo produto simbiótico, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti*, a base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara.

POOL-ZOBEL, B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Brit J Nutr**, v.93, Suppl.1, p.S73-S90, 2005.

POSSEMIERS, S.; VERTHÉ, K.; UYTENDAELE, S.; VERSTRAETE, W. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiol Ecol**, v.49, n.3, p.495-507, 2004.

POULSEN, M.; MORTENSEN, A.; BINDERUP, M.L.; LANGKILDE, S.; MARKOWSKI, J.; DRAGSTED, L.O. The effect of apple feeding on markers of colon carcinogenesis. **Nutrit Cancer**, v.63, p.402-409, 2011.

PRYDE, S.E.; DUNCAN, S.H.; HOLD, G.L.; STEWART, C.S.; FLINT, H.J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiol Let**, v.217, p.133-139, 2002.

PYE, G.; EVANS, D.F.; LEDINGHAM, S.; HARDCASTLE, J.D. Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma. **Gut**, v.31, p.1355-1357, 1990.

QIAGEN. **QIAamp® DNA Stool Handbook**. 2 ed. Disponível em: www.qiagen.com Acesso em: 6 mar. 2014.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.17, n.5, p.849-859, 2003.

RICHARDSON, A.J.; MCKAIN, N.; WALLACE, R.J. Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. **BMC Microbiol**, v.13, n.6, p.2-8, 2013.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Dig Liver Dis**, v.34, p.S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **J Nutr**, v.37, n.11, p.2493S-2502S, 2007.

RODRIGUES, F.C.; CASTRO, A.S.B.; RODRIGUES, V.C.; FERNANDES, S.A.; FONTES, E.A.F.; OLIVEIRA, T.T.; MARTINO, H.S.D.; FERREIRA, C.L.L.F. Yacon flour and *Bifidobacterium longum* modulate bone health in rats. **J Med Food**, v.15, n.7, p.664-670, 2012.

ROOLER, M.; PIETRO FEMIA, A.; CADERNI, G.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. 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, 2004.

ROWLAND, I.R.; RUMNEY, C.J.; COUTTS, J.T.; LIEVENSE, L.C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, v.19, n.2, p.281-285, 1998.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **BJPS**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SAIKALI, J.; CELINE, P.; FREITAS, M.; HOLT, P.R. Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. **Nutr Cancer**, v.49, n.1, p.14-24, 2004.

SALAZAR, N.; BINETTI, A.; GUEIMONDE, M.; ALONSO, A.; GARRIDO, P.; DEL REY, C.G.; GONZÁLEZ, C.; RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYS-GAVILÁN, C.G. Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide producing strains *Bifidobacterium*

animalis IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. **Int J Food Microbiol**, v.144, p.342-351, 2011.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v.17, p.915-919, 1994.

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

SAVARD, P.; LAMARCHE, B.; PARADIS, M.E.; THITOT, H.; LAURIN, E.; ROY, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **Int J Food Microbiol**, v.149, n.1, p.50-57, 2011.

SIVIERI, K.; MORALES, M.L.V.; ADORNO, M.A.T.; SAKAMOTO, I.K.; SAAD, S.M.I.; ROSSI, E.A. *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved “gut health” in the SHIME[®] reactor. **BMC Gastroenterol**, v.13, p.1-9, 2013.

SIVIERI, K.; CANO, V.S.; VALENTINI, S.R.; ROSSI, E.A. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. **Le Lait**, v.87, n.2, p.59-69, 2007.

SIVEIRI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **Eur Food Res Technol**, v.228, n.2, p.231-237, 2008.

SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Probiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. **J Appl Microbiol**, v.103, p.2392-2400, 2007.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; CHOW, J.; WOLF, B.W.; GARLEV, K.A.; FAHEY, G.C.J. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **J Nutr**, v.132, n.12, p.3721-3731, 2002.

SZABADOSOVA, V.; HIJOVA, E.; STROJNY, L.; SALAJ, L.; BOMBA, A.; COKASOVA, D.; PRAMUKOVA, B.; ZOFCAKOVA, J.; BERTKOVA, I.; SUPUKOVA, A.; SOLTESOVA, A.; BRANDEBUROVA, A. CHMELAROVA, A. Effect of horse chestnut and inulin as single

supplements or in combination on chemically induced colon cancer in rats. **Veterinari Medicina**, v.58, n.9, p.491-499, 2013.

TARAPORE, R.S.; SIDDIQUI, I.A.; MUKHTAR, H. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by bioactive food components. **Carcinogenesis**, v.33, p.483-491, 2012.

THORNTON, J.R. High colonic pH promotes colorectal cancer. **Lancet**, p.1081-1083, 1981.

TOIT, M.; FRANZ, C.M.A.P.; DICKS, L.M.T.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W.H. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **Int J Food Microbiol.**, v.40, p.93-104, 1998.

TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol Rev**, v. 81, n.3, 2001.

VALENTOVÁ, K.; LEBEDA, A.; DOLEZALOVÁ, I.; JIROVSKÝ, D.; SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; KOSINA, P.; GASMANOVÁ, N.; DZIECHCIARKOVÁ, M.; ULRICHOVÁ, J. The biological and chemical variability of yacon. **J Agric Food Chem**, v.22, p.1347-1352, 2006.

VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H VERSTRAETE, W. Prebiotic effect of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS**, v.51, n.1, p.143-153, 2004.

VERMA, A.; SHUKLA, G. Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. **Nutr Cancer**, v.65, n.1, p.84-91, 2013.

WITTEBOLLE, L.; VERVAEREN, H.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. **Appl Environ Microbiol**, v.74, n.1, p.286-293, 2008.

WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; CLEMENT, L.; BALLOI, A.; DAFFONCHIO, D.; HEYLEN, K.; VOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Initial community evenness favours functionality under selective stress. **Nature**, v.458, p.623-626, 2009.

WONG, J.M.; SOUZA, R.; KENDALL, C.W.; EMAM, A.; JENKINS, D.J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol.**, v.3, p.235-243, 2006.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**. v.72, n.3, p.317-321, 1983.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JONSSON, J.A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomed Chromatogr**, v.20, p.674-682, 2006.

CARTA DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Preview

From: Anne.Kopp@taylorandfrancis.com

To: camilla_avi@hotmail.com

CC:

Subject: Nutrition and Cancer: An International Journal - Manuscript ID N&C-02-14-1980

Body: 14-Feb-2014

Dear Miss Avi:

Thank you for submitting your paper entitled "Potential of Yacon (Smallanthus sonchifolius) to Prevent The Development of Preneoplastic Aberrant Crypt Foci in Male Rats" to the office of Nutrition and Cancer: An International Journal.

The paper will be sent for review shortly. We expect to receive comments in as soon as six to eight weeks; this of course depends on how quickly the reviews are completed. All comments regarding your manuscript will be sent via e-mail.

Your manuscript ID is N&C-02-14-1980.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/nc> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/nc>.

Thank you for submitting your manuscript to Nutrition and Cancer: An International Journal.

Sincerely,

Anne Kopp
Managing Editor, Nutrition and Cancer
Taylor & Francis
anne.kopp@taylorandfrancis.com

Date Sent: 14-Feb-2014