

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NATALIA VIANA TAMIASSO

**PRODUÇÃO DE MUCINA E EXPRESSÃO DE HIF-1 α E VEGF-A EM MODELO DE
CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
FARINHA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

ALEGRE-ES

2017

NATALIA VIANA TAMIASSO

**PRODUÇÃO DE MUCINA E EXPRESSÃO DE HIF-1 α E VEGF-A EM MODELO DE
CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
FARINHA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.
Orientadora: Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes.

ALEGRE-ES

2017

T158p Tamiasso, Natalia Viana, 1991-
Produção de mucina e expressão de HIF-1a e VEGF-A em modelo de
câncer colorretal induzido em ratos suplementados com farinha de yacon
(*Smallanthus sonchifolius*) / Natalia Viana Tamiasso. – 2017.
97 f. : il.

Orientador: Louisiane de Carvalho Nunes.

Coorientador: Leonardo Oliveira Trivilin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Medicina veterinária. 2. Oncologia veterinária. 3. Muco intestinal. 4.
Biomarcadores. 5. Histopatologia. I. Nunes, Louisiane de Carvalho. II.
Trivilin, Leonardo Oliveira. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

NATALIA VIANA TAMIASSO

**PRODUÇÃO DE MUCINA E EXPRESSÃO DE HIF-1 α E VEGF-A EM MODELO DE
CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
FARINHA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

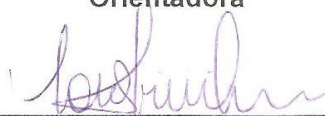
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em 16 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Profa. Dra. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo



Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo

À Fabricio Viana Tamiasso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Louisiane de Carvalho Nunes, por me acompanhar não só no mestrado, mas durante os últimos seis anos, compartilhando suas experiências profissionais e pessoais. Agradeço sua compreensão, seus conselhos e sua companhia ao longo dessa caminhada.

Ao meu coorientador, prof. Leonardo Oliveira Trivilin, por mostrar a “luz no fim do túnel” nos momentos em que tive dificuldades e por dividir seus conhecimentos. Agradeço pelo tempo dedicado a esse trabalho e pela paciência comigo.

À profa. Jankerle Neves Boeloni por compartilhar comigo a sua rotina no Laboratório de Patologia Animal. Obrigada por todo o aprendizado.

Aos estagiários da Patologia Animal pelo auxílio no preparo de materiais.

Aos colegas de pós-graduação pela ajuda na padronização das técnicas.

Aos meus pais, Maria Luzia Viana Tamiasso e Eugenio Tamiasso, por não me deixarem desistir mesmo diante de dificuldades pessoais e profissionais.

Ao meu irmão Fabricio Viana Tamiasso por me fazer compreender de uma forma que transcende à pesquisa a necessidade de estudos como esse.

Aos meus familiares, simplesmente por sempre estarem presentes.

Aos amigos que ajudaram a fazer desses dois últimos anos em Alegre um período mais feliz, seja pessoalmente ou à distância.

Ao Willy Stefanon Dietrich por todas as vezes que dedicou seu tempo a me ajudar em alguma tarefa acadêmica, seja emprestando seu carro ou me incentivando a seguir em frente.

Aos funcionários do Hospital Veterinário por todos os serviços prestados.

À profa. Mirelle Lomar Viana e toda sua equipe de pesquisa por fornecer materiais que foram utilizados nesse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelos ensinamentos compartilhados.

À professora Maria Aparecida da Silva pela disponibilidade em ajudar.

À Universidade Federal do Espírito Santo por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

“In a time of destruction, create something”

Maxine Hong Kingston

RESUMO

TAMIASO, NATALIA VIANA. **Produção de mucina e expressão de HIF-1 α e VEGF-A em modelo de câncer colorretal induzido em ratos suplementados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2017. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é um alimento funcional devido a sua capacidade de promover benefícios para a saúde, porém, seus efeitos sobre o câncer colorretal são pouco conhecidos. Assim, objetivou-se avaliar a produção de mucina intestinal e identificar a expressão de fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α) e fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) em modelo experimental de câncer colorretal induzido em ratos suplementados com batata yacon. Quarenta e três ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais: C (não tratado), N (tratado com 1,2-dimetilhidrazina [DMH]), NY (tratado com DMH e farinha de yacon) e Y (tratado com farinha de yacon). A indução neoplásica seguiu protocolo com uma injeção semanal de DMH durante cinco semanas. Após o período de indução e desenvolvimento neoplásico, as dietas suplementadas com yacon foram fornecidas durante oito semanas após. Amostras intestinais foram coradas com hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue e foram submetidas a protocolos imunoistoquímicos com anticorpos anti-HIF-1 α e anti-VEGF-A. As lesões encontradas foram linfocitose, hiperplasia linfoide, dilatação glandular, epitélio atípico, displasia, neoplasia benigna e neoplasia maligna. Os animais do grupo N apresentaram redução na produção de mucina neutra e não houve diferença na produção de mucina ácida entre os grupos. Os animais do grupo NY apresentaram redução na expressão de HIF-1 α enquanto os grupos Y e NY tiveram expressão de VEGF-A semelhante ao grupo controle. Conclui-se que a suplementação com farinha de yacon aumenta a produção de mucina neutra em animais com câncer colorretal induzido, mas não altera a produção de mucina ácida. Ainda, o consumo de yacon reduz a expressão de HIF-1 α e não interfere na expressão de VEGF-A.

Palavras-chave: biomarcadores. FOS. glicoproteínas. mucina neutra. neoplasia

ABSTRACT

TAMIASO, NATALIA VIANA. **Mucin production and HIF-1 α and VEGF-A expression in model for induced colorectal cancer in rats supplemented with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour.** 2017. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a functional food due to its capacity to promote health benefits, but its effect on colorectal cancer is still unknown. Thus, the objective was to evaluate intestinal mucin production and identify hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression in experimental rat model of induced colorectal cancer supplemented with yacon. Forty three Wistar rats were allocated into four experimental groups: C: untreated group; N: 1,2-dimethylhydrazine-treated (DMH-treated) group; Y: yacon-treated group; NY: DMH + yacon-treated group. The induction of neoplastic cells followed a protocol of one infection with DMH per week during five weeks. After induction and neoplastic development period, the diets supplemented with yacon flour were given during eight weeks. Intestinal samples were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) and went under immunohistochemistry protocols with anti-HIF-1 α and anti-VEGF-A antibodies. The lesions found were lymphocytosis, lymphoid hyperplasia, glandular dilation, atypical epithelium, dysplasia, adenomas and adenocarcinomas. Animals from group N have had reduction in neutral mucin production and there was no difference in acid mucin production among the groups. Animals from NY group showed decrease in HIF-1 α expression while Y and NY groups had VEGF-A expression, similar to the control group. In conclusion, alimentary supplementation with yacon flour increases neutral mucin production in animals with induced colorectal cancer but do not alter acid mucin production. Besides, yacon consumption decreases HIF-1 α expression, and did not interfere in VEGF-A expression.

Key-words: biomarkers. FOS. glycoprotein. neoplasia. neutral mucin

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Revisão de Literatura		
Figura 1-	Mecanismo de ação dos inibidores de histona desacetilases (iHDAC) que induzem parada do crescimento e diferenciação celulares e apoptose. iHDAC geram acetilação das histonas e isso afasta o DNA da histona desacetilada. A proposta é que o acúmulo de histonas acetiladas nos nucleossomos induzem expressão de genes específicos, que estimulam os efeitos citados acima e inibem o crescimento tumoral.....	26
Capítulo 1		
Figura 1-	Fotomicrografias de cólon de rato apresentando alterações não neoplásicas, coloração HE. A) Linfocitose. Objetiva 20x, barra=60,4µm. B) Hiperplasia linfoide. Objetiva 10x, barra=120,89µm. C) Dilatação glandular (setas). Objetiva 20x, barra=60,4µm. D) Células de goblet displásicas (asterisco). Objetiva 20x, barra=60,4µm	37
Figura 2-	Fotomicrografias de cólon de rato apresentando alterações neoplásicas, coloração HE, objetiva 10x, barra=97µm. A) Adenoma tubular, amostra NY10. B) Adenocarcinoma tubular, amostra NY3. Layout evidencia invasão das camadas adjacentes à mucosa pelas células tumorais. C) Adenocarcinoma mucinoso, amostra NY9. D) Carcinomatose, amostra NY11.....	38
Figura 3-	Fotomicrografias de mucosa de cólon de rato, coloração PAS, objetiva 40x, barra=20µm. A) Amostra do grupo N evidenciando intensidade de marcação fraca no interior das células de goblet. B) Amostra do grupo NY evidenciando intensidade de marcação forte no interior das células de goblet.....	39
Capítulo 2		
Figura 1-	Cólon de rato evidenciando diferentes intensidades de	

	imunomarcção positiva, técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-HIF-1 α , concentração 1:2000. A) Amostra do grupo C. B) Amostra do grupo Y. C) Amostra do grupo N. D) Amostra do grupo NY. Contra-coloração hematoxilina, barra=40,46 μ m.....	57
Figura 2-	Gráfico representando o escore médio obtido em cada grupo avaliado para a expressão de HIF-1alfa, evidenciando redução na expressão desse biomarcador no grupo NY.....	58
Figura 3-	Cólon de rato evidenciando diferentes intensidades de imunomarcção positiva, técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-VEGF-A, concentração 1:800. A) Amostra do grupo C. B) Amostra do grupo N. C) Amostra do grupo NY. D) Amostra do grupo Y. Contra-coloração hematoxilina, barra=41,66 μ m.....	59
Figura 4-	Gráfico representando o escore médio obtido em cada grupo avaliado para a expressão de VEGF-A, evidenciando redução na expressão desse biomarcador no grupo N.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB -	<i>Alcian Blue</i>
AGCC -	Ácidos graxos de cadeia curta
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC -	<i>Association of Analytical Chemists</i>
APC -	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CCR -	Câncer colorretal
CIMP -	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i>
DCC -	<i>Deleted in colon carcinoma</i>
DG -	Dilatação glandular
DMH -	1,2-dimetilhidrazina
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EA -	Epitélio atípico
FGF -	Fator de crescimento fibroblástico
FOS -	Frutooligossacarídeo
FY -	Farinha de yacon
GALT -	Tecido linfóide associado ao intestino
HAT -	Histona acetiltransferase
HDAC -	Histona desacetilase
HE -	Hematoxilina e eosina
HIF -	Fator induzido por hipóxia
HL -	Hiperplasia linfóide
IFN -	Interferon
iHDAC -	Inibidor de histona desacetilase
IL -	Interleucina
INCA -	Instituto Nacional de Câncer
MGO -	Metilglioxal
mRNA -	RNA mensageiro
NB -	Neoplasia benigna
NM -	Neoplasia maligna
PAS -	Ácido periódico de Schiff

ROS - Espécies reativas de oxigênio
TNF - Fator de necrose tumoral
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
VEGF-A - Fator de crescimento vascular endotelial A

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
	Capítulo 1	
Tabela 1-	Composição da farinha de yacon.....	35
Tabela 2-	Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M suplementada com farinha de yacon.....	35
Tabela 3-	Valores percentuais das lesões histopatológicas observadas em ratos com câncer colorretal induzido tratados com batata yacon.....	37
	Capítulo 2	
Tabela 1-	Composição da farinha de yacon.....	54
Tabela 2-	Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M suplementada com farinha de yacon.....	55

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Fatores de risco para câncer colorretal	17
2.2 Carcinogênese colorretal	17
2.3 Classificação tumoral e prognóstico	20
2.4 Modelo experimental de CCR induzido por 1,2-dimetilhidrazina.....	21
2.5 Ingestão de fibras, batata yacon e CCR	23
2.6 Ácidos graxos e a produção de mucina	28
2.7 Biomarcadores HIF-1 α e VEGF na avaliação do câncer	29
3 CAPÍTULO 1: Suplementação alimentar com batata yacon altera a produção de mucina intestinal em ratos com câncer colorretal induzido?.....	32
RESUMO	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	44
4 CAPÍTULO 2: Suplementação com yacon reduz a expressão de fator induzido por hipóxia-1 alfa sem alterar expressão de fator de crescimento vascular endotelial A em modelo experimental de câncer colorretal	48
LISTA DE ABREVIATURAS	49
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS	57

DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS	64
5 CONCLUSÕES GERAIS	69
6 REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	77
ANEXO A	78
ANEXO B	83

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de óbitos em humanos, com estimativa mundial de cerca de 7,6 milhões de mortes anuais e 12,7 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano. Estima-se que, se nenhuma postura preventiva for adotada e nenhum novo tratamento eficaz for descoberto, em 2030 o número de óbitos anual deve chegar aos 17 milhões, com a maior parte dos casos em países em desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016a). Ao considerar neoplasias que são comuns a ambos os sexos, o câncer colorretal (CCR) é o segundo mais frequente no Brasil, atrás apenas dos cânceres de pele (INCA, 2016b).

O CCR é considerado uma doença relacionada ao estilo de vida do indivíduo por estar associado a hábitos alimentares inadequados, tais como consumo excessivo de calorias e reduzido de fibras e frutas (INCA, 2016b). Desta forma, é possível reduzir o risco de seu desenvolvimento ao fornecer determinados alimentos, que são fermentadas por bactérias intestinais gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais aumentam a produção de mucina que serve como substrato e fator de adesão para a microbiota intestinal (JUNG et al., 2015).

O favorecimento da microbiota normal influencia na patogênese da progressão tumoral, impedindo o desenvolvimento de lesões malignas (CHEN et al., 2013). Contudo, uma vez estabelecida a doença, o tratamento convencional é composto por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, podendo haver protocolos terapêuticos com associação de dois ou mais destes itens (INCA, 2015).

De modo a auxiliar na escolha do tratamento a ser empregado e tentar prever a sobrevida do paciente, diversos fatores prognósticos podem ser investigados, tais como os biomarcadores tumorais (ALMEIDA et al., 2007). Entre esses biomarcadores pode-se citar HIF-1 α que permite adaptação à neoplasia (BRITO; SCHIAVON; MARANA, 2011), p53 que controla ciclo celular (ALMEIDA et al., 2007), Ki-67 que indica células em proliferação (MOTTA et al., 2009), VEGF que induz vascularização tumoral (SEMENZA, 1998), entre outros. Considera-se que pacientes que apresentam normalização dos níveis dos biomarcadores após intervenção terapêutica possuem prognóstico favorável (ALMEIDA et al., 2007).

Apesar dos esforços para proporcionar qualidade de vida aos pacientes com câncer, os protocolos terapêuticos utilizados atualmente são de custo elevado e geralmente estão associados a diversos efeitos colaterais indesejados. Além disso, em muitos casos ainda não é possível atingir a cura completa da doença com o uso desses tratamentos. Por estes motivos, a busca por terapias alternativas é constante, de modo a melhorar a qualidade de vida dos pacientes e tentar estabelecer protocolos com maior taxa de cura (JANEWEY; WALPORT; SHLOMCHIK, 2002).

Assim, sabe-se que muitas plantas possuem componentes que desempenham papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento, manutenção e/ou outras funções do organismo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016a). Essas plantas são consideradas alimentos funcionais e pode-se citar como exemplo vegetais que apresentam inulinas e frutooligossacarídeos (FOS) em sua constituição, tal como a batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (DELGADO et al., 2013).

Há relatos de que tais substâncias servem de substrato para bactérias probióticas, atuam como antioxidantes, estimulam sistema imunológico (FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015), aumentam produção de mucina intestinal (JUNG et al., 2015) e reduzem proliferação de células neoplásicas (ALMEIDA et al., 2015; MOURA et al., 2012). Nesse contexto, os alimentos funcionais tornam-se cada dia mais procurados pelos consumidores devido aos benefícios que eles podem trazer (DELGADO et al., 2013).

A conhecimento do autor, ainda não há nenhum estudo em modelo de CCR experimental suplementado com batata yacon no qual foi avaliada a produção de muco intestinal e ainda são poucos os dados sobre a expressão de biomarcadores. Assim, objetivou-se avaliar a produção de mucina intestinal e identificar a expressão de HIF-1 α e VEGF-A em modelo experimental de câncer colorretal induzido em ratos suplementados com batata yacon.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fatores de risco para o câncer colorretal

Existem diferentes nomenclaturas para as neoplasias, pois elas são classificadas de acordo com o comportamento clínico, com o aspecto microscópico e com a origem da neoplasia (BRASILEIRO FILHO, 2013). Dentre os cânceres que acometem o sistema digestório, classificam-se como cânceres colorretais (CCR) as neoplasias que acometem especificamente cólon ou reto. A maior parte desses tumores começa por uma lesão benigna que evolui para maligna e, desta forma, se tratado precocemente, pode haver interrupção do processo de malignização (INCA, 2015).

