

Wilson de Barros Cantero

**LESÕES GENÔMICAS E CARCINOGENESE COLORRETAL:
EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTÊICO-CALÓRICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO DE INULINA EM QUADRO CARENCIAL**

Campo Grande – MS

2014

Wilson de Barros Cantero

**LESÕES GENÔMICAS E CARCINOGENESE COLORRETAL:
EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTÊICO-CALÓRICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO DE INULINA EM QUADRO CARENICIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dra. Andréa Conceição M. B. Antonioli da Silva

Campo Grande – MS

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

WILSON DE BARROS CANTERO

**LESÕES GENÔMICAS E CARCINOGENESE COLORRETAL:
EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTÊICO-CALÓRICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO DE INULINA EM QUADRO CARENICAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado.....(preenchido pela banca: Aprovado/Reprovado)

Campo Grande (MS), 29 de Agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Colagrossi Paes Barbosa - UFMS

Prof. Dr. José Carlos Dorsa Vieira Pontes - UFMS

Profª Drª Renata Matsuo - UFMS

Profª. Drª. Iandara Schettert Silva – UFMS

Profª Drª Andréa C. B. Antonioli da Silva – UFMS

Prof. Dr. José Carlos G. Mendonça – UMFS

DEDICATÓRIA

À minha esposa Adriana, por estar ao meu lado com o seu Amor incondicional, sempre me incentivando nas horas mais difíceis, compartilhando as alegrias e me dando forças para sempre lutar pelos nossos ideais.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais pelo incentivo na busca do conhecimento como única forma de vencer os obstáculos da vida. Minha eterna gratidão.
- À minha orientadora, Prof^a Dr^a Andréa Antonioli pela nossa amizade e pela determinação inabalável de incentivo, busca pelo conhecimento e liderança a frente da equipe do CETROGEN. Pelos conselhos nas horas de esmorecimento por tantas dificuldades pelo caminho.
- Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira pela entrega incondicional na busca pelo conhecimento, amizade e viabilização desse projeto. Uma grande pessoa para se chamar de amigo. A minha gratidão.
- Aos co-autores desse trabalho Nicole Takahachi, Mariana de O. Mauro, João Renato Pesarini e Ana Paula Maluf Rabacow pela importante contribuição para o enriquecimento deste trabalho.
- À nossa querida técnica do CETROGEN, Roseane, pela determinação incansável em querer ajudar a todos os pós graduandos, independente de dia, hora e condições climáticas. O meu respeito e gratidão por tudo.
- Ao Prof. Dr. Fábio Colagrossi Paes Barbosa o meu muito obrigado pela inestimável contribuição com o seu conhecimento na qualificação dessa tese.
- À Prof^a Dr^a Renata Matsuo os meus agradecimentos por ter colocado todo o seu conhecimento técnico e crítico na qualificação desse projeto.
- Às minhas filhas Karen e Deborah, pelo amor e torcida.

Epígrafe

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

Lesões genômicas e carcinogênese colorretal: efeitos da restrição protéico-calórica e da suplementação de inulina em quadro carencial. Campo Grande; 2014. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do sul].

A presente pesquisa avaliou os efeitos da restrição protéico-calórica e da suplementação de inulina, uma fibra formada por um tipo linear de carboidratos polidispersos composto basicamente por ligações frutíl-frutose β -(2→1), em quadro carencial em animais induzidos ao desenvolvimento de lesões genômicas e carcinogênese colorretal. O experimento foi realizado com camundongos *Swiss* machos adultos (n=11/grupo). Os grupos experimentais foram Controle Negativo (EDTA), Controle Positivo, 1,2-dimetilhidrazina (DMH), Inulina e Associado. A administração da substância promotora de câncer colón retal (DMH) ocorreu durante duas semanas em quatro doses de 20mg/kg de peso corpóreo (p.c) via intraperitoneal (i.p.) e a inulina foi administrada diariamente via oral (v.o.) na dose de 50mg/kg p.c.. Todos os grupos foram realizados em duplicata sendo o primeiro lote submetido à ração normoprotéica e o segundo à ração hipoprotéica. Os resultados indicaram que o estado de desnutrição relaciona-se ao aumento da frequência de lesões genômicas, mas não predispõe ao desenvolvimento do câncer colorretal. A inulina apresenta atividade genotóxica, que precisa ser melhor compreendida, e possui uma baixa atividade antigenotóxica. Além disso, possui uma importante capacidade de reduzir os biomarcadores para a carcinogênese intestinal tanto em animais em estado de desnutrição quanto os saudáveis. Esses dados sugerem potencial terapêutico, sendo a inulina uma forte candidata a compor o grupo de alimentos funcionais utilizado na prevenção do câncer tanto de pessoas com adequada nutrição quanto em pessoas em quadros de desnutrição.

