

Efeito da farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na resposta imunológica intestinal no câncer colorretal

Effect of yacon meal (Smallanthus sonchifolius) on the intestinal immune response in colorectal cancer

Mariana Grancieri¹
Priscila Alves Machado²
Daniela Furtado de Oliveira³
Letícia De Nadai Marcon⁴
Maria da Graças Vaz Tostes⁵
Neuza Maria Brunoro Costa⁶
Mariana Drummond Costa Ignacchiti⁷
Louisiane de Carvalho Nunes⁸
Mirelle Lomar Viana⁹

Unitermos:

Neoplasias do Cólon. Prebióticos. Imunoglobulina A. Imunologia.

Keywords:

Colonic Neoplasms. Prebiotics. Immunoglobulin A. Immunology.

Endereço para correspondência:

Mariana Grancieri
Alto Universitário, S/N – Guararema – Alegre, ES, Brasil – CEP: 29500-000
E-mail: marianagrancieri@hotmail.com

Submissão:

30 de maio de 2016

Aceito para publicação:

18 de agosto de 2016

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CC) pode induzir graves complicações clínicas aos portadores dessa neoplasia. A farinha de yacon (FY) (*Smallanthus sonchifolius*) é rica em fruto-oligosacarídeos (FOS), que são fermentados por bifidobactérias, produzindo efeitos benéficos à saúde intestinal. Seu efeito no CC, entretanto, é ainda desconhecido, sendo o objetivo deste trabalho investigar os efeitos da FY sobre a resposta imunológica de mucosa em animais com CC induzido. **Método:** Ratos machos Wistar (n=44) foram divididos em grupo S (sem CC e sem FY na dieta), grupo C (com CC e sem FY na dieta), grupo Y (sem CC e com FY na dieta) e grupo CY (com CC e FY na dieta). Durante cinco semanas, os grupos C e CY receberam injeções de 1,2-Dimetilhidrazina para o desenvolvimento do CC, seguidas por duas semanas para formação das lesões neoplásicas. Após esse período, os grupos Y e CY consumiram dieta com FY em quantidades suficientes para fornecer 7,5% de FOS por duas semanas e os demais grupos consumiram dieta AIN-93M. Resposta imunológica da mucosa intestinal foi determinada pela dosagem de imunoglobulina A secretória (sIgA) nas fezes pelo método de ELISA. Dados foram avaliados por ANOVA e teste t pareado ($p < 0,05$). **Resultados:** Após suplementação com FY na dieta, os níveis de sIgA no grupo CY foram superiores aos do grupo S. No grupo CY, os níveis de sIgA aumentaram quando comparados o início e final da intervenção. **Conclusão:** A FY foi capaz de aumentar os níveis de IgA fecal nos animais com CC.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CC) can induce serious clinical complications in patients with this neoplasm. Yacon flour (YF) (*Smallanthus sonchifolius*) is rich in fructooligosaccharides (FOS) that are fermented by bifidobacteria producing beneficial effects on intestinal health. Its effect on CC, however, is still unknown, and the objective of this work is to investigate the effects of YF on the immune response of mucosa in animals with induced CC. **Methods:** Male Wistar rats (n=44) were divided into group S (without CC and without YF in the diet), group C (with CC and without YF in the diet), group Y (without CC and with YF in the diet) and CY group (with CC and YF in the diet). For five weeks, groups C and CY received injections of 1,2-Dimethylhydrazine for the development of CC, followed by two weeks for the formation of neoplastic lesions. After this period, groups Y and CY consumed diet with YF in amounts sufficient to provide 7.5% of FOS for two weeks and the other groups, consumed diet AIN-93M. Immune response of intestinal mucosa was determined by secretory immunoglobulin A (sIgA) dosing in feces by the ELISA method. Data were evaluated by ANOVA and paired t-test ($p < 0.05$). **Results:** After supplementation with YF in the diet, sIgA levels in the CY group were higher than those in the S group. In the CY group, sIgA levels increased when compared to the beginning and end of the intervention. **Conclusion:** FY was able to increase faecal IgA levels in animals with CC.