Aparentemente, existem fatores predisponentes para o CCR, pois observa-se que a neoplasia surge em indivíduos que possuem alguma predisposição genética congênita ou adquirida, ou que ficam expostos a fatores de risco. Dentre os fatores de risco, vários deles estão associados ao modo de vida ocidental e, inclusive, a incidência desse tipo de neoplasia é muito maior no Ocidente que no restante do planeta. Entre esses fatores destacam-se hábito tabagista, obesidade, sedentarismo, consumo excessivo de calorias e carne vermelha e ingestão de álcool (WATSON; COLLINS, 2011). Por outro lado, uma dieta rica em fibras com consumo de frutas, verduras, cereais e grãos reduz o risco de CCR (INCA, 2016c).

2.2 Carcinogênese colorretal

A carcinogênese é um processo complexo no qual são gerados clones celulares com vantagens sobre as demais células. Certamente existem diferenças no desenvolvimento de cada tipo de neoplasia, mas algumas características são comuns a todas elas: autonomia de proliferação, insensibilidade à inibição das mitoses, inibição de genes pró-apoptóticos, evasão de senescência replicativa, autonomia de sobrevivência, instabilidade genômica, evasão do sistema imune e capacidade de invadir/metastatizar (BRASILEIRO FILHO, 2013).

É possível dividir o processo de formação e desenvolvimento neoplásico em etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação representa a transformação celular inicial na qual a célula passa a ter capacidade autônoma de multiplicação, contudo, apesar de irreversível, essa fase por si só ainda não é capaz de originar uma neoplasia. A promoção é caracterizada pela proliferação das células que foram iniciadas, assim, a mutação que ocorreu na iniciação é perpetuada. Essa etapa é longa e reversível. A última etapa é a progressão, na qual ocorrem sucessivas mutações nas células que conferem características cada vez mais distintas da população celular normal. Essa etapa depende de características relacionadas ao hospedeiro, tais como resposta imune e produção hormonal (BRASILEIRO FILHO, 2013).

Existem passos importantes para que a progressão tumoral ocorra, tais como defeitos nos mecanismos de apoptose e proliferação celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011), capacidade de adaptação a hipóxia e estímulo à angiogênese (SEMENZA, 1998).

O processo de carcinogênese de cólon é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas nas células (KHARE et al., 2009). As alterações genéticas a princípio não constituem uma doença, mas elas podem evoluir para lesões pré-cancerígenas até chegar a uma neoplasia propriamente dita (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Dentre os genes relacionados ao desenvolvimento de CCR destacam-se KRAS, *adenomatous polyposis coli* (APC), p53 (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009), Wnt e *deleted in colon carcinoma* (DCC) (BRASILEIRO FILHO, 2013).

As vias mais estudadas sobre o processo de carcinogênese de cólon são a via da instabilidade cromossômica, a via da instabilidade de microssatélites e a via da instabilidade epigenética (em inglês, também conhecido como *CpG Island Methylator Phenotype* – CIMP). Vale ressaltar que apesar de genes específicos estarem relacionados a determinados tumores, reconhece-se que o acúmulo progressivo de mutações é um fator crucial para a carcinogênese, independentemente de quais genes envolvidos e de qual gene sofre mutação primeiro (FEARON; VOGELSTEIN, 1990).

Ao considerar a via de instabilidade cromossômica, sabe-se que podem ocorrer mudanças genômicas como ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais e estes mecanismos são os mais comuns em CCR

esporádico e familiar. Por outro lado, a via da instabilidade de microssatélites acontece quando uma região que possui microssatélites (pequenos segmentos repetitivos de DNA) apresenta-se numa sequência maior ou menor do que o original. Essa via é mais importante em pacientes humanos com síndrome de Lynch. A via de instabilidade epigenética compreende inativação de genes supressores tumorais em consequência de mudanças no padrão de metilação de regiões promotoras (ARMAGHANY et al., 2012).

As proteínas codificadas por genes RAS atuam na transdução de sinais importantes para diversos processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular, e quando mutados, esses genes contribuem para fenótipo neoplásico (LOWY; WILLUMSEN, 1993). KRAS é o membro da família RAS que está mutado na maior parte dos CCR (ARMAGHANY et al., 2012) e mutações desses oncogenes estão associadas a estágios iniciais da carcinogênese (FORRESTER et al., 1987), geralmente após mutações prévias em APC (ARMAGHANY et al., 2012).

A via APC/Wnt/ β -catenina tem papel crucial na carcinogênese de CCR familiar ou esporádico, sendo as mutações *frameshift* e *nonsense* em gene APC as mais comuns, resultando na síntese de uma proteína truncada. APC induz degradação de β -catenina e essa função implica na regulação negativa da via Wnt. Se não houver degradação da β -catenina, há prolongamento da via Wnt permitindo sobrevivência das células tronco neoplásicas. Além disso, mutações em APC podem culminar na hipermetilação ou mutação pontual da β -catenina, impedindo o processo natural de diferenciação e apoptose das células epiteliais (ARMAGHANY et al., 2012).

A proteína p53 é um supressor tumoral que dispara mecanismos de revisão celular em resposta a danos no DNA (LUKIN et al., 2015). Quando ocorre erro na replicação do DNA há estímulo para fosforilação de p53 que passa a atuar no núcleo estimulando genes de proteínas que inibem ciclo celular. Essa pausa no ciclo celular fornece mais tempo para que os sistemas de reparo corrijam os erros. Se os defeitos persistirem, p53 induz apoptose (BRASILEIRO FILHO, 2013). Mutações no gene TP53 provavelmente são necessárias para que ocorra progressão de adenoma para CCR (ARMAGHANY et al., 2012) e esse processo pode ser induzido por carcinógenos (ALMEIDA et al., 2015).

Com relação ao gene DCC, sabe-se que seu produto é uma proteína transmembrana que auxilia na adesão celular e nota-se que mais de 70% dos CCR apresentam deleção na região do cromossomo 18 que apresenta esse gene. Quando há mutação no gene DCC, não há ligação da proteína transmembrana com seu ligante e isso gera sobrevivência celular anormal (ARMAGHANY et al., 2012).

Por fim, observa-se que todos esses eventos moleculares descritos são acompanhados de mudanças histológicas que evoluem desde anormalidades moderadas na arquitetura tecidual até atingir o *status* avançado de neoplasia estabelecida. No intestino, tem-se preconizado que focos de criptas aberrantes (coleções de criptas com aparência anormal) são lesões pré-cancerígenas, sendo considerado um evento inicial no processo de carcinogênese (KHARE et al., 2009). Vale ressaltar que foi dado destaque aos mecanismos mais comuns e mais estudados até o momento, mas existem outros processos e outros genes que podem estar envolvidos na carcinogênese colorretal (ARMAGHANY et al., 2012).

2.3 Classificação tumoral e prognóstico

Para modelo experimental, as lesões neoplásicas podem ser classificadas microscopicamente em focos de criptas aberrantes, displasia, adenomas e carcinomas, sendo os carcinomas aquelas neoplasias que invadem as camadas adjacentes à mucosa. Os carcinomas podem ainda ser divididos em adenocarcinomas, adenocarcinomas mucinosos e carcinomas com células em anel de sinete. Os adenocarcinomas bem diferenciados são os mais comuns em ratos com CCR induzido por DMH (PERŠE; CERAR, 2005).

Ao considerar a classificação histopatológica de CCR em humanos, diversas variantes histológicas são encontradas, entre elas adenocarcinoma mucinoso, com células em anel de sinete, medular, micropapilar, adenoescamoso, indiferenciado, entre muitos outros (FLEMING et al., 2012). Em estudo retrospectivo com humanos verificou-se que a maior parte dos tumores são constituídos por adenocarcinomas, mas também podem ser encontrados com menor frequência carcinomas de células em anel de sinete, carcinoma de células escamosas ou carcinoma adenoescamoso (BENEDIX et al., 2011). Considera-se que neoplasias que apresentam células em anel de sinete possuem um pior prognóstico do que as demais, sendo os

carcinomas de células em anel de sinete os que possuem menor sobrevida (O'CONNELL; MAGGARD; KO, 2004).

Além da classificação microscópica, existem outras ferramentas que podem ser utilizadas na tentativa de determinar com maior precisão o prognóstico e prever qual o tempo de sobrevida do paciente. São exemplos o tamanho da massa tumoral, histórico familiar, avaliação histológica, idade, angiogênese tumoral, metástases, proteínas específicas, entre outros. O estabelecimento de fatores prognósticos é importante, pois permite definir a conduta terapêutica, sendo possível inclusive individualizar o tratamento de acordo com os dados obtidos por cada paciente (ABREU; KOIFMAN, 2002).

Ao avaliar fatores anatômicos e características patológicas de tumores colorretais, Benedix et al. (2011) verificaram diferença no crescimento tumoral e nas características histopatológicas de acordo com o segmento intestinal acometido. Observou-se que câncer em cólon descendente e em cólon ascendente possuem prognóstico melhor do que câncer nos demais segmentos. Isso significa que a sobrevida e a chance de cura são maiores nesses pacientes. Em contrapartida, o câncer de ceco é o que apresenta o pior prognóstico. Notou-se ainda, que quanto mais próximo o tumor está da valva ileocecal, menos diferenciado ele é. Isto significa que o prognóstico piora à medida que a neoplasia se aproxima da valva. Ao considerar modelos experimentais, CCR ocorre principalmente em cólon distal (PERŠE; CERAR, 2005).

Outros fatores prognósticos que podem ser investigados são os biomarcadores, geralmente de origem proteica, cujas alterações em suas concentrações normais estão relacionadas com desenvolvimento neoplásico (ALMEIDA et al., 2007). Entre esses marcadores pode-se citar HIF-1 α que permite adaptação à hipóxia (BRITO; SCHIAVON; MARANA, 2011) e VEGF que induz vascularização tumoral (SEMENZA, 1998). Essas duas proteínas terão suas características descritas adiante nesta revisão.

2.4 Modelo experimental de CCR induzido por 1,2-dimetilhidrazina

Além do CCR ocorrer de forma espontânea (WATSON; COLLINS, 2011), é possível induzir a lesão experimentalmente. As substâncias mais utilizadas para

induzir CCR esporádico em modelo experimental são 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e azoximetano (AOM), pois estes agentes possuem organotropismo pelas células da mucosa de cólon (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009) e são capazes de induzir as etapas de iniciação e promoção (PERŠE; CERAR, 2005). Em ratos, estas substâncias químicas são capazes de induzir lesão morfológicamente semelhante às lesões que ocorrem no cólon de humanos e, por este motivo, são bons modelos para estudo de câncer colorretal (STEFFEKOVÁ et al., 2014).

O DMH é metabolizado no fígado, passando pelos intermediários azometano, azoximetano e metilazoximetanol até chegar ao metabólito carcinogênico íon metildiazônio. Entretanto, alguns estudos em ratos demonstraram que as células epiteliais do cólon são capazes de metabolizar DMH sem ser necessário passar por nenhum outro tecido antes. Mas, de modo geral, o mecanismo envolve indução de metilação do DNA pelo íon metildiazônio, modificando tanto os ácidos nucleicos quanto histonas e outras proteínas de ligação ao DNA nas células alvo (PERŠE; CERAR, 2005).

A hipermetilação é um mecanismo epigenético de silenciamento gênico. A metilação ocorre quando há transferência de radicais metil por ação de enzimas metiltransferases, e isso atua sobre enzimas que fazem acetilação e desacetilação da cromatina. Os complexos proteicos nos quais ocorrem acetilação e desacetilação estão relacionados aos nucleossomos e controlam associação de histonas ao DNA. Uma vez alterada a estrutura da cromatina, pode haver alteração da expressão gênica (BRASILEIRO FILHO, 2013).

A utilização de DMH por via subcutânea é capaz de induzir rapidamente a formação de focos de criptas aberrantes, sendo possível observar essa alteração após duas semanas de indução neoplásica em ratos (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009). Para o estabelecimento de tumores macroscopicamente visíveis em ratos, considera-se necessário um período de cerca de 16 semanas (PERŠE; CERAR, 2005). Contudo, o tempo para estabelecimento das lesões depende das doses empregadas e do intervalo entre aplicações, assim, quanto maior a dose e maior o tempo de aplicação das injeções, maiores as chances de os focos de criptas aberrantes evoluírem para neoplasia (FEMIA et al., 2012; MOURA et al., 2012; PERŠE; CERAR, 2005).

Por ser uma doença cujos tratamentos utilizados atualmente ainda possuem limitações e alta taxa de mortalidade (JANEWEY; WALPORT; SHLOMCHIK, 2002),

a utilização de modelo experimental na tentativa de encontrar novas terapias contra o câncer possui grande importância clínica. Entre as vantagens desse tipo de modelo encontram-se a alta reprodutibilidade, a possibilidade de testar em animais nos quais já se tem extenso conhecimento sobre a genética das diferentes linhagens e a patogênese muito semelhante com a que ocorre em humanos. Todas essas características fazem com que esse modelo seja muito versátil e capaz de fornecer informações importantes a respeito do diagnóstico, prognóstico e tratamento do CCR (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

Nesse contexto, Grancieri (2016) avaliou os efeitos do consumo de farinha de yacon, uma planta com alto teor de FOS, sobre parâmetros intestinais e sistêmicos em ratos com CCR induzido por DMH e os resultados obtidos indicam que há melhora da permeabilidade intestinal, redução do pH intraluminal, aumento da profundidade de criptas e aumento do metabolismo oxidativo. Todos esses dados indicam que essa planta possui potencial benéfico em pacientes com CCR.

2.5 Ingestão de fibras, batata yacon e CCR

A alimentação equilibrada é fundamental para a manutenção da saúde do indivíduo, pois influencia diretamente na atividade dos probióticos. Os constituintes da dieta determinam a composição da microbiota intestinal e os metabólitos que serão gerados por esses microrganismos (KOH et al., 2016), e um dos fatores que define a qualidade desses metabólitos é a quantidade de fibras ingeridas (DEN BESTEN et al., 2013). Sabe-se que dietas ricas em fibras prebióticas aumentam a quantidade de bactérias benéficas ao organismo (CHEN et al., 2013) e essa microbiota é importante por digerir macronutrientes complexos, produzir nutrientes e vitaminas, defender a mucosa de patógenos, entre outras funções (KOH et al., 2016).

Fibras, proteínas e peptídeos que não são digeridos pelas enzimas do trato gastrointestinal superior são metabolizados pela microbiota do ceco e do cólon, e os principais produtos dessa fermentação são ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com destaque para acetato, propionato e butirato. Uma dieta pobre em fibra culmina com redução da fermentação e da produção de AGCC. A importância da ingestão de fibras é evidenciada pelo fato da administração oral de AGCC não apresentar o

mesmo efeito benéfico que sua produção pela microbiota, pois existe a possibilidade de grande parte ser absorvida no intestino delgado, assim, não haverá consumo pelos colonócitos e ocorrerá uma concentração periférica acima do normal (KOH et al., 2013).

Entre os efeitos benéficos dos AGCC, pode-se citar: inibição dos micro-organismos patogênicos, aumento da absorção de nutrientes (MACFARLANE; MACFARLANE, 2012), capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no sistema nervoso central diminuindo o apetite (acetato), proliferação de probióticos (KOH et al., 2016), redução do ganho de peso em ratos obesos (YAMASHITA et al., 2007), fonte de energia dos colonócitos (butirato), diminuição da inflamação intestinal, aumento da produção de mucina (RÍOS-COVIÁN et al., 2016) e proteção contra CCR (DONOHOE et al., 2014).

Além desses benefícios, já está bem elucidado que os prebióticos influenciam na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e isso protege contra doenças inflamatórias do intestino (LANGEN; DIELEMAN, 2009). Os produtos da fermentação bacteriana (AGCC) interagem com o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) causando um efeito de regulação positiva (FLOROWSKA et al., 2016), como manutenção da homeostase de populações de células T (TURRONI et al., 2014). Langen e Dieleman (2009) observaram que ratos suplementados com inulina melhoram a produção de IL-10 nas placas de Peyer e aumentam secreção de IgA no íleo, resultando na melhor imunidade intestinal.

Um dos mecanismos propostos para a redução da inflamação na mucosa é o aumento de glutathione S-transferase, importantes para combater estresse oxidativo (VAN DEN ENDE; PESHEV; DE GARA, 2011). Velez et al. (2010) acreditam que a ação imunoprotetora da fibra seja mediada pelo aumento total de IgA secretado, sem aumento concomitante de células T. Ao avaliar o efeito de frutooligossacarídeo (FOS) sobre infecção experimental com *Salmonella typhimurium*, esses autores relataram que ocorre uma resposta não específica que cursa com aumento de expressão de receptores TLR4 e CD206 e de células IL6+ e MIP1 α +. Isso tudo acaba por favorecer fagócitos e produção de IgA.