Palavras-chave: Desnutridos; Camundongos; Genotoxicidade; Restrição protéico-calórica.

ABSTRACT

The present study investigated the effects of protein-calorie restriction and supplementation of inulin, a fiber formed by a linear type of polydisperse carbohydrates composed primarily of fructil-fructose bonds β -(2→1), on deficiency status in animals in which the development of genomic lesions and colorectal carcinogenesis was induced. The experiment was conducted with adult male Swiss mice (n=11/group). The experimental groups were as follows: Negative Control (EDTA), Positive Control, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), Inulin and Associate. The administration of the substance promoting colorectal cancer (DMH) occurred over two weeks in four doses of 20 mg/kg of body weight (bw) intraperitoneally (ip), and inulin was administered daily orally (po) at a dose of 50 mg/kg bw. Each group was split in two; half of each group was fed a normal protein diet, and the other half was fed a low protein diet. The results indicated that malnutrition is related to an increased frequency of genomic lesions but does not predispose animals to the development of colorectal cancer. Inulin exhibited genotoxic activity that requires further investigation and low antigenotoxic activity. Moreover, inulin reduced the levels of biomarkers for intestinal carcinogenesis in both malnourished and healthy animals. These data suggest therapeutic potential, with inulin being a strong candidate for inclusion in the group of functional foods used in cancer prevention for both individuals with proper nutrition and malnourished individuals.

Keywords: Malnourished; Mice; Genotoxicity; Protein-calorie restriction.

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1 - Desenvolvimento ponderal relativo ao período de
experimentação.....36
- Tabela 2 - Valores médios \pm erro padrão da média do peso absoluto e relativo
de órgãos dos animais ao final do período de experimentação.....37
- Tabela 3 - Valores médios \pm erro padrão da média da frequência de células com
lesão de DNA, distribuição entre classe de danos e escore referentes aos
testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade da inulina em animais
submetidos à ração normo e hipoprotéica no ensaio do cometa em
sangue periférico de camundongos
machos.....38
- Tabela 4 - Número, distribuição e redução de danos de focos de criptas aberrantes
(FCA) no colón de camundongos tratados com inulina e submetido com
ração normoprotéica e hipoprotéica.....40

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da Inulina.....	19
Figura 2 – Delineamento experimental.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CENUREN	Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica
CEtroGEN	Centro de estudo em células-tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica
FUFOSE	The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe.
IARC	International Agency for Research on Cancer.
RC	Ração Comercial
RH	Ração Hipoprotéica
RN	Ração Normal
UniFil	Centro Universitário Filadélfia

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Dexoribonuclêico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-ácetico
g	Gramas
Kg	quilograma
LPM	Baixo ponto de fusão
mA	mili ampere
mg	miligrama
ml	mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	nano metro
°C	Grau Celsius
Ph	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonuclêico
V	Volume
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
µl	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Quimioprevenção.....	17
2.2 Alimentos Funcionais.....	19
2.3 Caracterização da Inulina.....	20
2.4 Ensaios biológicos correlacionados à quimioprevenção.....	23
2.5 Desnutrição protéico-calórica.....	24
2.6 Carcinogênese química.....	26
2.7 Ensaio de média duração: teste de focos de criptas aberrantes.....	27
2.8 Ensaio de curta duração: teste do cometa.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Agentes químicos.....	30
4.1.1 1,2-Dimetilhidrazina.....	30
4.1.2 Inulina.....	30
4.1.3 Dietas.....	30
4.2 Animais.....	31
4.3 Delineamento experimental.....	31
4.4 Ensaios biológicos.....	34
4.4.1 Ensaio do cometa.....	34

4.4.2 Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes.....	35
4.4.3 Porcentagem de redução de danos.....	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	71

INTRODUÇÃO

O câncer de colón e reto é uma das causas mais frequentes de morte nas populações dos países desenvolvidos que consomem dietas ricas em gordura saturada e com alto valor protéico associado à baixa ingestão de vegetais, frutas, verduras e fibras. Desta forma, entende-se que a diminuição na ingestão de proteínas e gorduras de origem animal reduz o desenvolvimento de tumores colorretais (POOL- ZOBEL, 2005; STEVENS et al., 2007; MAURO et al., 2013).

A população brasileira passa por uma transição nutricional, na qual aproximadamente dois terços dos indivíduos saíram do estado de desnutrição e passaram para o estado de sobrepeso e/ou obesidade (LIMA; NAVARRO, 2014). Isto ocorreu por mudanças socioeconômicas, no estilo de vida, sedentarismo e consumo inadequado de alimentos calóricos, principalmente (FERREIRA, 2005). No entanto em várias partes do mundo e em regiões como o Nordeste do Brasil ainda existem pessoas em desnutrição grave (desnutrição protéico-calórica) o que configura uma importante questão de saúde pública (VICTORIA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; ONIS et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Segundo Silva et al. (2011) não há registros suficientes para se concluir o que quadros carenciais podem causar em pacientes com câncer ou predisposição a tal doença. Dados experimentais também são insuficientes para correlacionar a influência da desnutrição e a carcinogênese química. No entanto, esses mesmos autores demonstraram que a desnutrição causada por *meal-feeding* não se correlaciona com o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes, um importante biomarcador para o câncer colorretal.