1. Nutricionista e mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Doutoranda em Ciência da Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Alegre, ES, Brasil.
2. Nutricionista pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
3. Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
4. Nutricionista e mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Doutoranda em Ciência da Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.
5. Nutricionista e mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Doutorado em Ciências da Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Professora adjunta no Departamento Farmácia e Nutrição da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
6. Nutricionista e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela University of Reading, pós-doutorado na Purdue University e University of Illinois at Urbana-Champaign. Professora titular no Departamento Farmácia e Nutrição da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
7. Bióloga e mestre em Microbiologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutorado em Ciências pela Universidade de São Paulo (USP). Professora adjunta no Departamento de Farmácia e Nutrição da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
8. Médica Veterinária pela Universidade Federal do Piauí (UFP). Mestrado, doutorado e PhD em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Professora Associada I no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.
9. Nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutorado em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Professora adjunta no Departamento Farmácia e Nutrição da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.

INTRODUÇÃO

A incidência das doenças e agravos crônicos não transmissíveis aumenta progressivamente no cenário mundial, entre os quais destaca-se o câncer colorretal (CC), que abrange tumores que acometem o cólon intestinal e o reto. Segundo estimativa mundial, no ano de 2012, o CC foi o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres^{1,2}.

Os fatores protetores mais importantes para o CC são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibra alimentar e fruto-oligosacarídeos (FOS), tendo estes ação prebiótica³. Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis pelo organismo humano que resultam em benefícios pela estimulação seletiva do crescimento e/ou ativação do metabolismo de bactérias probióticas⁴.

Os FOS são prebióticos com ação benéfica conhecida, sendo o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) uma raiz tuberosa rica nesse nutriente, podendo representar de 40%-70% da matéria seca no yacon^{3,5}. Os FOS podem estimular o sistema imunológico da mucosa intestinal, levando a uma maior produção de anticorpos e IgA, sendo esta a imunoglobulina mais abundante na superfície das mucosas.

A IgA tem a capacidade de neutralizar toxinas e microrganismos patogênicos, impedindo-os de se ligarem à mucosa intestinal ou mesmo atravessarem-na. Além disso, a IgA não fixa complemento, podendo agir contra microrganismos sem desencadear um processo inflamatório progressivo que danifica o epitélio.

Esta imunoglobulina está em níveis elevados apenas no intestino de animais com uma microbiota normal, uma vez que o desenvolvimento de um linfócito B em IgA na mucosa intestinal parece ser afetado pela composição da microbiota intestinal. A imunoglobulina A secretora (slgA) é a IgA na forma dimérica ligada a uma proteína chamada peça secretora. A slgA é predominante em secreções como saliva, lágrima, colostro e fezes⁶⁻⁸.

Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar os efeitos do consumo da farinha de yacon (FY) no ganho de peso, consumo alimentar e resposta imunológica da mucosa intestinal, via IgA, em ratos com câncer de cólon induzido.

MÉTODO

Animais

Foram utilizados 46 ratos machos *Wistar* adultos, mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob controle da iluminação (fotoperíodo claro/escuro de 12 h) e da temperatura (22°C). A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida

respeitando as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁹. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA), protocolo nº 004/2014.

Delineamento experimental

Tratou-se de um estudo prospectivo, do tipo ensaio experimental. Dos 46 animais, 2 foram utilizados para comprovar o desenvolvimento da neoplasia colorretal e os demais 44 foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- **Grupo S:** grupo sem indução de CC e sem tratamento com farinha de yacon;
- **Grupo C:** grupo com indução de CC e sem tratamento com farinha de yacon;
- **Grupo Y:** grupo sem indução de CC e com tratamento com farinha de yacon;
- **Grupo CY:** grupo com indução de CC e com tratamento com farinha de yacon.

Durante a primeira semana, os animais receberam ração comercial (marca In Vivo[®]), para adaptação ao ambiente. A mesma também foi utilizada nas 13 semanas seguintes, sendo cinco para aplicação da droga de indução tumoral (1,2-metilhidrazina na dose de 25 mg/kg de peso) e oito para o desenvolvimento da afecção.

Ao final do período de evolução tumoral, ou seja, na 14ª semana do experimento, dois animais extras dos grupos foram sacrificados e seus intestinos coletados e analisados, a fim de comprovar a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), consideradas lesões pré-neoplásicas, por meio de coloração dos tecidos intestinais com azul de metileno, seguido por observação em microscópio óptico na objetiva de 4X.

Após esse período, foram coletadas fezes frescas dos animais de todos os grupos, armazenadas a -80°C e então se iniciou a intervenção com farinha de yacon durante duas semanas.

Os ratos foram monitorados diariamente em relação à ingestão alimentar, hídrica e eventuais intercorrências, como diarreia. Semanalmente, foi monitorado o ganho de peso corporal. Ao final das 2 semanas de tratamento (16ª semana do experimento), fezes frescas dos animais foram coletadas novamente e mantidas a -80°C.