A suplementação com FOS na dieta de galinhas teve como resultado o aumento sérico de IgM e IgG sem alterar quantidade de macrófagos e linfócitos, e não houve diferença com relação a produção de IL-10, IFN- γ e IL-6. Assim, os autores levantaram a hipótese de que o efeito imunomodulador pode ser, em parte,

pela interação direta entre o prebiótico e as células inflamatórias da mucosa e também devido à ação indireta ao favorecer a colonização intestinal (JANARDHANA et al., 2009). De modo semelhante, Vaz-Tostes et al. (2014) notaram que IL-10, IL-6 e IFN- γ não apresentaram alterações após suplementação da dieta de crianças com FOS, mas houve aumento de IL-4 no plasma e de IgA fecal.

Com relação ao efeito protetor contra CCR, Donohoe et al. (2014) observaram que ao suplementar ratos com 6% de FOS/inulina houve aumento de butirato no lúmen intestinal, e este, por sua vez, atuou como inibidor de histonas desacetilases, exercendo assim efeito protetor. Por outro lado, Chen et al. (2013) verificaram que a deficiência crônica de fibra na dieta reduziu a quantidade de bactérias produtoras de butirato, com consequente redução na produção da AGCC, e isso poderia contribuir para formação de adenomas. Além disso, uma dieta desequilibrada permite aumento na quantidade de micro-organismos patogênicos e isso favorece a progressão de adenoma colorretal para CCR (CHEN et al., 2013).

O mecanismo exato pelo qual a fibra da dieta consegue exercer proteção contra CCR não está bem definido, mas foram propostos dois mecanismos não excludentes. O primeiro pressupõe que o consumo de fibra insolúvel torna o trânsito intestinal mais rápido, diminuindo assim o tempo de contato do epitélio com carcinógenos ingeridos. O segundo mecanismo propõe que as bactérias intestinais fermentam as fibras em AGCC e outros metabólitos benéficos (DONOHOE et al., 2014). Com relação à produção de AGCC, considera-se que o butirato seja capaz de regular a expressão gênica principalmente por aumentar acetilação de histonas, mas outros mecanismos são propostos como mudança no padrão de metilação do DNA, modulação de sinais intracelulares e modulação de expressão de genes que induzem apoptose e inibem proliferação de células neoplásicas, tais como p21, DAF, BAK, VEGF e HIF-1 α (HAMER et al., 2008).

As histonas são porções das proteínas do núcleo dos nucleossomos e o estado de acetilação das histonas é determinado por duas enzimas, as histona acetiltransferases (HAT) e as histona desacetilases (HDAC). A atividade de ambas está relacionada ao câncer, pois acetilação/desacetilação dessas proteínas regula a expressão gênica. HDAC removem grupos acetil dos resíduos de lisina localizados na cauda aminoterminal das histonas. Sabe-se que genes ativos possuem mais histonas acetiladas do que genes silenciosos, pois nucleossomos desacetilados se ligam ao DNA e inibem a transcrição por “bloquear” o acesso de fatores de

transcrição, complexos regulatórios e enzimas ao DNA (MARKS; RICHON; RIFKIND, 2000).

Inibidores de histona desacetilases (iHDAC), entre eles o butirato, têm sido utilizados na terapia anticâncer por terem efeitos sobre a proliferação celular, sobre a apoptose e sobre a angiogênese tumoral (MENDITI; KANG, 2007) (Figura 1).

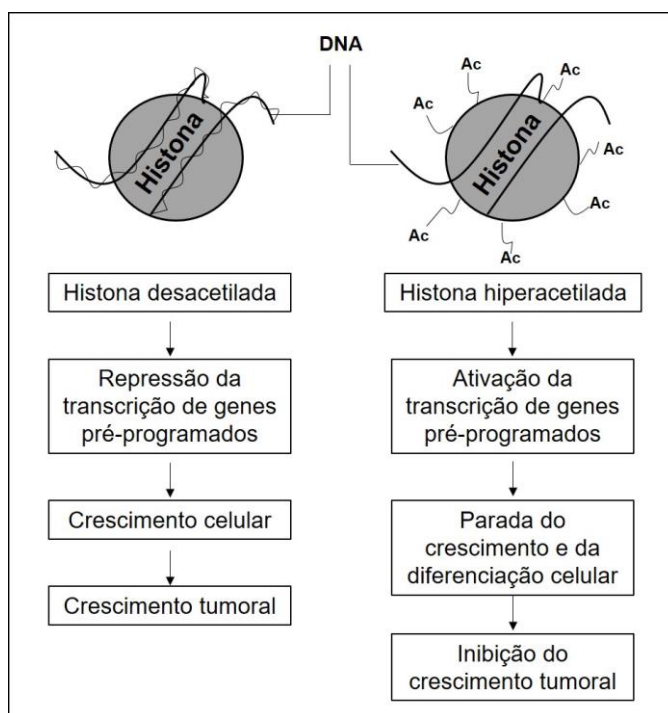


Figura 1 - Mecanismo de ação dos inibidores de histona desacetilases (iHDAC) que induzem parada do crescimento e diferenciação celulares e apoptose. iHDAC geram acetilação das histonas e isso afasta o DNA da histona desacetilada. A proposta é que o acúmulo de histonas acetiladas nos nucleossomos induzem expressão de genes específicos, que estimulam os efeitos citados acima e inibem o crescimento tumoral.

Fonte: adaptado de Marks, Richon e Rifkind (2000).

Dentre as substâncias que podem ser fornecidas na dieta para aumentar fermentação bacteriana e consequentemente gerar maior produção de AGCC encontra-se o grupo dos frutanos, entre eles FOS. FOS é encontrado em diversos legumes e frutas, porém, apresenta a maior concentração já identificada na natureza no tubérculo de uma planta conhecida como batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e, por este motivo, vários estudos têm sido desenvolvidos com essa batata (CAETANO et al., 2016).

FOS é considerado um prebiótico devido a sua capacidade de promover equilíbrio da microbiota intestinal (ANVISA, 2016b). Ao “escapar” da degradação

enzimática nas porções iniciais do trato gastrointestinal, o FOS passa pelo processo de fermentação bacteriana e os produtos dessa fermentação são AGCC (KOH et al., 2016), cujos efeitos foram citados anteriormente.

Yacon é uma planta herbácea nativa da região dos Andes na América do Sul. Suas raízes variam em tamanho e forma e são consumidas cruas, com sabor doce e textura semelhante à de uma maçã (CAETANO et al., 2016). A polpa da raiz é amarelada, crocante e aquosa e, apesar da principal forma de consumo ser *in natura*, também é possível cozinhar ou fritar (SANTANA; CARDOSO, 2008). Em modelos experimentais é comum a utilização de yacon na forma de farinha e essa farinha tem cerca de 86% de carboidrato, com destaque para uma grande quantidade de FOS (DELGADO et al., 2012).

Até o presente momento não foram demonstrados efeitos nocivos graves relacionados ao consumo subcrônico de yacon. De modo geral, os prebióticos podem causar efeitos adversos como dor abdominal, flatulências, diarreia e inchaço, mas todos esses efeitos são dose-dependentes (LANGEN; DIELEMAN, 2009). Com relação aos efeitos tóxicos, a avaliação microscópica de rins e fígado de ratos suplementados com yacon demonstrou que não houve qualquer tipo de alteração histopatológica causada pelo consumo da batata (GENTA et al., 2005). Contudo, percebe-se que mais estudos são necessários, pois o potencial que essa planta possui para melhorar a saúde do organismo é muito grande, no entanto, ainda falta conhecimento sobre todos os efeitos benéficos (CAETANO et al., 2016) e sobre os mecanismos envolvidos nesses efeitos (DONOHOE et al., 2014).

Apesar dos benefícios, o cultivo e o consumo de yacon ainda não são comuns no Brasil. Acredita-se que a planta é pouco popular no país em consequência de dificuldades de armazenamento do produto após a colheita e pela sazonalidade da produção. Faz-se necessário maior divulgação das qualidades da planta, aprimorar técnicas de processamento/armazenamento e comprovar os efeitos benéficos para a saúde para que este produto seja acessível e desperte o interesse da população (SANTANA; CARDOSO, 2008).

2.6 Ácidos graxos e a produção de mucina

Em estudos de avaliação de cólon, um parâmetro importante a ser analisado é a produção de muco, pois a mucosa do trato gastrointestinal é recoberta por uma camada de muco com função de proteção e esse muco pode sofrer alterações em resposta a agressões sofridas pelo epitélio intestinal (MELO-JUNIOR et al., 2006).

Existe um sistema de duas camadas na barreira mucoprotetora do intestino grosso. Esse sistema é complexo e compreende uma camada externa (mais próxima do lúmen) que fornece condições adequadas para bactérias simbióticas, e uma camada interna (mais próxima da mucosa) que é impermeável às bactérias e deste modo atua protegendo o epitélio do intestino (JOHANSSON et al., 2011). Fazem parte do muco as mucinas, que são glicoproteínas de alto peso molecular, classificadas em ácidas ou neutras, sendo as ácidas subdivididas em sialomucinas e sulfomucinas (FARIA JUNIOR et al., 2007).

A atividade secretória das células de goblet está sob controle de vários fatores luminais primários e secundários (BARCELO et al., 2000) e entre esses fatores encontram-se os AGCC. Em estudo realizado por Jung et al. (2015), comprovou-se que a secreção de mucinas é modulada pelo butirato, aumentando a aderência de bactérias benéficas. Gaudier et al. (2004) demonstraram que esse AGCC é capaz de modular a expressão de genes MUC em células do epitélio intestinal e essa modulação varia de acordo com o gene estudado. A respeito disso, sabe-se que os adenocarcinomas não mucinosos apresentam redução da expressão de MUC2 e essa redução contribui para a carcinogênese (BYRD; BRESALIE, 2004).

MUC2 é o gene que codifica a principal mucina que compõe a camada mucoprotetora (ALLEN; HUTTON; PEARSON, 1998) e a redução na expressão de MUC2 em CCR pode estar relacionada com a metilação de promotores. Sabe-se que sequências promotoras de MUC2 presentes em linhagens celulares com alta expressão de MUC2 não estão metiladas, enquanto linhagens com baixa expressão estão completamente metiladas. Observa-se ainda, que ocorre aumento da expressão de MUC2 se houver inibição da metilação. Outro mecanismo proposto é a perda funcional de p53 nos CCR, tendo em vista que p53 regula a transcrição de MUC2 (BYRD; BRESALIER, 2004).

O mecanismo exato envolvido no estímulo para expressão de MUC2 pelo butirato não está claro, mas acredita-se que há envolvimento da cascata ERK pois,

ao inibir esta cascata, há também a inibição da produção de muco (HATAYAMA et al., 2007). Com relação à maior efetividade do butirato do que dos demais AGCC, foram propostos dois mecanismos: primeiro, a própria molécula de butirato poderia atuar sobre a expressão gênica; segundo, o butirato é fonte de energia para os colonócitos enquanto os outros AGCC vão para a circulação porta, assim, sua capacidade para atuar sobre essas células é maior. Entre os dois, é mais aceito que o butirato consiga modular a expressão gênica, pois já foi demonstrado que existem elementos responsivos ao butirato em vários genes promotores (GAUDIER et al., 2004).

2.7 Biomarcadores HIF-1 α e VEGF na avaliação do câncer

Expressão de biomarcadores é uma ferramenta utilizada para auxiliar na avaliação do prognóstico dos pacientes com câncer (ALMEIDA et al., 2007) e, ao considerar modelos experimentais de CCR induzido suplementados com yacon, até o presente momento há relato de redução da expressão de Ki-67 e PCNA indicando menor taxa de proliferação celular (ALMEIDA et al., 2015; MOURA et al., 2012), ausência de efeito sobre a expressão de p53 e caspase-3 indicando que não altera taxa de apoptose (ALMEIDA et al., 2015; MOURA et al., 2012) e menor expressão de β -catenina anormal em CCR, o que ajuda a identificar a progressão tumoral (MOURA et al., 2012). Ainda assim, a expressão de várias outras proteínas pode ser evidenciada em nível de cólon, como por exemplo o fator induzido por hipóxia (HIF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SEMENZA, 1998).

Sabe-se que o oxigênio é a substância consumida em maior quantidade pelos mamíferos e em situações em que há redução da oxigenação tecidual o indivíduo pode chegar ao óbito rapidamente. Desse modo, considera-se a hipóxia como o principal fator que contribui para a patofisiologia de muitas doenças (SEMENZA, 1998). Contudo, os mamíferos desenvolveram mecanismos adaptativos para superar situações de hipóxia tecidual e a principal forma encontrada para isso é a ativação de vias de transdução de sinais, ativando o fator de transcrição chamado de fator induzido por hipóxia HIF (BERRA; GINOUVÈS; POUYSSÉGUR, 2006).

Dentre as unidades de HIF existentes (HIF- α e HIF- β), acredita-se que a HIF- α seja o principal fator ativado em condições de baixa oxigenação (BAGNALL et al.,

2014), sendo responsável pela transcrição de muitos genes relacionados às respostas celulares e sistêmicas. Além disso, são reconhecidas três subunidades de HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α (BERRA; GINOUVÈS; POUYSSÉGUR, 2006), sendo a HIF-1 α apontada como a responsável por identificar o nível de oxigênio nos tecidos, desta forma é crucial para a resposta à hipóxia (WANG et al., 2013).

Ao considerar o trato gastrointestinal, sabe-se que ocorre uma “hipóxia fisiológica” nas células epiteliais do intestino e esse órgão consegue manter suas funções mesmo com uma quantidade muito pequena de oxigênio. Acredita-se que um dos mecanismos evolutivos desenvolvidos para superar tal condição de hipóxia constante é uma regulação basal de HIF intestinal e, justamente por ser tão importante para o epitélio intestinal, quando há perda da expressão de HIF-1 α observa-se maior suscetibilidade a doenças inflamatórias, pois a redução na expressão epitelial de HIF-1 α gera anulação de genes relacionados à defensas, deixando os ratos mais suscetíveis a colite experimental (KELLY et al., 2013). Além disso, manipular a atividade da HIF-1 pode vir a contribuir com a terapia anticâncer, pois acredita-se que sua inibição possa impedir a adaptação à hipóxia resultando em menor oxigenação e consequentemente morte celular (SEMENZA, 1998).

Os mecanismos de adaptação à hipóxia induzidos por HIF-1 α são utilizados não só pelas células saudáveis, mas também pelas células neoplásicas, pois tumores de rápido crescimento enfrentam uma situação de hipóxia devido ao baixo suprimento sanguíneo. A forma encontrada para superar essa hipóxia é o aumento da expressão de HIF-1 α , que por sua vez estimula a expressão de VEGF, e esse irá estimular a neovascularização no tumor (SEMENZA, 1998).

Para que ocorra progressão de um tumor pouco vascularizado para um tumor altamente vascularizado é necessário que haja desequilíbrio no balanço entre fatores pró- e antiangiogênicos, com fatores pró-angiogênicos sobressaindo-se (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009). VEGF é considerado o principal fator pró-angiogênico tanto em situações fisiológicas quanto patológicas (FERRARA, 2004) e, ao considerar o CCR, aumento de expressão de VEGF também aumenta as chances de ocorrência de metástase por via hematogêna e representa um pior prognóstico para o paciente (ELLIS et al., 2000).

Assim, o tratamento com substâncias antiangiogênicas tem sido utilizado na tentativa de impedir desenvolvimento e adaptação tumorais (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009). Ao avaliar o efeito de anticoagulantes sobre a

neovascularização, Battinelli et al. (2014) observaram que administração de heparina reduz o potencial angiogênico das plaquetas, resultando em diminuição de VEGF, enquanto Keunen et al. (2011) relataram que tratamento com bevacizumab reduz formação de novos vasos e diminui o consumo de oxigênio em glioblastomas, porém, ativa vias angiogênicas alternativas e aumenta invasão tumoral em tecidos adjacentes ao tumor. Outra substância antiangiogênica já testada é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que atua inibindo proliferação de células endoteliais por diminuir quantidade de mRNA de receptores para VEGF nas células (PATTERSON et al., 1996). Ao considerar o uso de butirato, os resultados apontam para redução da neovascularização por diminuição de mRNA de VEGF (GURURAJ; BELAKAVADI; SALIMATH, 2003) e aumento de transcrição e de proteínas da família VEGF com atividade antiangiogênica (CIURA; JAGODZINSKI, 2010), ambos em tecidos ou células não neoplásicas.

Observa-se que há um aumento de 3-6 meses na sobrevida dos pacientes tratados com substâncias antiangiogênicas, porém, essa maior sobrevida não é acompanhada de melhora clínica e, após algum tempo, o câncer adquire capacidade de se adaptar por alterar expressão de outros fatores angiogênicos, tais como fator de crescimento placentário e fator de crescimento fibroblástico (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009). Além disso, é difícil definir exatamente quais pacientes são candidatos a esse tipo de terapia, pois nem toda neoplasia é responsiva ao VEGF, então faz-se necessário examinar com cautela as situações nas quais substâncias antiangiogênicas podem ser utilizadas (SAIF, 2013).