Estudos demonstram que dietas capazes de promover, proliferar e manter a microbiota intestinal são capazes de melhorar a qualidade de vida e prevenir doenças crônicas como o câncer e/ou impedir o desenvolvimento de biomarcadores para esta doença. Dietas com essas características são, em geral, ricas em pré e probióticos (BURNS, 2004; ISHII et al., 2011; MAURO et al., 2013; PESARINI et al., 2013).

Segundo Roberfroid (2002), alimentos prebióticos modulam benéficamente a microflora intestinal estimulando o crescimento seletivo e/ou a atividade de um número limitado de bactérias no cólon tais como os lactobacilos e as bifidobactérias. Dentre possíveis componentes de uma dieta saudável, e com a presença de alimentos funcionais, que podem assumir o papel anteriormente descrito, destaca-se o oligossacarídeo inulina, que interfere benéficamente em diferentes processos fisiológicos e bioquímicos em humanos promovendo melhoria na saúde e redução no risco de doenças (KAUR & GRUPTA, 2002). Esse frutano é ainda descrito como capaz de reduzir a atividade mutagênica e tumoral de xenobióticos presentes na alimentação cotidiana da população (ANVISA, 2006), além de modular fatores genéticos e citológicos do cólon, que impedem ou diminuem lesões genéticas e a formação de neoplasias (POOL-ZOBEL *et al.*, 2002; ROBERFROID, 2005; MAURO *et al.*, 2013).

Frente ao exposto a presente pesquisa avaliou os efeitos da restrição protéico-calórica e da suplementação de inulina em quadro carencial em camundongos induzidos ao desenvolvimento de lesões genômicas e carcinogênese colorretal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Quimioprevenção

A quimioprevenção refere-se à prevenção da indução e/ou à reversão da carcinogênese em estágios pré-malignos e/ou à inibição da progressão tumoral. Até o presente momento, estão descritos três diferentes níveis de prevenção de doenças determinadas por mutações, segundo o alvo de intervenção: (I) o nível primário refere-se ao tratamento/suplementação de indivíduos saudáveis reduzindo assim o risco de exposição, fortalecendo o organismo e inibindo a progressão tumoral; (II) o nível secundário é quando o processo de tratamento/suplementação se dá em indivíduos em estágios iniciais da doença; e (III) o nível terciário é quando o processo se dá em pacientes pós-quimioterapia no intuito de fortalecer o organismo e melhorar a qualidade de vida do paciente (DE FLORA; FERGUNSON, 2005).

De forma mais simples pode-se definir quimioprevenção como a capacidade de reverter ou suprimir danos no DNA que podem levar ao desenvolvimento de tumores por meio de uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos (SILVA; NAVES, 2001; OLIVEIRA; ALDRIGHI; RINALDE, 2006).

A quimioprevenção ou quimioproteção é reconhecida por dois processos distintos: (I) a antimutagênese que se dá por meio da inibição de carcinógenos, inibição da bioativação de carcinógenos, detoxificação de carcinógeno, bloqueio da ligação carcinógeno-DNA e aumento dos níveis de reparo do DNA; ou (II) a antiproliferação/antiprogredão que ocorre por meio da regulação de fatores de crescimento e hormônios, inibição de oncogenes, inibição de poliaminas, indução de diferenciação celular, estimulação da resposta imunológica, aumento de intercomunicações celulares, reestabelecimento da função de genes supressores tumorais, aumento dos níveis de apoptose, inibição da angiogênese, inibição da degradação de membrana basal e redução da síntese de DNA (KELLOF et al., 1994; DIAS, 2007).

A antimutagênese por sua vez é definida como a ação de qualquer substância que seja capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou

induzidas. A antimutagênese ocorre por dois modos de ações distintas, a desmutagênese e a bioantimutagênese (GRUTTER et al., 1990; Waters et al., 1990). A desmutagênese é marcada pela capacidade de inativação, química ou enzimática, do agente mutagênico ou de seus precursores. Já a bioantimutagênese refere-se à substâncias capazes de modular o sistema de reparo e duplicação do DNA, logo agem em nível celular, aumentando a fidelidade da síntese de DNA, estimulando o reparo livre de erros ou inibindo os sistemas de reparo que estão sujeitos a erro (KADA; SHIMOI, 1987; HARTMAN; SHANKEL, 1990; FERGUNSON, 1994; DE FLORA, 1998).