Dietas experimentais

As dietas experimentais foram elaboradas manualmente, com ingredientes adicionados em quantidades determinadas, segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition for Rodents*¹⁰, seguindo o protocolo AIN-93M, recomendada para manutenção de animais adultos.

Os grupos S e C receberam a dieta AIN-93M. Os grupos Y e CY receberam farinha de yacon, preparada conforme descrito por Vaz-Tostes et al.¹¹, em quantidade suficiente para fornecer 7,5% de FOS, uma vez que é provado que esta quantidade exerce efeitos sobre a mucosa do cólon¹². Deste modo, ajustou-se o conteúdo de caseína, sacarose, amido e fibra da dieta original AIN-93M, a fim que as dietas de todos os grupos apresentassem as mesmas concentrações de carboidrato, açúcares, proteínas e fibras (Tabela 1).

Consumo alimentar, ganho de peso e dosagem da slgA

O consumo alimentar foi avaliado semanalmente por meio da diferença entre peso da dieta ofertada e a sobra. O peso dos animais foi aferido semanalmente, sempre no mesmo horário do dia, em ambos utilizando balança eletrônica digital (RADWAG®).

Para análise da slgA fecal, fezes frescas dos animais foram pesadas e lavadas com solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2, na proporção de 500 mg do conteúdo/ 2,0 mL de PBS, e então centrifugadas a 2000 g, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da imunoglobulina A, pelo método de ELISA, utilizando o kit comercial Immunochron®.

Análise estatística

Os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA), com teste de comparações múltiplas de

Tukey. Dados referentes aos níveis de slgA, antes e após a intervenção com farinha de yacon, comparados pelo teste T pareado. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP), sendo considerado significativo o $p < 0,05$. Os resultados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS, versão 19.0.

RESULTADOS

Durante as duas semanas de intervenção com a farinha de yacon, observou-se que o consumo alimentar e ganho de peso dos animais foi similar entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). O consumo alimentar e ganho de peso médio são apresentados nas Figuras 1 e 2.

Os níveis de slgA não diferiram entre os grupos quando se considera apenas o momento anterior à intervenção alimentar ($p > 0,05$). Porém, a análise da slgA após o consumo da farinha de yacon mostrou que os níveis fecais

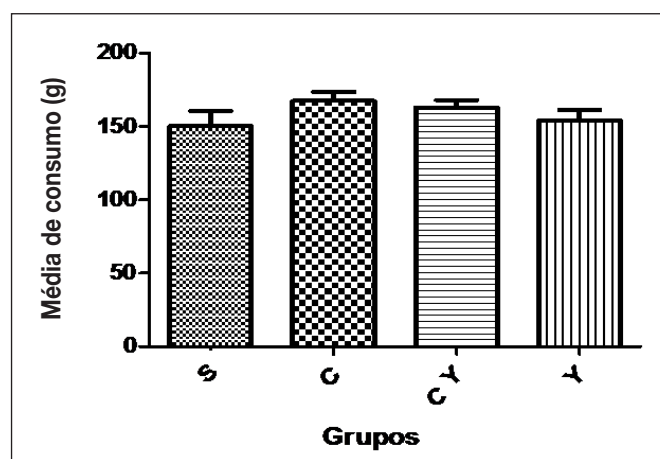


Figura 1 – Média do consumo alimentar dos grupos experimentais durante duas semanas de intervenção com farinha de yacon. As barras de erros mostram o desvio padrão. Dados expressos como média±desvio padrão.

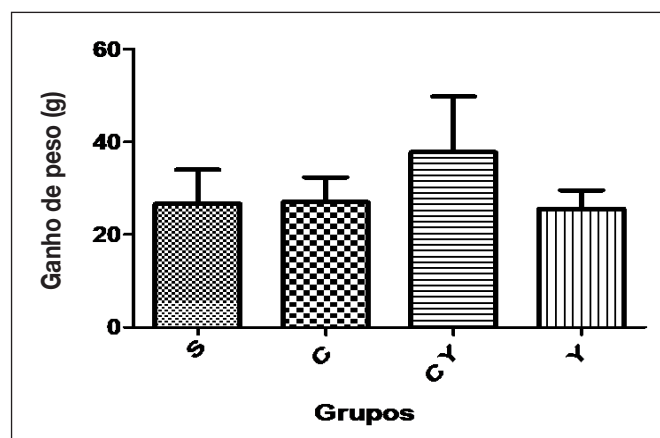


Figura 2 – Ganho de peso dos grupos experimentais durante o período experimental. As barras de erros mostram o desvio padrão. Dados expressos como média±desvio padrão.