CAPÍTULO 1

Suplementação alimentar com farinha de yacon altera a produção de mucina intestinal em ratos com câncer colorretal induzido?

Does alimentary supplementation with yacon flour alter intestinal mucin production in rats with induced colorectal cancer?

Resumo: A batata yacon é uma importante fonte de frutooligossacarídeo e sua fermentação bacteriana produz butirato, um ácido graxo de cadeia curta capaz de estimular produção de muco intestinal. Objetivou-se avaliar as alterações histopatológicas e a produção de mucina intestinal em modelo experimental de câncer colorretal induzido em ratos suplementados com batata yacon. Um total de 43 ratos Wistar foram divididos em quatro grupos experimentais: C: grupo não tratado; N: grupo tratado com DMH; Y: grupo tratado com yacon; NY: grupo tratado com DMH e com yacon. As amostras de intestino foram coradas com hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff e Alcian Blue. As lesões encontradas foram linfocitose, hiperplasia linfoide, dilatação glandular, epitélio atípico, displasia, adenomas e adenocarcinomas. As colorações PAS e AB revelaram aumento na produção de mucina neutra sem alterar produção de mucinas ácidas. Conclui-se que a suplementação alimentar com farinha de yacon aumenta a produção de mucina neutra em animais com câncer colorretal induzido e não altera produção de mucina ácida.

Palavras-chave: DMH, FOS, glicoproteínas, mucina ácida, mucina neutra.

Abstract: The yacon is an important source of FOS and its bacterial fermentation produces butyrate, a short-chain fatty acid able to stimulate intestinal mucus production. The objective of this study was to evaluate histopathological alterations and intestinal mucin production in experimental model of induced colorectal cancer in rats supplemented with yacon. A total of 43 Wistar rats were allocated into four experimental groups: C: untreated group; N: DMH-treated group; Y: yacon-treated group; NY: DMH + yacon-treated group. Intestinal samples were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB). The lesions found

were lymphocytosis, lymphoid hyperplasia, glandular dilation, atypical epithelium, dysplasia, adenomas and adenocarcinomas. PAS and AB stains revealed increase in neutral mucin production without alteration in acid mucin production. In conclusion, alimentary supplementation with yacon flour increases neutral mucin production in animals with induced colorectal cancer and do not alter acid mucin production.

Keywords: acid mucin, DMH, FOS, glycoproteins, neutral mucin.

INTRODUÇÃO

Fibras solúveis provenientes da alimentação são fermentadas por bactérias intestinais gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e esses ácidos, por sua vez, possuem diversos efeitos benéficos, entre eles aumento da produção de mucina intestinal (Jung *et al.*, 2015) e proteção contra câncer colorretal (CCR) (Donohoe *et al.*, 2014). A mucina atua, entre outras funções, como substrato e como fator de adesão para a microbiota e essa habilidade para aderir ao muco é uma característica fundamental para a colonização da mucosa intestinal (Ouwehand e Salminen, 2003). Destaca-se ainda que a secreção de muco influencia na patogênese da progressão tumoral, impedindo o desenvolvimento de lesões malignas (Chen *et al.*, 2013). O modo como o consumo de fibra consegue exercer efeito de proteção contra CCR não está completamente esclarecido, mas acredita-se que ocorra devido a uma associação de fatores como aceleração do trânsito intestinal, aumento da microbiota benéfica e maior produção de AGCC (Donohoe *et al.*, 2014).

Entre os alimentos que apresentam grande quantidade de fibras pode-se citar vegetais que apresentam frutooligosacarídeos (FOS) em sua constituição (Delgado *et al.*, 2013). FOS é encontrado em diversos legumes e frutas, porém, apresenta a maior concentração já identificada na natureza no tubérculo de uma planta conhecida como batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e, por este motivo, vários estudos têm sido desenvolvidos com essa batata (Caetano *et al.*, 2016). Assim, ao considerar a importância dos AGCC produzidos pela microbiota intestinal e sua influência sobre a produção de mucina, bem como o papel promissor do consumo de batata yacon como fonte de fibras, objetivou-se avaliar as alterações histopatológicas e a produção de mucina intestinal em modelo experimental de câncer colorretal induzido em ratos suplementados com batata yacon.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 43 ratos Wistar machos adultos, com peso inicial de 207 ± 5 g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e mantidos em gaiolas individuais no Laboratório de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana da UFES, sob temperatura constante de 22° Celsius e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. A manutenção e os procedimentos para uso dos animais em experimentação utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFES, sob protocolo nº 004/2014.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo C sem indução de neoplasia colorretal (CCR) e sem tratamento com farinha de yacon (FY); grupo N com indução de CCR (protocolo de cinco injeções intraperitoneais de 1,2-dimetilhidrazina [D161608, N,N-dimetilhidrazina, Sigma-Aldrich, Estados Unidos], na dose de 25 mg/kg de peso, sendo uma injeção por semana) e sem tratamento com FY; grupo Y sem indução de CCR e com tratamento com FY; e grupo NY com indução de CCR e com tratamento com FY. Todos os animais receberam ração comercial (In Vivo ração para roedores, InVivo, Brasil), durante as 13 semanas iniciais e água *ad libitum* durante todo o experimento, independente da indução neoplásica. Nas 8 semanas seguintes, os animais dos grupos C e N receberam dieta AIN-93M e os grupos Y e NY passaram a receber farinha de yacon adicionada à dieta AIN-93M, em quantidade suficiente para fornecer 7,5% de FOS, de acordo com Lobo *et al.* (2011).

O processamento da farinha de yacon foi realizado no Laboratório de Técnica Dietética e no Laboratório de Operações Unitárias da UFES e a análise do teor de FOS e açúcares simples da farinha de yacon foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT), Botucatu, São Paulo. As análises de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras e cinzas da farinha de yacon foram feitas de acordo com o método AOAC (1997) (Tab. 1).

97 Tabela 1 - Composição da farinha de yacon.

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

98

99 As dietas experimentais (Tab. 2) foram elaboradas manualmente no Laboratório
100 de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana da UFES, e os ingredientes foram
101 adicionados em quantidades determinadas segundo recomendações do *American*
102 *Institute of Nutrition for Rodents* (Reeves *et al.*, 1993), seguindo o protocolo AIN-93M
103 recomendado para dieta de manutenção de animais adultos.

104

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

Ingredientes (g/100g)	Grupos C e N AIN-93M	Grupos Y e NY AIN-93M + FY
Caseína	14,0	13,14
Amido dextrinizado	15,5	15,5
Sacarose	10,0	7,24
Óleo de soja	4,0	4,0
Fibra	5,0	0
Mix minerais	3,5	3,5
Mix vitamínico	1,0	1,0
L-cistina	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido de milho	46,57	40,81
Farinha de yacon	0	14,37
Energia total (kcal)	380,28	356,37

106 C= grupo sem indução de neoplasia de cólon e sem farinha de yacon; N= grupo com indução de neoplasia
107 de cólon e sem farinha de yacon; Y= grupo sem indução de neoplasia de cólon e com farinha de yacon;
108 NY= grupo com indução de neoplasia de cólon e com farinha de yacon. FY= Farinha de yacon.

109

110 Toda farinha utilizada pertencia ao mesmo lote de raízes yacon. Em todos os
111 grupos foi realizado ajuste à dieta padrão AIN-93M a fim de obter a mesma
112 concentração de calorias, carboidratos, açúcares, proteínas e fibras em todas as dietas,
113 sendo o FOS o único adicional das dietas dos grupos Y e NY.

114 Após as oito semanas de suplementação com yacon os animais foram
115 eutanasiados e necropsiados para coleta de intestino grosso. Foi realizada lavagem do

segmento com injeção de solução fisiológica, abertura longitudinal na porção mesentérica, acondicionamento em placa de isopor e fixação em solução de formol a 10%. Os segmentos fixados foram enrolados em formato semelhante ao de rocambole. Posteriormente, realizou-se clivagem e acondicionamento do tecido em cassette histológico para processamento de rotina para inclusão em parafina. Foram utilizados cortes de três micrômetros de espessura. Para classificação geral das lesões não neoplásicas e neoplásicas foram utilizadas as lâminas coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE), bem como, as descrições de Werner (2015) para lesões displásicas e de Perše e Cerar (2011) para lesões neoplásicas. Ainda o conceito de carcinomatose peritoneal foi considerado conforme Lopes e Carneiro (2011). Para avaliação histoquímica, as lâminas foram coradas pelos métodos de Alcian Blue (AB) para avaliação da produção de mucina ácida e ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação da produção de mucina neutra, e, posteriormente, foram analisadas por microscopia óptica, por dois observadores patologistas, que receberam as mesmas lâminas para análise, sem discussão prévia dos achados. O escore de cada amostra foi determinado por análise semiquantitativa, considerando-se o número de células coradas (0 para negativo; 1 para 1-25% das células positivas; 2 para 25-50% das células positivas; 3 para >50% das células positivas) e a intensidade de marcação (0 para negativo; 1 para fraca; 2 para moderada; 3 para forte). Ambas as pontuações foram multiplicadas (Soini *et al*, 2000; Campos *et al*, 2009) e o escore resultante foi utilizado.

Para a avaliação geral das lesões no cólon utilizou-se análise estatística descritiva baseada em percentuais. Para a avaliação histoquímica utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e, nos casos em que se obteve $p < 0,05$, realizou-se teste *a posteriori* de Dunn. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do software BioEstat® 5.3.

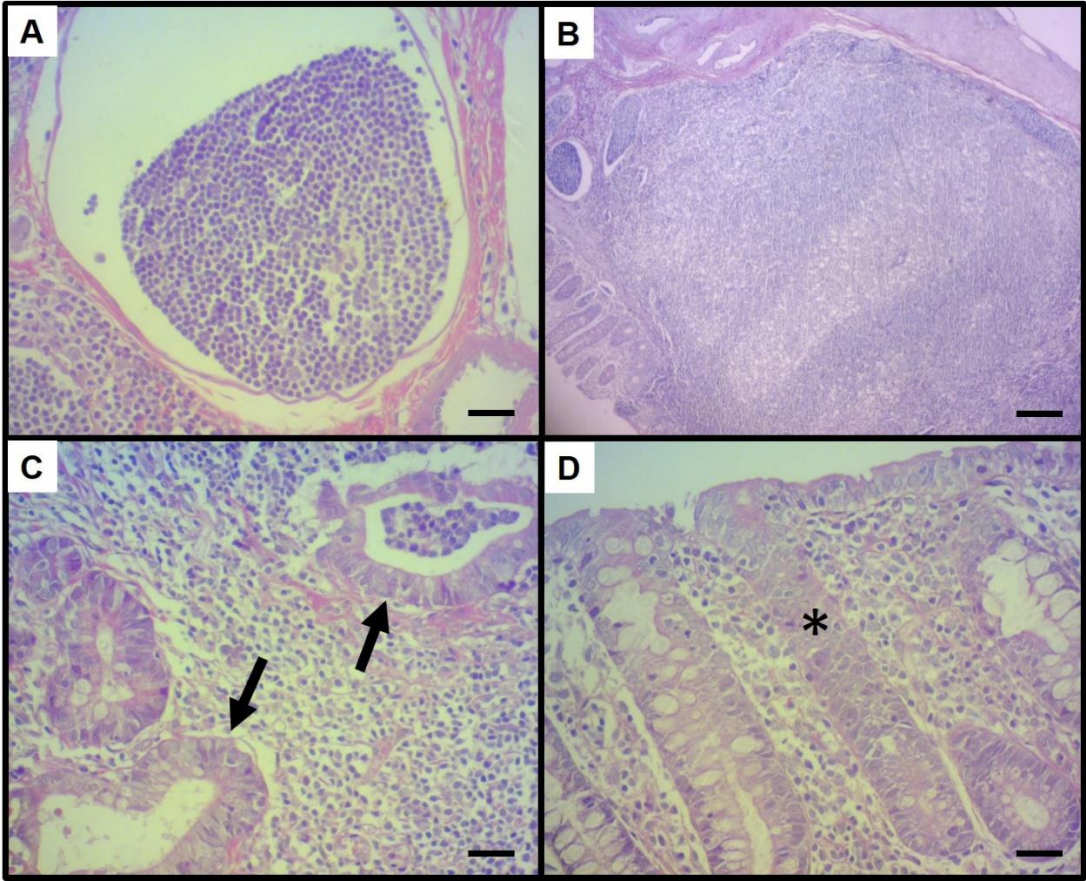
RESULTADOS

A análise microscópica revelou que 65,1% (28/43) das amostras apresentaram algum tipo de alteração histopatológica e as lesões não neoplásicas foram linfocitose, hiperplasia linfoide, dilatação glandular, displasia (Fig. 1) e epitélio atípico. Também foram observadas neoplasias benignas e malignas. Vale ressaltar que algumas amostras apresentavam duas ou mais lesões concomitantes (Tab. 3).

148 Tabela 3. Valores percentuais das lesões histopatológicas observadas em ratos com câncer colorretal
149 induzido tratados com batata yacon.

		Grupo*			
		C (=10)	N (n=12)	NY (n=11)	Y (n=10)
Lesão**	Linfocitose	0%	25% (3/12)	27,3% (3/11)	0%
	HL ***	0%	8,3% (1/12)	0%	50% (5/10)
	DG***	0%	16,7% (2/12)	9,1% (1/11)	30% (3/10)
	EA***	0%	100% (12/12)	100% (11/11)	0%
	Displasia	0%	33,3% (4/12)	18,2% (2/11)	0%
	NB***	0%	0%	18,2% (2/11)	0%
	NM***	0%	8,3% (1/12)	36,4% (4/11)	10% (1/10)

150 * C = controle, N = neoplasia sem suplementação de yacon, NY = neoplasia com suplementação de yacon,
151 Y = suplementação de yacon. ** Uma mesma amostra pode ter apresentado mais de um tipo de lesão. ***
152 HL: hiperplasia linfoide; DG: dilatação glandular; EA: epitélio atípico; NB: neoplasia benigna; NM:
153 neoplasia maligna.



156 Figura 1. Fotomicrografias de cólon de rato apresentando alterações não neoplásicas, coloração HE. A)
157 Linfocitose. Barra=60,4µm. B) Hiperplasia linfoide. Barra=120,89µm. C) Dilatação glandular (setas).
158 Barra=60,4µm. D) Células de goblet displásicas (asterisco). Barra=60,4µm.

161 As neoplasias benignas foram encontradas em dois (4,7%) animais e
162 classificadas como adenoma tubular (amostras NY10 e NY12). Por outro lado, as
163 neoplasias malignas foram encontradas em seis (14%) animais e classificadas em

adenocarcinoma mucinoso (amostras N10 e NY9), adenocarcinoma tubular (amostras NY3 e Y4) e carcinomatose (amostras NY6 e NY11) (Fig. 2).

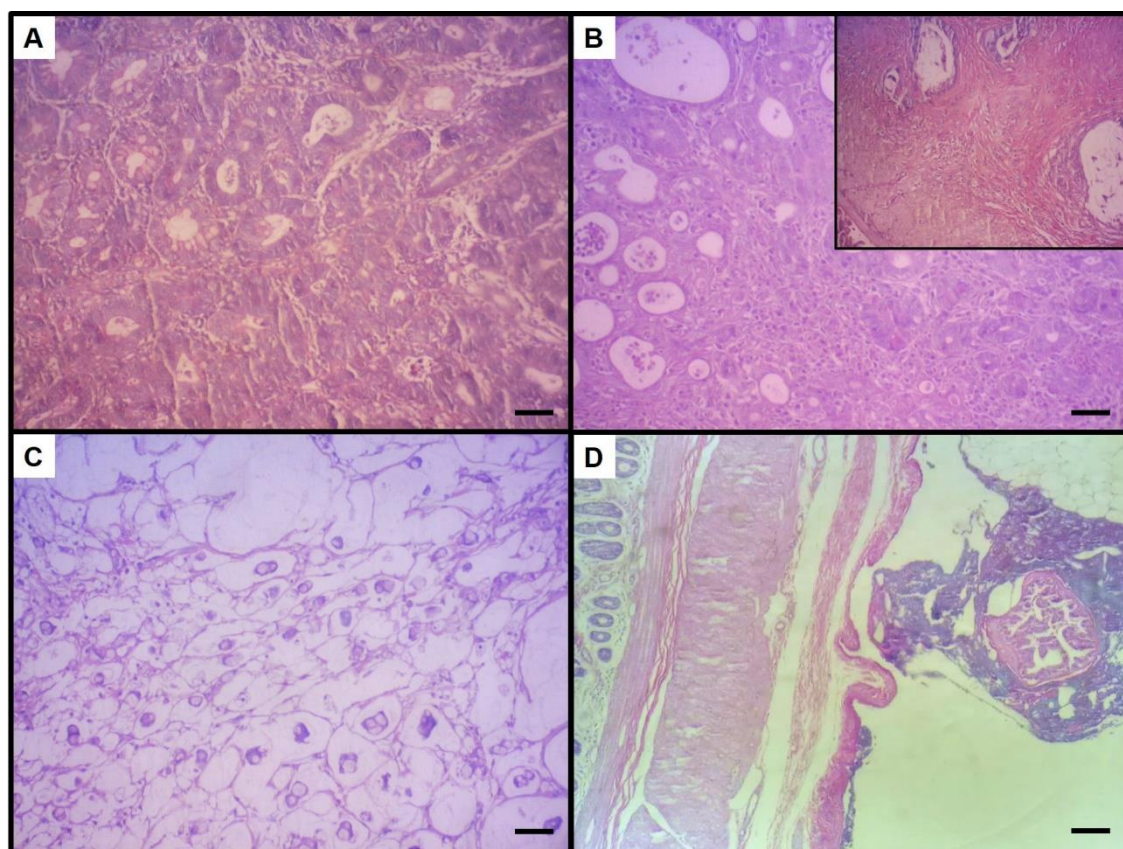


Figura 2. Fotomicrografias de cólon de rato apresentando alterações neoplásicas, coloração HE. A) Adenoma tubular, amostra NY10. Barra=97µm. B) Adenocarcinoma tubular, amostra NY3. Barra=97µm. Layout evidencia invasão das camadas adjacentes à mucosa pelas células tumorais. C) Adenocarcinoma mucinoso, amostra NY9. Barra=97µm. D) Carcinomatose, amostra NY11. Barra=97µm.