Ainda segundo Kuroda e Hara (1999) os compostos antimutagênicos/anticarcinogênicos, que são aqueles capazes de impedir, retardar ou reduzir o desenvolvimento de cânceres, podem ainda ser classificados como (I) inibidores da formação de agentes mutagênicos/carcinógenos ou de seus precursores; (II) bloqueadores da chegada de carcinógenos à células alvo específicas; e (III) agentes supressores da expressão de características tumorais.

Esses conhecimentos permitem o desenvolvimento de estratégias de prevenção de diferentes doenças genéticas e esse fato no decorrer dos tempos resguarda as gerações futuras além de possuir efeitos imediatos como a capacidade de aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos indivíduos. Esses fatos determinam que as terapêuticas quimiopreventivas, sejam elas nutricionais e/ou medicamentosas, se tornem cada vez mais estudadas. Por isso são relatadas mais de 500 substâncias em teste para indicações como quimiopreventivos além de 25 classes químicas de diferentes compostos com esse potencial terapêutico (FERGUNSON, 1994). Mas, a busca por quimiopreventivos cresce visto que o século XXI foi marcado pelo aumento da expectativa de vida e por consequência o aumento da frequência de doenças crônico-degenerativas que requerem novos tipos de abordagens médicas.

Logo nesse novo advento da quimioprevenção, o uso diário de compostos quimiopreventivos, sejam eles antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, poderá ser o procedimento mais efetivo para prevenir o câncer e outras doenças genéticas. Destaca-se ainda que esses benefícios devam ser obtidos por meio de compostos que possuam pouco ou nenhum efeito colateral e alta eficácia; além de possuírem baixo custo, utilizar a via de administração oral e ter mecanismo/modo de ação conhecido (FERGUNSON, 1994; GOMES et al., 1996; SURTH et al., 1996). Em

função da via de administração reconhece-se que a dieta seria uma das principais formas de se atingir as respostas esperadas em quimioprevenção e os alimentos funcionais ou nutracêuticos tem ganhado espaço nessa discussão.

2.2. Alimentos funcionais

Uma associação inversamente proporcional está demonstrada entre o consumo de frutas e verduras e a ocorrência de câncer (FLAGG et al, 1995; WEISBURGUER, 1999; ZHANG et al., 1999; WEISBURGUER, 2000; FERRARI, 2001; FERRARI; TORRES, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al. 2007; MAURO et al., 2013, PESARINI et al., 2013; MAURO et al., 2014). A referida associação também é bem descrita para alimentos funcionais, e esse conceito é baseado na hipótese de que a dieta é capaz de controlar funções orgânicas que contribuem para a manutenção da saúde e redução do desenvolvimento de doenças (BORGES, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al. 2007; MAURO et al., 2013, PESARINI et al., 2013; MAURO et al., 2014).

Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária os alimentos funcionais são produtores de efeitos metabólicos ou fisiológicos por meio de nutrientes ou não nutrientes que são capazes influenciar o crescimento, o desenvolvimento, a manutenção e outras funções normais do organismo (ANVISA, 2007). Já segundo a *The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) para ser alimento funcional o mesmo dever: (I) estar presente na comida diária ou fazer parte da constituição de algum alimento; (II) ter ocorrência natural nos alimentos; (III) desencadear efeitos benéficos tais como nutrição básica; (IV) fortalecer o organismo e/ou melhorar o bem estar e/ou diminuir os riscos de alguma patologia e/ou melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (ROBERFROID, 2005).

Ainda segundo MILNER (1999), para que um alimento seja classificado como funcional o mesmo precisa (I) possuir efeito metabólico ou fisiológico importante para a manutenção da saúde física e para a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças crônicas; (II) fazer parte da alimentação cotidiana; (III) atingir os efeitos esperados a partir de quantidades não tóxicas os quais devem ainda permanecer após a ingestão; e (IV) não podem ser utilizar para tratar ou curar doenças. Logo, a utilização de um alimento funcional deve ser considerada uma terapia alternativa e não deve ser substituta de nenhuma indicação médica.

Uma classificação de alimentos funcionais os divide em prebióticos, probióticos e simbióticos. Os primeiros são representados principalmente pelas fibras que são alimentos não digeríveis e por consequência não são absorvidos no intestino delgado, por isso requerem metabolização seletiva, por bactérias específicas, no intestino/cólon e que, posteriormente, devem desencadear efeitos fisiológicos importantes para a homeostasia/saúde. Os probióticos são organismos vivos que após ingestão desenvolvem papel benéfico no balanço da microflora intestinal e na saúde do hospedeiro. Por fim, os simbióticos são descritos como aqueles que reúnem todas as características anteriormente descritas (GIBSON, 1999).