Tabela 1 – Composição da dieta dos grupos experimentais.

Ingredientes (g/100g)	Grupos	
	S e C	Grupos Y e CY
	AIN-93M	AIN-93M + FOS
Caseína	14,0	13,14
Amido dextrinizado	15,5	15,5
Sacarose	10,0	7,24
Óleo de Soja	4,0	4,0
Fibra	10,0	0
Mix minerais	3,5	3,5
Mix vitamínico	1,0	1,0
L-Cistina	0,18	0,18
Bit. de colina	0,25	0,25
Amido	46,57	40,81
Farinha de yacon	0	14,37

Grupo S (sem câncer de cólon e sem farinha de yacon na dieta), grupo C (com câncer de cólon e sem farinha de yacon na dieta), grupo Y (sem câncer de cólon e com farinha de yacon na dieta) e grupo CY (com câncer de cólon e farinha de yacon na dieta).

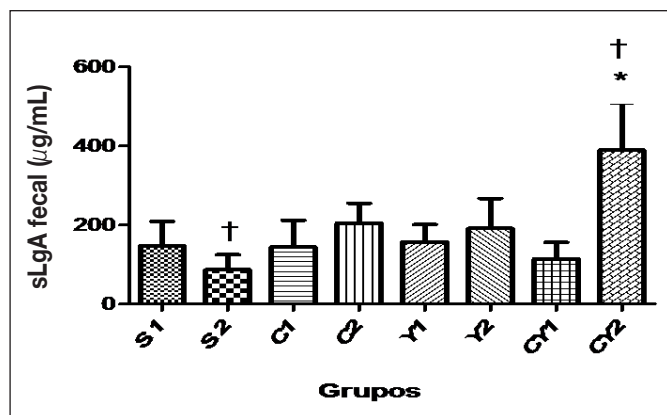


Figura 3 – Níveis de IgA fecal antes e após a intervenção alimentar com farinha de Yacon. Dados apresentados como média±desvio padrão. † Diferença intergrupos. *Diferença intragrupo. 1 Antes/ 2 após da intervenção alimentar.

dessa imunoglobulina no grupo CY ($390,1 \pm 119,6 \mu\text{g/mL}$) foram superiores ($p < 0,05$) aos níveis observados no grupo S ($87,30 \pm 37,52 \mu\text{g/mL}$) (Figura 3).

Além disso, verificou-se que o grupo CY obteve aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de sIgA, comparando-se antes ($115,0 \pm 41,54 \mu\text{g/mL}$) e após as duas semanas de intervenção ($390,1 \pm 119,6 \mu\text{g/mL}$) com a farinha de yacon (Figura 3).

DISCUSSÃO

O yacon é amplamente cultivado em todo o mundo e seu consumo está associado a muitos benefícios à saúde. Entre eles, encontra-se sua capacidade de modular a microbiota intestinal, função imunológica e atuação sobre câncer de cólon^{11,13}. Esses efeitos estão associados à fermentação do FOS, presente em grande quantidade na raiz de yacon, pela microbiota intestinal¹².

Aproximadamente 15% de todas as linhagens de câncer têm sido atribuídas a agentes infecciosos. sIgA é a principal imunoglobulina das secreções humanas e desempenha um papel fundamental no mecanismo de defesa gastrointestinal contra agentes dietéticos e microbianos. Essa imunoglobulina possui elevada afinidade para neutralizar toxinas e microrganismos patogênicos, ao mesmo tempo que apresenta baixa afinidade para conter as bifidobactérias intestinais⁶.

O consumo de FOS estimula o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável que é essencial para o desenvolvimento adequado do sistema imune do hospedeiro, exercendo importante função na indução da produção de células de defesa, como células T (reguladoras e auxiliares) e sIgA¹⁴.

O consumo de FOS pode levar à diminuição do pH intraluminal, com conseqüente modulação da resposta inflamatória. Dessa maneira, ocorre diminuição de citocinas

pró-inflamatórias e aumento de citocinas regulatórias, como a IL-10. Este efeito pode ser determinante no aumento da resposta imunológica da mucosa intestinal, uma vez que, na presença de IL-10, os linfócitos B se diferenciam, produzindo sIgA¹⁵.