Com relação à localização das lesões, observou-se que quatro amostras (N10, NY3, NY6 e NY11) apresentaram neoplasia em região de reto, uma amostra (NY9) apresentou neoplasia em região de distal, duas amostras (NY10 e NY12) apresentaram neoplasia em região de cólon médio e uma amostra (Y4) apresentou neoplasia em região de cólon proximal. As duas neoplasias benignas encontradas neste trabalho localizavam-se em região de cólon médio.

Quando considerada a avaliação pela coloração PAS, verificou-se que os animais do grupo N apresentaram escore de marcação para mucina neutra significativamente inferior aos animais dos grupos C e aos animais do grupo NY ($p < 0,05$) (Fig. 3) e não houve diferença entre os animais do grupo C e os animais do grupo Y ($p > 0,05$).

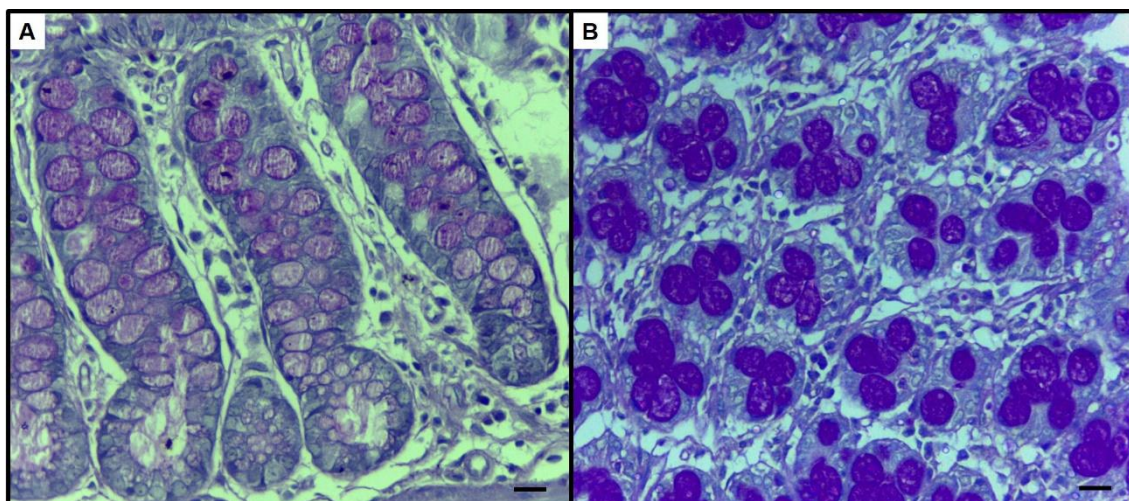


Figura 3. Fotomicrografias de mucosa de cólon de rato, coloração PAS. A) Amostra do grupo N evidenciando intensidade de marcação fraca no interior das células de goblet. Barra=20µm. B) Amostra do grupo NY evidenciando intensidade de marcação forte no interior das células de goblet. Barra=20µm.

Em relação à produção de mucina ácida pela coloração de Alcian Blue não foi encontrada diferença estatística entre os grupos estudados ($p=0,2455$).

DISCUSSÃO

Em relação às alterações não neoplásicas, a linfocitose estava, na maior parte das vezes, em áreas com proliferação de tecido linfoide. Este tipo de lesão, em condições não experimentais, possui duas causas frequentes nos animais domésticos - resposta à excitação e leucemia - e a interpretação depende da contagem e da morfologia celular, apesar de em muitos casos ser difícil determinar a etiologia apenas com esses parâmetros (Thrall *et al.*, 2015). Ao considerar a linfocitose em resposta à excitação, existe a possibilidade de a lesão ter sido induzida pelo estresse da manipulação dos animais no momento imediatamente anterior à eutanásia. Todavia, como a alteração só foi observada em animais de grupos com indução neoplásica, acredita-se que a lesão esteja relacionada com as mudanças celulares provocadas pelo DMH, e, talvez, represente um processo inicial de malignização. Nesse sentido, já foi relatado que DMH é capaz de induzir leucemia em modelo experimental, ainda que a incidência seja baixa (Tsubura *et al.*, 1993).

Por outro lado, em humanos, linfocitose intraepitelial aparece em casos de doença celíaca, provavelmente devido a uma resposta crônica antiglúten mediada por células T com resposta do tipo Th1. Na doença celíaca nem sempre os sintomas estão presentes e a doença pode ficar latente por longos períodos (Westbrook *et al.*, 2010).

Até o presente momento não existe evidência de resposta imune contra antígenos da batata yacon, desta forma, apesar de possível, é pouco provável que esse seja o mecanismo envolvido na linfocitose aqui descrita. Além disso, o fato de alguns animais que não consumiram yacon também apresentarem essa alteração reafirma que a lesão provavelmente está relacionada com a carcinogênese, conforme proposto anteriormente. Desta forma, verifica-se que a linfocitose, que foi um achado incidental neste trabalho, necessita de estudos específicos para determinar quais os mecanismos envolvidos em sua etiopatogenia.

Outro achado frequente foi a hiperplasia do tecido linfoide associado ao intestino (GALT). Sabe-se que hiperplasia linfoide em linfonodos é frequente em humanos com CCR e este achado é geralmente associado a maior tempo de sobrevida do paciente (Pihl *et al.*, 1980). Porém, no presente trabalho a hiperplasia linfoide foi encontrada em uma amostra que não apresentou tumor e, assim, é possível que tenha sido uma reação específica do animal a algum estímulo individual. Com relação aos animais do grupo Y, a conhecimento do autor ainda não há relato de hiperplasia de GALT provocada pelo consumo de yacon, mas sabe-se que FOS estimula o sistema imunológico e o mecanismo para isso provavelmente envolve o aumento na quantidade de bactérias ácido-láticas, que por sua vez modulam a expressão de citocinas que ativam diferentes subpopulações de linfócitos T e células dendríticas (Delgado *et al.*, 2010). Ainda, Janardhana *et al.* (2009) consideram a hipótese de que o efeito imunomodulador é em parte pela interação direta entre o prebiótico e as células inflamatórias da mucosa e também devido a ação indireta ao favorecer a colonização intestinal. Assim, observa-se que os estudos preliminares indicam que muitas células/substâncias podem estar envolvidas na imunomodulação induzida por FOS, o que torna o mecanismo complexo e ainda a ser totalmente desvendado.

Dilatação glandular, epitélio atípico e displasia são achados frequentes em modelo experimental de CCR induzido por DMH, sendo todos estes atribuídos ao delineamento utilizado (Winneker *et al.*, 1977). Entretanto, neste estudo, animais sem indução neoplásica apresentaram dilatação glandular e foi observado que essa dilatação estava sempre associada as áreas de hiperplasia linfoide. Assim, acredita-se que a dilatação seja reflexo do aumento na quantidade de células linfoides, pois essas células

são capazes de liberar citocinas e interleucinas que induzem alterações celulares (Westbrook *et al.*, 2010).

Apenas um animal do grupo N desenvolveu neoplasia, apesar de alterações pré-neoplásicas como displasia terem sido mais frequentes. A substância mais utilizada para induzir CCR em modelo experimental é o DMH devido ao seu organotropismo e semelhança com as lesões humanas, todavia, diversos protocolos são reconhecidos, com doses variando de 10 a 20mg/kg durante 5 a 20 semanas, podendo chegar a modelos com doses de até 65mg/kg (Larangeira *et al.*, 1998). O protocolo de indução utilizado neste trabalho foi de cinco semanas, tempo suficiente para que lesões pré-neoplásicas possam ser observadas microscopicamente (Rosenberg *et al.*, 2009). No entanto, para que tumores possam ser encontrados na maior parte dos indivíduos avaliados, considera-se necessário um período de cerca de treze semanas (Winneker *et al.*, 1977). Ainda assim, o objetivo primário deste trabalho não foi afetado devido à baixa incidência de tumores nos animais do grupo N, pois foi possível encontrar lesões celulares pré-neoplásicas que comprovam a ação do DMH sobre as células, inclusive gerando alterações na produção de mucina.

O delineamento utilizado no presente estudo tinha por objetivo avaliar os efeitos da suplementação com farinha de yacon sobre a produção de mucina em ratos após o estabelecimento de lesões na mucosa intestinal, então em nenhum grupo experimental foi feita suplementação antes do início da intervenção com DMH. De acordo com Almeida *et al.* (2015) a administração de extrato aquoso de batata yacon por duas semanas antes da indução neoplásica exerceu efeito de proteção contra estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, sem efeito durante as fases de promoção e progressão. Desta forma, acredita-se que uma vez instalado o tumor, a administração da farinha de yacon não tem mais efeito anticâncer, justificando assim a presença de diversas amostras do grupo NY com tumor.

Ao considerar que o grupo Y não teve indução neoplásica, mas um exemplar apresentou CCR, trata-se de um caso de carcinogênese espontânea. Tumores espontâneos de cólon em modelos experimentais não são raros de acontecer e é possível encontrar relatos sobre acometimento em camundongos idosos e ratos Wistar (Rosenberg *et al.*, 2009). Ressalta-se que o CCR espontâneo foi o único caso em que o tumor estava localizado em região de cólon proximal, mesmo resultado encontrado por

outros autores (Rosenberg *et al.*, 2009). Essa aparente predisposição por acometimento de cólon proximal reafirma a hipótese de que o animal desse experimento representa um caso de adenocarcinoma espontâneo em rato.

Ao considerar os dados obtidos sobre a produção de muco, houve redução da produção de mucina neutra nos ratos do grupo N e isto pode ser justificado pelo próprio estímulo carcinogênico que foi fornecido a esses animais, tendo em vista que CCR reduz a produção de muco (Byrd e Bresalier, 2004). Por outro lado, não houve redução na produção de mucina neutra nos animais NY, sendo semelhante ao grupo controle, e isto indica que a suplementação com yacon forneceu condições para as células de goblet voltarem a produzir mucina em quantidades semelhantes à do cólon normal. Esse aumento na produção de muco pelas amostras com indução neoplásica é atribuído ao butirato gerado pela fermentação do FOS presente na farinha de yacon, pois este AGCC é o mais efetivo na modulação da expressão de MUC. Foram propostos dois mecanismos para o butirato ser mais efetivo que os demais AGCC: primeiro, a própria molécula de butirato poderia atuar sobre a expressão gênica; segundo, o butirato é fonte de energia para os colonócitos enquanto os outros AGCC vão para a circulação porta, assim, sua capacidade para atuar sobre essas células é maior. Entre os dois, é mais aceito que o butirato consiga modular a expressão gênica, pois já foi demonstrado que existem elementos responsivos ao butirato em vários genes promotores (Gaudier *et al.*, 2004).

Nesse sentido, estudos demonstraram que o butirato é capaz de modular a expressão de genes MUC em células do epitélio intestinal e essa modulação varia de acordo com o gene estudado (Gaudier *et al.*, 2004). Sabe-se que os adenocarcinomas não mucinosos apresentam redução da expressão de MUC2 e essa redução contribui para a carcinogênese, pois há indícios de que ela pode estar relacionada com a metilação de promotores. Sabe-se que sequências promotoras de MUC2 presentes em linhagens celulares com alta expressão de MUC2 não estão metiladas, enquanto linhagens com baixa expressão estão completamente metiladas. Observa-se ainda que ocorre aumento da expressão de MUC2 se houver inibição da metilação (Byrd e Bresalier, 2004).

Assim, levanta-se a possibilidade da suplementação alimentar com yacon por pacientes com CCR ser uma alternativa para normalizar a produção de mucina neutra intestinal, que estaria diminuída nesses indivíduos em consequência da neoplasia. Deste

modo, espera-se melhorar a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que a redução na quantidade de muco em consequência do CCR pode trazer diversos malefícios, tais como dificuldade de passagem das fezes, predisposição de lesões da mucosa por aumentar tempo de contato com substâncias nocivas e aumentar difusão dessas substâncias (Shimotoyodome *et al.*, 2000) e diminuir aderência de bactérias benéficas (Jung *et al.*, 2015).

Não há na literatura atual, a conhecimento do autor, nenhum trabalho sobre a produção de mucina em ratos com CCR induzido suplementados com batata yacon, mas é possível encontrar pesquisas envolvendo tratamentos com AGCC proveniente de outras fontes. Finnie *et al.* (1995) observaram aumento da síntese de mucina em cultura de células tratadas com butirato, enquanto Hatayama *et al.* (2007) obtiveram resultados que demonstraram aumento do número de células de goblet positivas para PAS em cultura de células neoplásicas da linhagem LS174T tratadas com butirato, igualando à produção das células normais. O mecanismo exato envolvido no estímulo para expressão de MUC2 pelo butirato não está claro, mas acredita-se que há envolvimento da cascata ERK pois, ao inibir esta cascata, há também a inibição da produção de muco. Ainda, Fontaine *et al.* (1996), ao suplementar a dieta de ratos com inulina, observaram aumento na quantidade de mucinas neutras principalmente em nível de ceco e Jung *et al.* (2015) relataram que há aumento dose-dependente no número de células positivas para PAS quando tratadas com butirato.

A coloração de Alcian Blue não demonstrou alteração na produção de mucinas ácidas nos grupos estudados. De modo semelhante, Fontaine *et al.* (1996) observaram que, na avaliação de mucinas ácidas totais pela técnica de AB, não houve alteração na produção a nível de cólon em ratos heteroxênicos e *germ-free* tratados com inulina. Entretanto, quando analisada a produção de sulfomucina separadamente, houve aumento da produção intestinal. Ressalta-se que a coloração de AB escolhida para este experimento é capaz de corar em azul as regiões que apresentam mucina ácida, permitindo assim avaliar alterações gerais na produção de mucinas neutras e mucinas ácidas, independentemente do tipo de mucina ácida.

Filipe (1969) caracterizou o padrão de produção de mucina em tecido normal de cólon e relatou que há predomínio de sulfomucina no terço inferior das criptas e predomínio de sialomucina e mucina neutra no terço superior e na superfície do epitélio.

Ainda, o autor aponta que há aumento da quantidade de mucinas ácidas, principalmente sialomucinas, associado a doenças intestinais. Por outro lado, há redução na produção de sulfomucina em CCR e, nestes casos, essa redução funciona como um indicador de progressão maligna, apesar de ainda não ter sido esclarecido qual o mecanismo envolvido na relação entre redução de sulfomucina e pior prognóstico (Byrd e Bresalier, 2004). Assim, apesar de no presente trabalho não ter sido encontrada diferença entre os grupos estudados, supõe-se que o consumo de frutanos, ao aumentar a produção de sulfomucina, consegue contrabalancear a diminuição que é causada pelo CCR e reduzir o efeito nocivo do aumento de sialomucinas induzido por doenças. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar esse efeito.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a suplementação alimentar com farinha de yacon possui potencial benéfico por ser capaz de aumentar a produção de mucina neutra em modelo experimental com ratos, sem alterar a produção de mucina ácida, podendo ser utilizada como terapia auxiliar para normalizar a produção de muco em pacientes com câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.P.S.; AVI, C.M.; BARBISAN, L.F. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce de early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. *Food Res. Int.*, v.74, p.48-54, 2015.
- ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of the AOAC International. EUA: AOAC, 1997.
- BYRD, J.C.; BRESALIER, R.S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, v.23, p.77-99, 2004.
- CAETANO, B.F.R.; MOURA, N.A.; ALMEIDA, A.P.S. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: health-promoting benefits of fructooligosaccharides. *Nutrients*, v.8, pii. E436, 2016.
- CAMPOS, A.H.; ALDRED, V.L.; RIBEIRO, K.C. *et al.* Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation

and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. *Mol. Cell. Biochem.*, v.321, p.95-102, 2009.