2.3. Caracterização da inulina

A inulina (Figura 1) é um carboidrato polidisperso composto basicamente por ligações frutíl-frutose $\beta(1\rightarrow2)$. Essas ligações são caracterizadas por ocorrerem entre um carbono anomérico de um monossacarídeo e outro monossacarídeo adjacente por meio de suas hidroxilas com a liberação de uma molécula de água (ROBERFROID, 2005; HAULY; MOSCATTO, 2002).

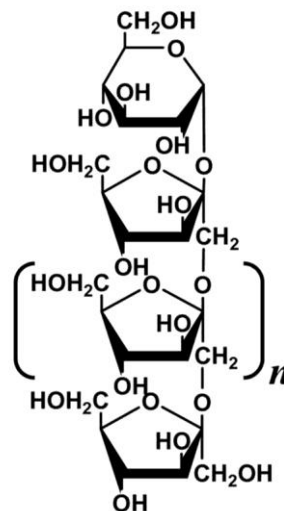


Figura 1 – Estrutura molecular da inulina (Adaptado de KEIJI et al. 2011).

Até o presente momento a inulina tem sido extraída industrialmente, em especial, da raiz da chicória que é uma planta pertencente à família *Compositae* e seu nome científico é *Cichorium intybus* (ROBERFROID, 2005). No entanto, esse frutano pode ser encontrado também no bulbo da cebola, do alho-poró e do alho; no

tubérculo e nas folhas centrais da alcachofra; na raiz do yacon; nas folhas do dente de leão e da barba de bode; e também nos grãos de centeio e trigo além da banana (VAN LOO et al., 1999; HAULY; MOSCATTO, 2002).

A inulina é considerada uma fibra em função da presença das ligações β -frutofuranosil que são a maioria das ligações presentes na inulina e em outras oligofrutoses. Logo esses compostos não são degradados por secreções salivares e pancreáticas de mamíferos o que as tornam, por definição, fibras (CHERBUT, 2002).

De acordo com ROBERFROID (2005) as fibras são componentes das células de vegetais de plantas comestíveis, compostas por carboidratos, oligossacarídeos ou polissacarídeos, resistentes à hidrólise por enzimas humanas e resistentes à absorção no intestino delgado, sendo hidrolisadas e fermentadas, parcialmente ou totalmente, por bactérias no intestino grosso. A inulina por sua vez é encontrada na composição de diferentes plantas comestíveis e é hidrolisada e fermentada, pela microflora intestinal, sendo então convertidas em ácidos graxos de cadeia curta, lactato, biomassa bacteriana e gases.

A inulina, agora entendida como fibra alimentar, melhora o trânsito intestinal por meio do aumento do peristaltismo do intestino grosso o que culmina na redução de constipação (DEN BOND et al., 2003). Essa fibra ainda é capaz de alterar o pH no íleo, ceco e cólon fato que permite o aumento de minerais ionizados, situação facilitadora da difusão passiva. Além disso, ocorre uma melhor absorção de ácidos graxos voláteis, sais biliares, cálcio, fósforo, fosfato e magnésio uma vez que a inulina promove hipertrofia das paredes do ceco, aumentando a superfície de absorção, associada ao aumento desses compostos e íons anteriormente referidos que tendem a ser absorvidos a favor do gradiente (KAUR; GRUPTA, 2002).

Ainda segundo KAUR e GRUPTA (2002) a inulina é capaz de aumentar a deposição de cálcio nos ossos o que sugere potencial para a prevenção da osteoporose. Destaca-se ainda que essa fibra pode reduzir a capacidade lipogênica hepática visto que causa a redução da expressão gênica de enzimas lipogênicas o que culmina na diminuição das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-colesterol). Acredita-se que essa redução da expressão gênica se deva aos ácidos graxos de cadeia curta que são produzidos durante a fermentação da inulina no intestino grosso (KAUR; GRUPTA, 2002; SAAD, 2006).

O sistema imunológico também pode ser influenciado pela ingestão de inulina. Dados experimentais demonstraram que esse frutano é capaz de causar

imunoestimulação e os biomarcadores são relacionados aos tecidos linfóides e em especial as placas de Peyer. Ainda no intestino a inulina é capaz de melhorar a morfologia da mucosa e a concentração e composição das glicoproteínas que protegem o epitélio de agressões o que determina resistência à colonização, impede a translocação bacteriana além de melhorar funções químicas e enzimáticas de proteção do trato gastrointestinal (ROBERFROID, 2005).

Dentre os biomarcadores da função da inulina, como alimento funcional, ainda se destaca as suas atividades quimiopreventivas e antitumorais.