Como os anticorpos IgA presentes na superfície da mucosa do intestino são capazes de prevenir a adesão de agentes patogênicos nesse local, estes resultados indicam melhoria da saúde do hospedeiro após a suplementação com prebióticos¹⁶.

No presente estudo, encontrou-se um aumento significativo nos níveis de sIgA fecal no grupo CY após o consumo de farinha de yacon, além de maiores níveis comparados ao grupo S no momento pós-intervenção. Esse aumento nos níveis de sIgA fecal no grupo com indução de carcinoma e ingestão de farinha de yacon é um dado importante, pois a presença deste anticorpo indica a ocorrência de uma resposta imunológica contra uma inflamação, que neste estudo é o tumor induzido na mucosa intestinal. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos que também encontraram aumento de sIgA após intervenção com farinha de yacon, como Vaz-Tostes et al.¹¹, em seu estudo com crianças, e Delgado et al.¹⁷, num estudo com camundongos.

Além disso, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) no consumo alimentar e ganho de peso entre os grupos experimentais. O consumo de fibras está associado a um aumento na saciedade, redução do apetite e conseqüente menor ingestão alimentar¹⁸, entretanto, o conteúdo de fibras alimentares das dietas oferecidas neste estudo não ultrapassou as recomendações da AIN-93M, o que possivelmente relaciona-se à não alteração ingestão alimentar e conseqüente não alteração do ganho de peso.

Ainda não existem estudos que avaliem os efeitos do consumo de farinha de yacon na resposta inflamatória de mucosa intestinal no câncer de cólon, via dosagem de sIgA, de forma que os resultados obtidos neste trabalho são de extrema relevância, uma vez que estes níveis elevados de IgA podem significar uma resposta imunológica contra uma inflamação intestinal inicial, sugerindo a ação positiva da farinha de yacon na função imunológica no câncer cólon. Mais estudos devem ser realizados, a fim de elucidar se esses efeitos poderiam reduzir a divisão celular descontrolada do câncer de cólon.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do projeto, sob processo número 486353/2013-3.

REFERÊNCIAS

- Clark MJ, Robien K, Slavin JL. Effect of prebiotics on biomarkers of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Nutr Rev*. 2012;70(8):436-43.
- Brasil. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2014. [citado 2015 Jul 14]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf
- Toloudi M, Apostolou P, Chatziioannou M, Eleni K, Ioanna V, Georgia M, et al. A possible clinical benefit of the identification and characterization of colon cancer stem cells. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015;5(1):22-7.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-12.
- Santana I, Cardoso MH. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Cienc Rural*. 2008;38(3):898-905.
- Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):11-22.
- Sansonetti PJ. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol*. 2011;4(1):8-14.
- Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):1046S-51S.
- Brasil. Colégio Brasileiro de Experimentação-Cobea. Princípios éticos na experimentação animal [internet] 2006. [citado 2014 Jul 2]. Disponível em: http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
- Vaz-Tostes M, Viana ML, Grancieri M, Luz TC, Paula H, Pedrosa RG, et al. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. *Nutrition*. 2014;30(6):666-72.
- Lobo AR, Cocato ML, Borelli P, Gaievski EH, Crisma AR, Nakajima K, et al. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. *Food Chem*. 2011;126(3):885-91.
- Moura NA, Caetano BF, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MA, et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(8):2902-10.
- Turroni F, Ventura M, Buttó LF, Duranti S, O'Toole PW, Mothterway MO, et al. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(2):183-203.
- Brière F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C, et al. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *Eur J Clin Invest*. 1994;94(1):97-104.
- Lomax AR, Calder PC. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *Br J Nutr*. 2009;101(5):633-58.
- Delgado GT, Thomé R, Gabriel DL, Tamashiro WM, Pastore GM. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. *Nutr Res*. 2012;32(11):884-92.
- Ezz Al-Arab A. A diet rich in leafy vegetable fiber improves cholesterol metabolism in high-cholesterol fed rats. *Pak J Biol Sci*. 2009;12(19):1299-306.

Local de realização do trabalho: Departamento de Farmácia e Nutrição da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.

Trabalho apresentado no II Fórum Brasileiro de Pesquisa em Pré, Pró e Simbióticos (II PreProSim) em São Paulo/SP, Brasil, em 16 de junho de 2015.

Conflito de interesse: As autoras declaram não haver.