CHEN, H.; YU, Y.; WANG, J. *et al.* Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.97, p.1044-1052, 2013.

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

DELGADO, G.T.C.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; PASTORE, G.M. Immunomodulatory effects of fructans. *Food Res. Int.*, v.43, p.1231-1236, 2010.

DONOHUE, D.R.; HOLLEY, D.; COLLINS, L.B. *et al.* A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner. *Cancer Discov.*, v.4, p.1387-1397, 2014.

FILIPPE, M.I. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*, v.10, p.577-586, 1969.

FINNIE, I.A.; DWARAKANATH, A.D.; TAYLOR, B.A.; RHODES, J.M. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*, v.36, p.93-99, 1995.

FONTAINE, N.; MESLIN, J.C.; LORY, S.; ANDRIEUX, C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. *Br. J. Nutr.*, v.75, p.881-892, 1996.

GAUDIER, E.; JARRY, A.; BLOTTIÈRE, H.M. *et al.* Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, v.287, p.G1168-G1174, 2004.

HATAYAMA, H.; IWASHITA, J.; KUWAJIMA, A.; ABE, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.356, p.599-603, 2007.

JANARDHANA, V.; BROADWAY, M.M.; BRUCE, M.P. *et al.* Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens. *J. Nutr.*, v.139, p.1404-1409, 2009.

JUNG, T.; PARK, J.H.; JEON, W.; HAN, K. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr. Res. Pract.*, v.9, p. 343-349, 2015.

- 400 LARANGEIRA, L.L.S.; TAHA, M.O.; FERME, A. *et al.* Localização de lesões
 401 tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. *Acta*
 402 *Cir. Bras.*, v.13, 1998.
- 403 LOBO, A.R.; COCATO, M.L.; BORELLI, P. *et al.* Iron bioavailability from ferric
 404 pyrophosphate in rats fed with fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*)
 405 flour. *Food Chem.*, v.126, p.885-891, 2011.
- 406 LOPES, A.; CARNEIRO, A. Cirurgia citorrredutora associada a quimioterapia
 407 intraperitoneal hipertérmica (QtIPH) no tratamento de carcinomatose peritoneal.
 408 *Onco&*, p.26-35, 2011.
- 409 OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S. In vitro adhesion assays for probiotics and their
 410 in vivo relevance: a review. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v.15, p.175-184, 2003.
- 411 PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1,2
 412 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed.*
 413 *Biotechnol.*, v.2011, Article ID 473964, 2011.
- 414 PIHL, E.; NAIRN, R.C.; MILNE, B.J. *et al.* A major prognostic feature in 519 cases of
 415 colorectal carcinoma. *Am. J. Pathol.*, v.100, p.469-477, 1980.
- 416 REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory
 417 rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on
 418 the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, v.123, p.1939-1951, 1993.
- 419 ROSENBERG, D.W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of
 420 colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.30, p.183-196, 2009.
- 421 SHIMOTOYODOME, A.; MEGURO, S.; HASE, T. *et al.* Short chain fatty acids but
 422 not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp. Biochem.*
 423 *Physiol. A*, v.125, p.525-531, 2000.
- 424 SOINI, Y.; KAHLOS, K.; PUHAKKA, A. *et al.* Expression of inducible nitric oxide
 425 synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Br. J. Cancer*, v.3, p.880-
 426 886, 2000.
- 427 THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. (Ed).
 428 Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Brasil: Guanabara Koogan, 2015. 678p.
- 429 TSUBURA, A.; SENZAKI, H.; OYAIZU, T. *et al.* Tumor induction in the Japan house
 430 musk shrew, *Suncus murinus* (Insectivora), by 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *J.*
 431 *Toxicol. Pathol.*, v.6, p.181-186, 1993.

- 432 WERNER, P.R. (Ed). Patologia geral veterinária aplicada. Brasil: Roca, 2015. 371p.
- 433 WESTBROOK, A.M.; SZAKMARY, A.; SCHIESTL, R.H. Mechanisms of intestinal
434 inflammation and development of associated cancers: Lessons learned from mouse
435 models. *Mutat. Res.*, v.705, p.40-59, 2010.
- 436 WINNEKER, R.C.; TOMPKINS, M.; WESTENBERGER, P.; HARRIS, J.
437 Morphological studies of chemically induced colon tumors in hamsters. *Exp. Mol.*
438 *Pathol.*, v.27, p.19-34, 1977.

CAPÍTULO 2

Suplementação com farinha de yacon reduz a expressão de fator induzido por hipóxia-1 alfa sem alterar expressão de fator de crescimento vascular endotelial A em modelo experimental de câncer colorretal induzido em ratos

Natalia V Tamiasso¹, Mariana Grancieri², Leonardo O Trivilin³, Maria das Graças Vaz-Tostes⁴, Mirelle L Viana⁵, Louisiane C Nunes^{6*}

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: natalia_tamiasso@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: marianagrancieri@gmail.com

³Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Medicina Veterinária, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: leotrivilin@gmail.com

⁴Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: mgvtostes@hotmail.com

⁵Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: mirellemar@gmail.com

⁶Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Medicina Veterinária, Alto Universitário, s/n, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: louisianecn@gmail.com*Corresponding author

27	Lista de abreviações
28	
29	HIF; fator induzido por hipóxia
30	VEGF; fator de crescimento vascular endotelial
31	CCR; câncer colorretal
32	mRNA; ácido ribonucleico mensageiro
33	FOS; frutooligossacarídeo
34	PCNA; antígeno nuclear de proliferação celular
35	UFES; Universidade Federal do Espírito Santo
36	DMH; 1,2-dimetilhidrazina
37	FY; farinha de yacon
38	AOAC; <i>Association of Analytical Chemists</i>
39	AGCC; ácidos graxos de cadeia curta
40	DNA; ácido desoxirribonucleico
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	

Resumo: O fator induzido por hipóxia (HIF) é responsável pela ativação de mecanismos de adaptação à hipóxia tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, tal como indução da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que estimula angiogênese. Tratamentos com substâncias antiangiogênicas, como o butirato, têm sido utilizados na tentativa de impedir desenvolvimento e adaptação tumorais. Assim, suplementação dietética com alimentos que induzem produção de butirato pelos micro-organismos intestinais, como a batata yacon, pode vir a trazer benefícios para a saúde em indivíduos com câncer colorretal. Objetivou-se com esse estudo identificar a expressão de HIF-1 α e VEGF-A em modelo experimental de câncer colorretal suplementado com batata yacon. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo C (sem indução de neoplasia colorretal e sem tratamento com farinha de yacon [FY]); grupo N (com indução de CCR e sem tratamento com FY); grupo Y (sem indução de CCR e com tratamento com FY); e grupo NY (com indução de CCR e com tratamento com FY). As amostras de intestino foram submetidas a protocolos imunoistoquímicos com anticorpos monoclonais anti-HIF-1-alpha e anti-VEGF-A. Os animais do grupo NY apresentaram expressão de HIF-1 α significativamente inferior aos demais grupos. O grupo N apresentou expressão de VEGF-A significativamente inferior aos grupos C e Y, enquanto o grupo Y teve expressão significativamente superior ao grupo NY. O consumo de yacon reduziu a expressão de HIF-1 α e não interferiu na expressão de VEGF-A em mucosa colorretal submetida à carcinogênese induzida.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia curta, biomarcadores, butirato, neoplasia

1. INTRODUÇÃO

Diversos fatores prognósticos podem ser investigados na tentativa de prever a evolução clínica de pacientes com câncer, tais como os biomarcadores tumorais [1], tais como o fator induzido por hipóxia (HIF) [2] e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [3].

HIF é responsável pela transcrição de muitos genes relacionados às respostas celulares e sistêmicas em situações de baixa oxigenação, sendo assim fundamental para ativação de mecanismos adaptativos à hipóxia [4]. Acredita-se que a subunidade HIF-1 α seja a principal envolvida na adaptação devido a sua capacidade de identificar o nível de oxigênio nos tecidos [5]. Apesar de HIF-1 α ser essencial em condições fisiológicas, seus mecanismos de adaptação à hipóxia também podem ser utilizados durante o curso de doenças, tal como em neoplasias [6]. Nesses casos, a baixa oxigenação estimula aumento de HIF-1 α no microambiente tumoral, induzindo aumento de expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que, por sua vez, estimula neovascularização da neoplasia a partir de vasos pré-existentes, permitindo a sobrevivência das células neoplásicas [3]. O aumento de expressão de VEGF em câncer colorretal (CCR) está relacionado com maiores chances de ocorrência de metástase por via hematológica e representa um pior prognóstico para o paciente [7].

Tratamentos com substâncias antiangiogênicas, como por exemplo, o butirato [8] têm sido utilizados na tentativa de impedir desenvolvimento e adaptação tumorais [6]. O butirato é um ácido graxo de cadeia curta, produto da fermentação de carboidratos não digeríveis

101 pelas bactérias do intestino grosso [9] e há relato que sua utilização reduz mRNA de VEGF
102 [8].

103
104 Entre as plantas que apresentam grande quantidade de carboidratos não digeríveis em
105 sua composição, principalmente frutooligossacarídeo (FOS), encontra-se a batata yacon
106 (*Smallanthus sonchifolius*) [10]. A raiz de yacon apresenta a maior concentração de FOS da
107 natureza e por este motivo diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de comprovar o
108 potencial benéfico de seu consumo [11].

109
110 Em modelos experimentais de câncer colorretal suplementados com yacon, até o
111 presente momento foram avaliadas as expressões de Ki-67 para proliferação celular, p53 para
112 apoptose [12], PCNA para proliferação celular, caspase-3 para apoptose e β -catenina para
113 progressão tumoral [13]. Porém, a conhecimento dos autores, não existe estudo em que se
114 avalia o efeito do consumo de yacon sobre as expressões de HIF-1 α e VEGF. Assim,
115 objetivou-se com esse estudo identificar a expressão de HIF-1 α e VEGF-A em modelo
116 experimental de câncer colorretal suplementado com batata yacon.

117 118 2. MATERIAL E MÉTODOS

119
120 Os animais utilizados neste estudo foram mantidos de acordo com a Lei Brasileira de
121 Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008), e os procedimentos
122 experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da
123 Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 004/2014.

Foram utilizados 43 ratos Wistar machos adultos, com peso inicial de 207 ± 5 g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e mantidos em gaiolas individuais no Laboratório de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana da UFES, sob temperatura constante de 22° C e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

A indução à carcinogênese colorretal com o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) foi conduzida em 23 animais e ocorreu conforme metodologia modificada por Larangeira et al. [14] baseada no estudo de Naus et al. [15]. Neste, o DMH foi dissolvido em NaCl 0,9% contendo como veículo 1,5% de EDTA, em pH final de 6,5 que foi atingido com o uso de solução de NaOH 1N quando necessário. A aplicação do agente químico ocorreu por via intraperitoneal, uma vez por semana, por um período de cinco semanas consecutivas, na dose de 25mg/kg/semana.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo C (sem indução de neoplasia colorretal e sem suplementação com farinha de yacon [FY]); grupo N (com indução de CCR e sem suplementação com FY); grupo Y (sem indução de CCR e com suplementação com FY); e grupo NY (com indução de CCR e com suplementação com FY). Todos os animais receberam ração comercial (ração para roedores, InVivo, Brasil), durante as 13 semanas iniciais e água *ad libitum* durante todo o experimento, independente da indução neoplásica. Nas oito semanas seguintes, os animais dos grupos C e N receberam dieta AIN-93M e os grupos Y e NY passaram a receber farinha de yacon adicionada à dieta AIN-93M, em quantidade suficiente para fornecer 7,5% de FOS [16].

O processamento da farinha de yacon foi realizado no Laboratório de Técnica Dietética e no Laboratório de Operações Unitárias da UFES e a análise do teor de FOS e açúcares simples da farinha de yacon foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu, São Paulo. As análises de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras e cinzas da farinha de yacon foram feitas de acordo com o método AOAC [17] (Tabela. 1).

Tabela 1 - Composição da farinha de yacon.

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

As dietas experimentais (Tabela. 2) foram elaboradas manualmente no Laboratório de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana da UFES, e os ingredientes foram adicionados em quantidades determinadas segundo recomendações do *American Institute of Nutrition for Rodents* [18], seguindo o protocolo AIN-93M recomendado para dieta de manutenção de animais adultos.

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

Ingredientes (g/100g)	C e N	Y e NY
	AIN-93M	AIN-93M + FY
Caseína	14,0	13,14
Amido dextrinizado	15,5	15,5
Sacarose	10,0	7,24
Óleo de soja	4,0	4,0
Fibra	5,0	0
Mix minerais*	3,5	3,5
Mix vitamínico*	1,0	1,0
L-cistina	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido de milho	46,57	40,81
Farinha de yacon	0	14,37
Energia total (kcal)	380,28	356,37

166 C = grupo sem indução de neoplasia de cólon e sem suplementação com FY; N = grupo com
167 indução de neoplasia de cólon e sem suplementação com FY; Y = grupo sem indução de
168 neoplasia de cólon e com suplementação com FY; NY = grupo com indução de neoplasia de
169 cólon e com suplementação com FY. FY= Farinha de yacon. * AIN-93M [18].

170

171 Toda farinha utilizada pertencia ao mesmo lote de raízes yacon. Em todos os grupos
172 foi realizado ajuste à dieta padrão AIN-93M a fim de obter a mesma concentração de
173 calorias, carboidratos, açúcares, proteínas e fibras em todas as dietas, sendo o FOS o único
174 componente extra presente nas dietas dos grupos Y e NY.

175

176 Após as oito semanas de suplementação com yacon os animais foram eutanasiados e
177 necropsiados para coleta de intestino grosso. Foi realizada lavagem do segmento com injeção

de solução fisiológica, abertura longitudinal na porção mesentérica, acondicionamento em placa de isopor e fixação em solução de formol a 10%.

Os segmentos fixados foram enrolados em formato semelhante ao de rocambole. Posteriormente, realizou-se clivagem e acondicionamento do tecido em cassete histológico para processamento de rotina para inclusão em parafina. Foram utilizados cortes de três micrômetros de espessura. Para a avaliação imunoistoquímica, os cortes foram acondicionados em lâminas previamente tratadas com polilisina (Sigma-Aldrich, poly-l-lysine solution, USA) e foram utilizados os anticorpos primários, anticorpo monoclonal anti-HIF-1-alpha (Abcam Plc®, clone ESEE122) na concentração de 1:2000 e anticorpo monoclonal anti-VEGF-A (Abcam Plc®, clone VG-1) na concentração de 1:800. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica por dois observadores patologistas e os escores das amostras foram determinados por análise semiquantitativa, considerando-se o número de células coradas e a intensidade de expressão. Considerando a percentagem de células imunopositivas, foi atribuída uma pontuação de 0, quando todas as células foram negativas; uma pontuação de 1 quando 1-25% das células foram positivas, 2 quando 25-50% das células foram positivas e 3 quando >50% das células foram positivas. A intensidade de expressão foi classificada como fraca (1), moderada (2) e forte (3). Ambas as pontuações foram multiplicadas [19, 20] e o escore resultante foi utilizado.

Para as análises estatísticas os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e, os casos que não apresentaram distribuição normal, foram transformados em Log(x). Realizou-se então análise de variância e nos casos em que os valores foram significativos, foi feita análise *pos hoc* pelo teste t de Student para comparação dos grupos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do software BioEstat® 5.3.

3. RESULTADOS

Ao avaliar o biomarcador HIF-1 α , observou-se que os animais do grupo NY apresentaram expressão significativamente inferior aos animais do grupo N ($p < 0,001$), e não houve diferença entre os grupos C e Y ($p > 0,001$) (Figuras 1 e 2).