Diante do exposto pode-se afirmar que a inulina, o alimento funcional discutido por esse estudo, pode ser classificado como uma fibra dietética e prebiótico. Para essas classes já estão descritas atividades quimiopreventivas e antitumorais (MAURO et al., 2013; MAURO et al., 2014). Ferguson (1994) ainda relata que fibras preparadas do parênquima de frutas e de outras partes dos vegetais apresentam boa capacidade adsorptiva. Essa propriedade de interesse aumenta à medida que também aumentam também as características hidrofóbicas do composto e com esse aumento determina-se a menor possibilidade dessa fibra ser hidrolizada e, por conseguinte, maior será a sua capacidade adsorptiva, propriedade requerida para a eliminação de xenobióticos que podem ser mutagênicos e/ou carcinogênicos.

Em função da impossibilidade de sofrerem hidrólise, alimentos funcionais, como as fibras e dentre elas a inulina, possuem a capacidade de estimular seletivamente o crescimento de bactérias na microflora intestinal e dessa forma atuam indiretamente na prevenção de mutações e desenvolvimento de tumores (ROBERFROID, 2000) não só pela sua capacidade de adsorção (FERGUNSON, 1994), mas também seu sua atividade antimutagênica (MAURO et al. 2013; MAURO et al., 2014) e pelos benefícios proporcionados pela metabolização seletiva no intestino grosso (ROBERFROID, 2005) realizadas por bactérias específicas (REDDY, 1999).

A inulina em especial estimula a proliferação das bifidobactérias, as quais são capazes de alterar a frequência de apoptose, e o seu aumento é considerado um efeito antitumoral, além de possuir a capacidade de promover a proteção e o reparo da mucosa do cólon, principalmente, contribuindo para a redução do risco de doenças intestinais (REDDY, 1999; CHERBUT, 2002) e dentre elas citam-se os pólipos e tumores.

A fermentação seletiva da inulina ainda é capaz de garantir a formação de ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, que servem de fonte de energia para os enterócitos aumentando a proliferação celular e o fluxo sanguíneo. Ressalta-se ainda a capacidade de prover a competição benéfica entre a microflora natural do intestino favorecendo o crescimento das bifidobactérias que não são produtoras, ou produzem muito pouca, β -glicuronidase. Essa enzima tem a capacidade de metabolizar contaminantes alimentares e aminas heterocíclicas que podem ser causadores de tumores. Além disso, destaca-se a capacidade da competição favorecer o crescimento das bactérias que promovem a diminuição das infecções e inflamações crônicas das quais podem derivar danos no DNA (POOL-ZOBEL et al., 2002; HAULY; MOSCATTO, 2002; KOLIDA et al., 2002; ROBERFROID, 2005). As bifidobactérias ainda são capazes de produzir ácido lático que funciona como bactericida para as bactérias putrefativas e ainda causam redução da absorção de amônia, aumento do trânsito intestinal o que diminui o tempo de contato entre o bolo fecal e a mucosa e por consequência reduz a chance do desenvolvimento de câncer colorretal (GIBSON et al., 1995; ROBERFROID, 2005) ou de seu biomarcador os focos de criptas aberrantes (ISHII et al., 2011; MAURO et al., 2013, PESARINI et al., 2013).

2.4. Ensaios biológicos correlacionados à quimioprevenção

Como mencionado anteriormente muitos são os biomarcadores da inulina em diferentes propostas experimentais e ensaios pré-clínicos e clínicos. No entanto, na literatura consultada nenhum estudo foi encontrado que correlacionasse os efeitos da inulina na carcinogênese colorretal em indivíduos e/ou animais desnutridos.

2.5. Desnutrição protéico-calórica

De acordo com Monteiro (2003), desnutrição é uma nomenclatura geral que define um estado clínico resultante da ausência ou deficiência de algum ou todos os elementos nutricionais. Pode também ser considerada uma doença que se caracteriza pela deficiência crônica de um ou mais nutrientes (proteínas, vitaminas, carboidratos e outros) na alimentação do indivíduo. No entanto, não basta os nutrientes estarem disponíveis, para que haja crescimento e manutenção das dimensões corporais adequados são necessárias condições ótimas de ingestão e utilização biológica de calorias e proteínas (HOFFMANN, 1995). Independentemente da causa da desnutrição um fator relevante a respeito dessa doença é a causa de óbitos, especialmente em gestantes e crianças, que se dá principalmente em países em desenvolvimento (MÜLLER; KRAWINKELI, 2005) em função de queda de imunidade que aumenta a susceptibilidade dos indivíduos a agentes infecciosos (PELLETIER et al., 2005) e, pela uma fragilidade de sistema de defesa, as infecções tendem a aumentar a sua gravidade (RICE et al., 2000; BLACK, 2003). Além disso, a desnutrição ainda se relaciona ao desenvolvimento de diabetes, anemia, caquexia e obesidade, principalmente (SAWAYA, 2006; AGARWAL et al., 2008; CHONG, 2008).