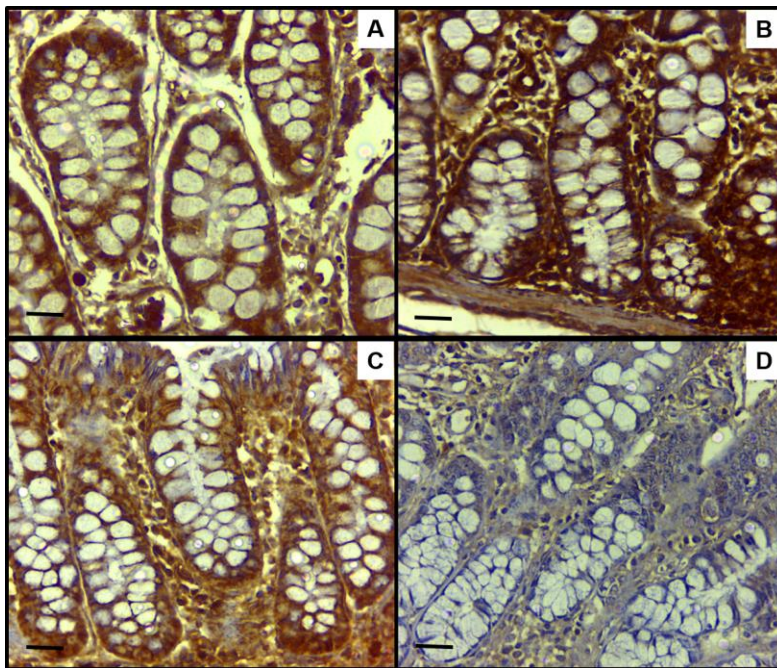


Figura 1. Cólon de rato evidenciando diferentes intensidades de imunomarcção positiva, técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-HIF-1 α , concentração 1:2000. A) Amostra do grupo C. B) Amostra do grupo Y. C) Amostra do grupo N. D) Amostra do grupo NY. Contracoloração hematoxilina, barra=40,46 μ m.

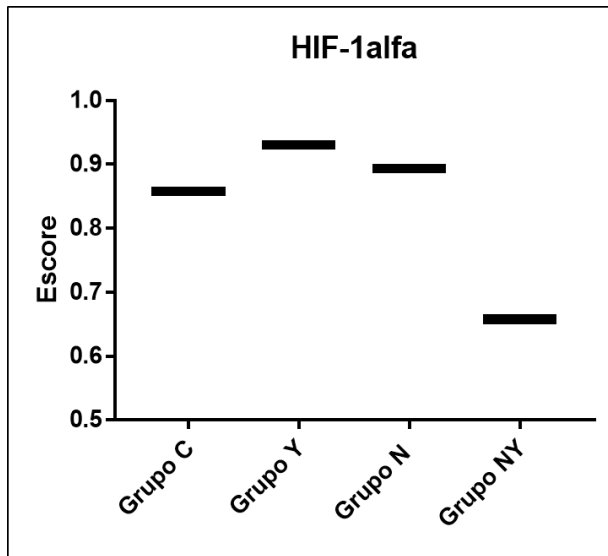


Figura 2. Gráfico representando o escore médio obtido em cada grupo avaliado para a expressão de HIF-1alfa, evidenciando redução na expressão desse biomarcador no grupo NY.

Na avaliação da expressão de VEGF-A, o grupo N apresentou escore significativamente inferior aos grupos C e Y, enquanto o grupo Y teve expressão significativamente superior ao grupo NY. Por outro lado, os grupos N e NY apresentaram expressões semelhantes (Figuras 3 e 4).

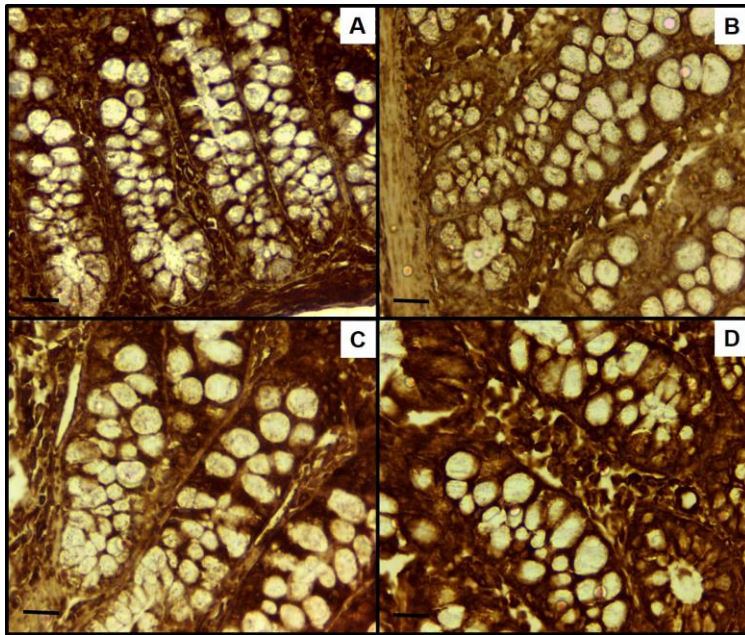


Figura 3. Cólon de rato evidenciando diferentes intensidades de imunomarcção positiva, técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-VEGF-A, concentração 1:800. A) Amostra do grupo C. B) Amostra do grupo N. C) Amostra do grupo NY. D) Amostra do grupo Y. Contracoloração hematoxilina, barra=41,66µm.

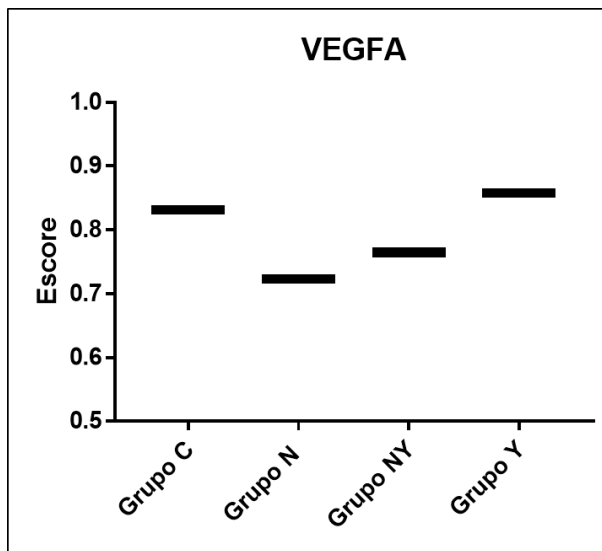


Figura 4. Gráfico representando o escore médio obtido em cada grupo avaliado para a expressão de VEGF-A, evidenciando redução na expressão desse biomarcador no grupo N.

4. DISCUSSÃO

As células epiteliais do intestino estão em constante condição de “hipóxia fisiológica” e esse mecanismo permite que esse órgão consiga manter suas funções mesmo com uma quantidade muito pequena de oxigênio. Acredita-se que um dos mecanismos evolutivos desenvolvidos para superar tal condição de hipóxia constante é uma regulação basal de HIF intestinal [21]. Ao considerar que os animais do grupo Y deste estudo não apresentavam nenhuma doença, o fato do consumo de yacon não alterar os níveis de HIF-1 α é um resultado favorável, pois observa-se que quando há perda da expressão de HIF-1 α há maior suscetibilidade a doenças inflamatórias, menor integridade da barreira [22] e anulação de genes relacionados a defensinas [21]. Assim, observa-se que a suplementação com farinha de yacon não altera os parâmetros fisiológicos da expressão de HIF-1 α em indivíduos sem estímulo carcinogênico.

Sabe-se que a expressão de HIF-1 α é alta em lesões pré-neoplásicas, em CCR e em metástases de CCR [23] e isso está relacionado a um pior prognóstico [7]. No presente trabalho foi possível confirmar essa alta expressão de HIF-1 α em indivíduos submetidos à indução de neoplasia colorretal sem suplementação com yacon. Entretanto, apesar de ser reconhecido que há aumento de expressão de HIF-1 α em tumores, o mais provável é que, nesse caso, a alta expressão seja decorrente da própria fisiologia intestinal [21], uma vez que a mucosa foi avaliada em toda sua extensão e não apenas no microambiente tumoral. Essa metodologia foi escolhida pois, por se tratar de modelo experimental com CCR induzido, o estímulo neoplásico atuou sobre toda a extensão da mucosa, com formação de lesões pré-neoplásicas em diversos pontos diferentes do tecido, e assim foi possível avaliar a expressão

da proteína em células que estão sobre estímulo inicial de carcinogênese e não apenas nas células já com neoplasia estabelecida.

No presente trabalho foi observada redução da proteína HIF-1 α nos animais com CCR que foram suplementados com yacon. Sabe-se que yacon é fonte de FOS [11] e, ao atingir o intestino grosso, FOS é metabolizado pela microbiota gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com destaque para acetato, propionato e butirato [9]. Miki et al. [24] demonstraram que tratamento de células neoplásicas de epitélio intestinal com butirato suprime a atividade de HIF-1 α tanto em condição de normóxia quanto hipóxia por inibir atividade de ligação da porção responsiva à hipóxia presente na sequência de DNA. De modo semelhante, Zgouras et al. [23] observaram redução de proteína HIF-1 α em células de linhagem de CCR quando administrado butirato em baixa concentração, porém, se aumentar a concentração, a expressão de HIF-1 α também aumenta. Vale ressaltar que os estudos citados são experimentos *in vitro*, em contraste com o estudo *in vivo* utilizado no presente trabalho. Desta forma, as diferenças encontradas poderiam estar relacionadas ao delineamento, uma vez que estudos *in vivo* são influenciados por fatores relacionados ao ambiente, ao metabolismo e à fisiologia dos indivíduos avaliados [25].

Apesar de alguns estudos indicarem redução de HIF-1 α induzida por butirato, ainda não há consenso. Kelly et al. [21] encontraram relação entre microbiota intestinal e produção de HIF-1 α . O butirato proveniente da fermentação bacteriana afeta o consumo de oxigênio pelas células epiteliais do intestino e isso gera uma estabilização da expressão de HIF. Se houver redução da microbiota com consequente diminuição da produção de butirato, observa-se menor expressão de HIF [26]. Também já foi demonstrado que tratamento de células

neoplásicas com butirato aumenta HIF-1 α citoplasmática, mas reduz HIF-1 α no núcleo por inibir translocação nuclear e, assim, exerce efeito de regulação negativa [23].

Observou-se que yacon reduziu proteína HIF-1 α em indivíduos com CCR e essa redução possivelmente confere aos animais um melhor prognóstico, pois aumento de HIF-1 α está associado ao favorecimento da progressão tumoral por estimular angiogênese [3]. Contudo, é necessário ter cautela quanto à utilização clínica desses dados, pois redução de HIF-1 α pode vir a trazer outros problemas como diminuição da capacidade de proteção da barreira epitelial [22].

Sabe-se que para ocorrer progressão de um tumor pouco vascularizado para um tumor altamente vascularizado é necessário que haja desequilíbrio no balanço entre fatores pró e antiangiogênicos, com os fatores pró-angiogênicos sobressaindo-se [6]. VEGF é considerado o principal fator pró-angiogênico tanto em situações fisiológicas quanto patológicas [27] e, ao considerar o CCR, aumento de expressão de VEGF também aumenta as chances de ocorrência de metástase por via hematogêna e representa um pior prognóstico para o paciente [7].

Assim, o tratamento com substâncias antiangiogênicas tem sido utilizado na tentativa de impedir desenvolvimento e adaptações tumorais [6]. Ao considerar o uso de butirato como inibidor da angiogênese, estudos apontam para redução da neovascularização por diminuição de mRNA de VEGF [8] e aumento de transcrição e de proteínas da família VEGF com atividade antiangiogênica [28], ambos em tecidos ou células não neoplásicas. No entanto, no presente estudo, yacon não interferiu na expressão de VEGF e a justificativa para isto pode estar em outros fatores, como por exemplo, falhas em etapas intermediárias da produção do

308 butirato. Sabe-se que a microbiota intestinal saudável é fundamental para a fermentação
309 bacteriana e qualquer desequilíbrio desta microbiota pode causar redução na disponibilidade
310 de butirato [29].

311
312 Por outro lado, diversos trabalhos citam que o consumo de FOS aumenta o número de
313 bactérias benéficas e por este motivo essa substância é considerada um prebiótico. Assim,
314 considera-se a batata yacon como uma fonte de AGCC devido à grande quantidade de FOS
315 presente em sua composição [11], mas ainda são poucos os trabalhos que demonstram
316 exatamente quais os AGCC que são produzidos em resposta ao consumo de yacon. Utami et
317 al. [30] avaliaram conteúdo fecal de ceco em ratos suplementados com 10% de yacon
318 (quantidade suficiente para fornecer 5% de FOS) e em ratos suplementados com 5% de FOS
319 comercial, revelando diferenças na composição da microbiota e na produção de AGCC. O
320 consumo de yacon induz mudanças contínuas na microbiota, de modo mais intenso do que
321 FOS comercial, com maior proliferação de bactérias com alto conteúdo GC, principalmente
322 *Bifidobacteria*. Além disso, observa-se que o principal AGCC produzido após consumo de
323 yacon é o acetato, seguido pelo propionato e por último o butirato. Entretanto, Den Besten et
324 al. [29] destacam que a concentração fecal de AGCC não reflete com fidelidade a produção,
325 pois grande parte do que é produzido é utilizado pelo próprio indivíduo. Assim, ainda faltam
326 dados sobre a produção de butirato induzida pelo consumo de yacon e sobre a disponibilidade
327 desse AGCC para exercer efeitos sobre a expressão de VEGF.

328
329 Os resultados encontrados no presente trabalho revelaram uma redução na expressão
330 de VEGF-A nos grupos que tiveram indução neoplásica. Estes dados estão em contraste com
331 a maior parte dos trabalhos sobre expressão de VEGF em CCR [7], provavelmente devido ao
332 fato de ter sido avaliada toda a extensão da mucosa colorretal e não somente as lesões

tumorais. Além disso, a expressão de receptores para VEGF, tal como VEGFR-1, varia entre as linhagens de células tumorais e isso influencia na resposta à terapia antiangiogênica [31], porém, a caracterização molecular dos receptores presentes nas células não foi objeto de estudo no presente trabalho, então é possível que as lesões presentes nos indivíduos deste estudo tenham padrão de baixa expressão de VEGF. Ainda, o consumo de yacon não alterou a expressão de VEGF-A, porém, vale ressaltar que nem todo tumor é responsivo ao tratamento e nem todo indivíduo pode ser submetido a esse tipo de protocolo terapêutico, sendo necessário estabelecer protocolos personalizados [31]. Diante disto, não é possível excluir a possibilidade de que yacon possa alterar expressão desse biomarcador em outros tipos tumorais e em outros indivíduos.

A farinha de yacon, ao estimular a redução de HIF-1 α em ratos com CCR induzido sem alterar expressão de VEGF-A, aparenta ser um alimento com potencial de melhorar a evolução clínica da doença, uma vez que a alta expressão desses biomarcadores representa pior prognóstico para o paciente. Acredita-se que esses sejam os primeiros resultados a respeito da ação da batata yacon sobre a expressão de HIF-1 α e VEGF em mucosa intestinal de ratos com carcinogênese induzida. Desta forma, os dados inéditos obtidos aqui abrem precedente para maiores estudos e aplicações da yacon, de modo a esclarecer qual a importância clínica dos resultados observados, quais os mecanismos envolvidos e qual a eficácia a longo prazo.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Marcadores tumorais: revisão de literatura. Rev Bras Cancerol 2007;53:305-316.

358 [2] Brito LGO, Schiavon VF, Marana HRC. Hipóxia e câncer de mama: uma possibilidade
359 futura como terapia-alvo. Rev Bras Mastologia 2011;21:38-41.

360 [3] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. Curr Opin
361 Genet Dev 1998;8:588-594.

362 [4] Berra E, Ginouvès A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring
363 fresh air into hypoxia signalling. EMBO Rep 2006;7:41-45.

364 [5] Wang P, Qi H, Sun C, He W, Chen G, Li L, Wang F. Overexpression of hypoxia-
365 inducible factor-1 α exacerbates endothelial barrier dysfunction induced by hypoxia. Cell
366 Physiol Biochem 2013;32:859-870.

367 [6] Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. Semin Cancer Biol
368 2009;19:329-337.

369 [7] Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM. Vascular endothelial growth factor in human
370 colon cancer: biology and therapeutical implications. Oncologist 2000;5:11-15.

371 [8] Gururaj AE, Belakavadi M, Salimath BP. Antiangiogenic effects of butyric acid involve
372 inhibition of VEGF/KDR gene expression and endothelial cell proliferation. Mol Cell
373 Biochem 2003;243:107-112.

374 [9] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host
375 physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell 2016;165:1332-1342.

376 [10] Delgado GTC, Tamashiro WM, Maróstica Junior MR, Pastore GM. Yacon (*Smallanthus*
377 *sonchifolius*): a functional food. Plant Foods Hum Nutr 2013;68:222-228.

378 [11] Caetano BFR, Moura NA, Almeida AP, Dias MC, Sivieri K, Barbisan LF. Yacon
379 (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: health-promoting benefits of
380 fructooligosaccharides. Nutrients 2016;8:E436.

381 [12] Almeida APS, Avi CM, Barbisan LF, Moura NA, Caetano BFR, Romualdo GR, Sivieri
382 K. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce de
383 early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. *Food Res Int* 2015;74:48-54.