Embora a desnutrição esteja relacionada à uma má alimentação ela também pode ser desenvolvida a partir de dietas inapropriadas como a hipocalórica e/ou a hipoprotéica (KENNEDY et al., 1996). Nessa condição quando o organismo não dispõe de uma ingesta de nutrientes suficientes para a produção de energia para as funções orgânicas vitais há a necessidade de sanar essa falta por meio de ATP's disponíveis no organismo, posteriormente da glicose do sangue e dos tecidos, do glicogênio do fígado e dos músculos e por fim se podem utilizar as proteínas do fígado e dos músculos que precisam ser degradadas em aminoácidos para serem utilizadas (VINCENT; RADERMECKER, 1959).

Evidências indicam que um déficit nutricional durante um período crítico e específico do desenvolvimento pode desencadear efeitos duradouros e persistentes que aumentam a predisposição individual ao desenvolvimento de doenças tais como a obesidade, diabetes e hipertensão e a esse fenômeno denomina-se imprinting metabólico (WATERLAND; GAZA, 1999). Destaca-se também que a desnutrição intrauterina é capaz de levar a uma reprogramação nutricional no período embrio-

fetal que pode determinar o desenvolvimento de doenças pós-natais e/ou desencadear adaptações irreversíveis de levam a um inadequado funcionamento de órgãos por exemplo. (LUCAS, 1991; WELLS, 2003; LANGLEY-EVANS, 2004).

Sendo observada a importância da desnutrição na qualidade de vida dos indivíduos, modelos experimentais têm sido criados de forma a permitir estudos na área. Logo estudos experimentais são capazes de simular a desnutrição que acomete humanos por meio de restrição da oferta de alimentos (HEDLEY-WHITE; MEUSER, 1971; HEDLEY-WHITE; MEUSER, 1973; SIMA, 1974; BEDI; WARREN, 1983; CONBOY et al., 1987; CORNBATH; BROWN, 1988) e utilização de dieta hipoprotéica (ROY et al., 1972; OLDFORDS; PERSSON, 1982; CONDARI et al., 1985; RANA et al., 1991), principalmente.

No Brasil, segundo Vasconcelos (2000) e Carvalho et al. (2014), uma retrospectiva demonstra que nos anos 70, a população brasileira esteve marcada por surtos endêmicos de fome, que estavam geográfica e socialmente localizados, e nessas subpopulações o quadro nutricional caracterizava altos índices de prevalência das formas graves e severas de desnutrição protéico-energética. Dez anos após a desnutrição passou a ser caracterizada pela deficiência global de micronutrientes em todo o país havendo ainda o declínio das prevalências das formas de desnutrição protéico-calórica. Já a partir da década de 90 até os dias atuais observa-se a estabilização da prevalência de desnutrição protéico-calórica e manutenção das deficiências de micronutrientes em um bolsão que abrange em especial as regiões norte e nordeste do país. Assim sendo verifica-se que a desnutrição protéico-calórica ainda é uma importante de saúde pública no Brasil o que motivou essa pesquisa a usar um modelo experimental de desnutrição baseado na oferta de dieta regional com base nos costumes da região Nordeste.

Segundo Teodósio et al. (1990) e Ferreira et al. (2005) a dieta básica da Zona da Mata Pernambucana é constituída basicamente por (g/100g) por 18,3g de feijão mulatinho, 64,8g de farinha de mandioca, 4,1g de charque e 12,8g de batata doce. Essa dieta possui 7,8% de proteínas, 73,2% de carboidrato, 1,5% de gordura, 7,2% de fibras, 1,3% de cinzas e 9,0% de umidade em sua composição centesimal. Ao ofertar essa dieta à roedores observa-se que os mesmo entram em quadro de desnutrição que é característico do marasmo verificado em populações humanas.

2.6. Carcinogênese química

De acordo com Camargo et al. (1994) a carcinogênese química é um processo de múltiplas etapas composto pela: (I) iniciação que é caracterizada por alterações, permanentes ou reversíveis, no DNA causadas por agentes genotóxicos e/ou mutagênicos; (II) promoção marcada por células com alterações genéticas que proliferam-se anormalmente e algumas delas evoluem para etapas posteriores da carcinogênese em especial por meio do processo de seleção clonal que também é marcado pela instabilidade genética; destaca-se ainda que os agentes promotores são não genotóxicos e atuam de maneira epigenética e assim alteram os sinais moleculares envolvidos no controle da divisão celular; (III) progressão que evidente em função da manifestação histológica, o que confirma a instabilidade do genoma e as células em proliferação aumentada evoluem para a malignidade; e (IV) manifestação, fase na qual a neoplasia manifesta-se clinicamente e permite observar processos de anaplasia, infiltração e metástase.