384 [13] Moura NA, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MA, Barbisan
385 LF. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon
386 carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 2012;50:2902-2910.

387 [14] Larangeira LLS, Taha MO, Ferme A, Lemos R, Plapler H. Localização de lesões
388 tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. *Acta Cir*
389 *Bras* 1998;13.

390 [15] Nauss KM, Locniskar M, Pavlina T, Newberne PM. Morphology and distribution of 1,
391 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-
392 associated lymphoid tissue in the rat. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:915-924.

393 [16] Lobo AR, Cocato ML, Borelli P, Gaievski EHS, Crisma AR, Nakajima K, Nakano EY,
394 Colli C. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan-containing
395 yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. *Food Chem* 2011;126:885-891.

396 [17] Horwitz W. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 17th ed.
397 Washington: AOAC; 1997.

398 [18] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final
399 report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation
400 of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.

401 [19] Soini Y, Kahlos K, Puhakka A, Lakari E, Säily M, Pääkkö P, Kinnula V. Expression of
402 inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*
403 2000;3:880-886.

404 [20] Campos AH, Aldred VL, Ribeiro KC, Vassallo J, Soares FA. Role of immunoexpression
 405 of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and
 406 on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. *Mol Cell Biochem* 2009;321:95-102.

407 [21] Kelly CJ, Glover LE, Campbell EL, Kominsky DJ, Ehrentraut SF, Bowers BE, Bayless
 408 AJ, Saeedi BJ, Colgan SP. Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human
 409 β defensin-1. *Mucosal Immunol* 2013;6:1110-1118.

410 [22] Shah YM. The role of hypoxia in intestinal inflammation. *Mol Cell Pediatr* 2016;3.

411 [23] Zgouras D, Wächtershäuser A, Frings D, Stein J. Butyrate impairs intestinal tumor cell-
 412 induced angiogenesis by inhibiting HIF-1 α nuclear translocation. *Biochem Biophys Res*
 413 *Commun* 2003;300:832-838.

414 [24] Miki K, Unno N, Nagata T, Uchijima M, Konno H, Koide Y, Nakamura S. Butyrate
 415 suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic
 416 conditions. *Shock* 2004;22:446-452.

417 [25] César ACG, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na
 418 carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002;39:253-259.

419 [26] Pellizzaro C, Coradini D, Daidone MG. Modulation of angiogenesis-related proteins
 420 synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis* 2002;23:735-40.

421 [27] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy.
 422 *Oncologist* 2004;9:2-10.

423 [28] Ciura J, Jagodzinski PP. Butyrate increases the formation of anti-angiogenic vascular
 424 endothelial growth factor variants in human lung microvascular endothelial cells. *Mol Biol*
 425 *Rep* 2010;37:3729-3734.

426 [29] Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The
 427 role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy
 428 metabolism. *J Lipid Res* 2013;54:2325-2340.

- 429 [30] Utami NWA, Sone T, Tanaka M, Nakatsu CH, Saito A, Asano K. Comparison of yacon
430 (*Smallanthus sonchifolius*) tuber with commercialized fructo-oligosaccharides (FOS) in terms
431 of physiology, fermentation products and intestinal microbial communities in rats. *Biosci*
432 *Microbiota Food Health* 2013;32:167-178.
- 433 [31] Saif MW. Anti-VEGF agents in metastatic colorectal cancer (mCRC): are they all alike?
434 *Cancer Manag Res* 2013;5:103-115.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que a suplementação alimentar com farinha de yacon possui potencial benéfico por ser capaz de aumentar a produção de mucina neutra em modelo experimental com ratos, sem alterar a produção de mucina ácida, podendo ser utilizada como terapia auxiliar para normalizar a produção de muco em pacientes com câncer colorretal.

Ainda, observa-se que a farinha de yacon, ao estimular a redução de HIF-1 α em ratos com CCR induzido sem alterar expressão de VEGF-A, aparenta ser um alimento com potencial de melhorar a evolução clínica da doença, uma vez que a alta expressão desses biomarcadores representa pior prognóstico para o paciente. Acredita-se que esses sejam os primeiros resultados a respeito da ação da batata yacon sobre a expressão de HIF-1 α e VEGF-A em mucosa intestinal de ratos com carcinogênese induzida. Desta forma, os dados inéditos obtidos aqui abrem precedente para maiores estudos e aplicações da yacon, de modo a esclarecer qual a importância clínica dos resultados observados, quais os mecanismos envolvidos e qual a eficácia a longo prazo.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.1, p.113-131, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos funcionais. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=alimentos-funcionais&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=2866855&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>. Acesso em: 22 dez. 2016a.
- ALLEN, A.; HUTTON, D.A.; PEARSON, J.P. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.30, n.7, p.797-801, 1998.
- ALMEIDA, A.P.S. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce de early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. **Food Research International**, v.74, p.48-54, 2015.
- ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B. et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.305-316, 2007.
- ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/probioticos/219201/pop_up?101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>. Acesso em: 29 dez. 2016b.
- ARMAGHANY, T.; WILSON, J.D.; CHU, Q. et al. Genetic alterations in colorectal cancer. **Gastrointestinal Cancer Research**, v.5, n.1, p.19-27, 2012.
- BAERYSWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v.19, p.329-337, 2009.
- BAGNALL, J. et al. Tight control of hypoxia-inducible factor- α transient dynamics is essential for cell survival in hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.9, p.5549-5564, 2014.
- BARCELO, A.; CLAUSTRE, J.; MORO, F. et al. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. **Gut**, v.46, p.218-224, 2000.

BATTINELLI, E.M.; MARKENS, B.A.; KULENTHIRARAJAN, R.A. et al. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. **Blood**, v.123, n.1, p.101-112, 2014.

BENEDIX, F. et al. Colon carcinoma – Classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite? Analysis of 29568 patients. **European Journal of Surgical Oncology**, v.37, n.2, p.134-139, 2011.

BERRA, E.; GINOUVÈS, A.; POUYSSÉGUR, J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. **European Molecular Biology Organization Reports**, v.7, n.1, p.41-45, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 463p.

BRITO, L.G.O.; SCHIAVON, V.F.; MARANA, H.R.C. Hipóxia e câncer de mama: uma possibilidade futura como terapia-alvo. **Revista Brasileira de Mastologia**, v.21, n.1, p.38-41, 2011.

BYRD, J.C.; BRESALIER, R.S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v.23, p.77-99, 2004.

CAETANO, B.F.R. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, v.8, n.7, pii. E436, 2016.

CHEN, H.; YU, Y.; WANG, J. et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.97, p.1044-1052, 2013.

CIURA, J.; JAGODZINSKI, P.P. Butyrate increases the formation of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor variants in human lung microvascular endothelial cells. **Molecular Biology Reports**, v.37, p.3729-3734, 2010.

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

DELGADO, G.T.C. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.68, p.222-228, 2013.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A.K. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.54, p.2325-2340, 2013.

DONOHUE, D.R.; HOLLEY, D.; COLLINS, L.B. et al. A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a

microbiota- and butyrate-dependent manner. **Cancer Discovery.**, v.4, n.12, p.1387-1397, 2014.

ELLIS, L.M. et al. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. **The Oncologist**, v.5, p.11-15, 2000.

FARIA JUNIOR, P.C. et al. A interação das sialomucinas (antígenos TN e STN) com o adenocarcinoma no esôfago de Barrett. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.53, n.4, p.360-364, 2007.

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

FEMIA, A.P. et al. Sustained proliferation and resistance to apoptosis after a cytotoxic insult are early alterations in rat colon carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v.131, p.529-536, 2012.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. **The Oncologist**, v.9, p.2-10, 2004.

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S.F. et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v.3, n.2, p.153-173, 2012.

FLOROWSKA, A.; KRYGIER, K.; FLOROWSKI, T. et al. Prebiotics as functional food ingredients preventing diet-related diseases. **Food and Function**, v.7, n.5, p.2117-2480, 2016.

FORRESTER, K.; ALMOGUERA, C.; HAN, K. et al. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. **Nature**, v.327, p.298-303, 1987.

FRANCO-ROBLES, E.; LÓPEZ, M.G. Implications of fructans in health: immunomodulatory and antioxidant mechanisms. **The Scientific World Journal**, v.2015, 2015.

GAUDIER, E.; JARRY, A.; BLOTTIÈRE, H.M. et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.287, p.G1168-G1174, 2004.

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

GRANCIERI, M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na modulação do câncer de cólon em modelo animal. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

GURURAJ, A.E.; BELAKAVADI, M.; SALIMATH, B.P. Antiangiogenic effects of butyric acid involve inhibition of VEGF/KDR gene expression and endothelial cell proliferation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.243, p.107-112, 2003.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.27, p.104-119, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HATAYAMA, H.; IWASHITA, J.; KUWAJIMA, A.; ABE, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.356, p.599-603, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Câncer colorretal. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>>. Acesso em: 12 set. 2015.

INCA. Declaração mundial contra o câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/internacional/declaracao_mundial_contra_cancer>. Acesso em: 22 dez. 2016a.

INCA. Incidência de câncer no Brasil: Síntese de resultados e comentários. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 22 dez. 2016b.

INCA. Tipos de câncer. Colorretal. Prevenção. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/prevencao>>. Acesso em: 22 dez. 2016c.

JANARDHANA, V.; BROADWAY, M.M.; BRUCE, M.P. et al. Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens. **Journal of Nutrition**, v.139, n.7, p.1404-1409, 2009.

JANEWEY, C.A.; WALPORT, P.T.M.; SHLOMCHIK, M. **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, p.767, 2002.

JOHANSSON, M.E.V. et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.68, p.3635-3641, 2011.

JUNG, T.; PARK, J.H.; JEON, W.; HAN, K. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. **Nutrition Research and Practice**, v.9, n.4, p. 343-349, 2015.

KELLY, C.J. et al. Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human β defensin-1. **Mucosal Immunology**, v.6, n.6, p.1110-1118, 2013.

KEUNEN, O.; JOHANSSON, M.; OUDIN, A. et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.9, p.3749-3754, 2011.

KHARE, S. et al. Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. **Methods in Molecular Biology**, v.472, p.373-386, 2009.

KOH, A.; DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P. et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v.165, p.1332-1342, 2016.

LANGEN, M.A.C.L.; DIELEMAN, L.A. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.15, n.3, p.454-462, 2009.

LOWY, D.R.; WILLUMSEN, B.M. Function and regulation of RAS. **Annual Review of Biochemistry**, v.62, p.851-891, 1993.

LUKIN, D.J. et al. P53 promotes cell survival due to the reversibility of its cell-cycle checkpoints. **Molecular Cancer Research**, v.13, n.1, p.16-28, 2015.

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. **Journal of AOAC International**, v.95, n.1, p.50-60, 2012.

MARKS, P.A.; RICHON, V.M.; RIFKIND, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.15, p.1210-1216, 2000.

MELO-JUNIOR, M.R. et al. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. **Revista Paraense de Medicina**, v.20, n.4, p.7-12, 2006.

MENDITI, K.B.C.; KANG, H.C. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.4, p.453-460, 2007.

MOTTA, R.D.A.; ZETTLER, C.G.; CAMBRUZZI, E. et al. Valor prognóstico da correlação do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermóides da cavidade oral e língua. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, n.4, p.544-549, 2009.

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

O'CONNELL, J.B.O.; MAGGARD, M.A.; KO, C.Y. Colon câncer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, n.19, p.1420-1425, 2004.

PATTERSON, C.; PERRELLA, M.A.; ENDEGE, W.O. et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor- α in cultured human vascular endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.2, p.490-496, 1996.

PERŠE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. **Radiology and Oncology**, v.39, n.1, p.61-70, 2005.

RÍOS-COVIÁN, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A. et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. **Frontiers in Microbiology**, v.7, article 185, 2016.

ROSENBERG, D.W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.30, n.2, p.183-196, 2009.

SAIF, M.W. Anti-VEGF agents in metastatic colorectal cancer (mCRC): are they all alike? **Cancer Management and Research**, v.5, p.103-115, 2013.

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

SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.8, n.5, p.588-594, 1998.

STEFFEKOVÁ, Z. et al. Early diagnosis of colorectal cancer in rats with DMH induced carcinogenesis by means of urine autofluorescence analysis. **Photochemistry and Photobiology**, v.90, p.682-685, 2014.

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

VAN DEN ENDE, W.; PESHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**, v.22, p.689-697, 2011.

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

VELEZ, A.; PERDIGÓN, G.; MESÓN, O. et al. Effect of fructooligosaccharides (FOS) on the intestinal mucosal immune system against infection with *S.Typhimurium*. In: First French-Argentine Immunology Congress, **Abstracts...** Buenos Aires, Argentina: Translational Biomedicine Journal, 2010. Abstract nº151.

WANG, P. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α exacerbates endothelial barrier dysfunction induced by hypoxia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.32, p.859-870, 2013.

WATSON, A.J.; COLLINS, P.D. Colon cancer: a civilization disorder. **Digestive Diseases**, v.29, n.2, p.222-228, 2011.

YAMASHITA, H.; FUJISAWA, K.; ITO, E. et al. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, n.5, p.1236-1243, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Instruções para submissão de artigos

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

- **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.
 - **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.
 - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas*.
* na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.
 - **Introdução.** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).
 - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - ✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.
 - ✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.
- Nota:**
- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974); ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979); ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6ª ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerd-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação:

SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be in the invoice issuance.

ANEXO B – Guide for authors

GUIDE FOR AUTHORS

Nutrition Research publishes research articles, communications, and reviews on all aspects of basic and applied **nutrition**. The mission of *Nutrition Research* is to serve as the journal for global communication of nutrition and life sciences research on **diet** and **health**. The field of **nutritional sciences** includes, but is not limited to, the study of nutrients during growth, reproduction, aging, and disease.

Articles covering basic and applied research on all aspects of nutritional sciences are encouraged, including: nutritional biochemistry and metabolism; metabolomics, nutrient and gene interactions; nutrient requirements in health and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology and epidemiology; the influence of socioeconomic and cultural factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response, work performance and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous systems, and immunity; food intolerance and allergy; nutrient drug interactions; nutrition and aging; nutrition and cancer; obesity; diabetes; and intervention programs.

A principal focus of the journal is to publish research that advances the understanding of **nutrients** and **health protectants** in food for improving the human condition. Of interest are manuscripts on the development of biomarkers for assessing how dietary components influence health status in the human.

The journal also encourages [submission](#) of manuscripts describing investigations in animal models and cell cultures that utilize methodologic approaches or techniques in biochemistry, immunology, molecular biology, toxicology, and physiology. Epidemiologic studies on nutrient and phytochemical intakes in human populations and novel analytical techniques for these compounds are within the scope of the mission for *Nutrition Research*.

Dr. Bruce A. Watkins, Editor-in-Chief (baw@purdue.edu or bawatkins@ucdavis.edu)
Angela Ranalli-Curtis, Managing Editor (alrcurtis@gmail.com)

Nutrition Research
Department of Nutrition

University of California, Davis

One Shields Avenue

3135 Meyer Hall

Davis, CA 95616-5270, USA

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Nutrition Research has a policy to follow all aspects of publication ethics and depends on the authors of submitted manuscripts to provide complete information on conflict of interests for the execution of research and data collection. The editorial office and publishers of *Nutrition Research* rely on the authors and their respective institutions to follow the policies to preserve scientific integrity in research and support publication ethics. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this:

'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or

distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written

permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via [our online system, EVISE](#)

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see

also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Embedded math

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information

(http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/). Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Abbreviations and Symbols

Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Is responsible for ensuring that all research protocols were approved and for ethical execution of the research. Will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date. The requirements for the corresponding author are detailed in the Author Submission Checklist which must be completed for manuscript submission.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract (limited to 250 words) should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Experimental Diets

All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds

Statistical Methods

Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only.

[Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.
- Tables must be in an editable (word) file.

* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/nutrition-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

- [3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

- [4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Reference to a dataset:

- [dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission Checklist

- A downloadable checklist is available [here](#).
- The checklist must be completed and signed by the Corresponding Author and uploaded as a "supporting file" during the submission process.

Document File

- Title page - page 1

Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work.

First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD).

The affiliations of each author noted with superscripts.

Complete contact information for corresponding author.

Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.

- Abbreviations page - page 2

Must include 1 abbreviation with meaning per line.

Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning.

Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.

- Abstract page - page 3

A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion.

Do not include subheadings in this section.

It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).

- List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus(<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.
- Manuscript text

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

- Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.

- Text must start on a new page and include the following main headings:

Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition.

Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required).

Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures.

Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section.

Acknowledgment (note spelling).

- Technical or editorial assistance must be acknowledged.

- Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated.

Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc...) in this section. If there is a conflict of interest, that must be stated in this section.

- References

Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2].

The author should make certain that there is a strict one-to-one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not

receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).