Dentre diferentes modelos experimentais de carcinogênese química a presente pesquisa fez a opção pela carcinogênese química induzida pela 1,2-Dimetilhidrazina. Esse composto é classificado como um pró-carcinógeno visto que o câncer é causado por um de seus metabólitos. A ativação ocorre principalmente no fígado, onde ocorre a oxidação da 1,2-Dimetilhidrazina em azometano e desse em azoximetano. Posteriormente, esse último é hidroxilado enzimaticamente em metilzoximetanol que na temperatura corporal se decompõe de forma espontânea em formaldeído, água, nitrogênio, e metildiazônio. Esse composto é um eficiente agente alquilante por apresentar em sua composição o íon carbônico reativo que reage com ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo capaz de promover transições GC→AT. O metilazoximetanol pode ainda se conjugar com ácido β-glicurônico e ser levado à luz intestinal onde a β-glicuronidase bacteriana libera o metabólito ativo da 1,2-Dimetilhidrazina (WEISBURGER, 1971; NAGASAWA et al., 1972; FIALA, 1975; LAMONT; O'GORMAN, 1978; DIEHL et al., 2006).

Em roedores, modelo experimental desse estudo, a 1,2-Dimetilhidrazina inicia uma reação inflamatória que desencadeia o aumento da proliferação celular da mucosa do cólon. Logo aplicações sucessivas resultam na proliferação contínua, aumento do número de células na fase S do ciclo celular o que culmina em hiperplasia progressiva das criptas e hipertrofia da mucosa intestinal (WIEBECKE et

al., 1973; RICHARDS, 1977; DESCHNER, 1978; WARGOVICH et al., 1983; KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994).

2.7. Ensaio de média duração: teste de focos de criptas aberrantes

Os estudos de carcinogênese química experimental são classificados como ensaios de longa duração porque requerem longos períodos para o desenvolvimento das neoplasias o que onera os testes. Logo ensaios mais econômicos, que são necessários menores períodos para a sua realização, na ordem de semanas ou meses, são desenvolvidos e esses, em geral, baseiam-se em biomarcadores, detectáveis molecular, celular ou morfológicamente, associados aos estágios iniciais da carcinogênese, ou seja, iniciação e promoção (LIPPMAN et al., 1990; CAMARGO et al., 1994).

O biomarcador mais utilizado para o câncer colorretal é a presença de focos de criptas aberrantes que tem validação para uso experimental além de ser um importante prognóstico em estudos clínicos nos quais pode inclusive determinar intervenções cirúrgicas (STEVENS et al., 2006).

Em estudos clínicos a avaliação dos focos de criptas aberrantes é feita por exames de imagens. Já experimentalmente, Bird (1987) propõe avaliação estereoscópica da mucosa intestinal corada por azul de metileno. Essa análise é realizada após fixação, sob lâmina de vidro, com a mucosa distendida, sem o uso de nenhum procedimento da rotina histopatológica. Para a identificação das criptas aberrantes deve-se observar o tamanho da cripta que precisa atingir pelo menos duas vezes o das criptas adjacentes, a abertura luminal deve ser mais elíptica do que circular, a camada de células epiteliais deve ser mais espessa que as circunvizinhas e assumir um aspecto mais escuro (MCLELLAN, 1991).

2.8. Ensaio de curta duração: teste do cometa

O ensaio de cometa evidencia a migração de fragmentos de DNA, formando imagens semelhantes a cometas quando submetido à corrente eletroforética. Segundo Tice et al. (1995) esse método de quantificação de danos no DNA em células individualizadas foi primeiramente proposto por Rydenberg e Johanson em 1978. Após, em 1984, Östling e Johanson realizaram a eletroforese

em pH semineutro que permitiu aumento da sensibilidade. No entanto, foram Singh et al. (1988) que modificaram essa metodologia e a tornou uma técnica de grande importância na detecção de quebras de DNA e de danos em sítios álcali-lábeis devido a eletroforese agora ser realizada em tampão alcalino com pH > 13.

Esse ensaio é rápido, simples, sensível e muito utilizado *in vivo*, *in vitro*, no biomonitoramento ambiental e na clínica para a detecção de danos causados por agentes químicos, físicos e biológicos. Empregado para a quantificação de danos genéticos em uma pequena amostra de células individualizadas, é um método particularmente importante para o estudo de diferenças intercelulares em relação a danos e reparos no DNA. Os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo da realização é considerado baixo (OLIVE et al, 1992; FAIRBAIRN et al., 1995; RIBAS, 1995; ROSS et al., 1995; TICE, 1995; KLAUDE et al., 1996; ANDERSON et al., 1998; ANDERSON; PLEWA, 1998; TICE et al., 2000; FRIEAUFF et al., 2001).

Os cometas em geral são analisados visualmente ou pelo emprego de *software*. Quando visualmente os mesmos podem ser corados por brometo de etídeo que é um agente intercalante de DNA observável em microscópio de imunofluorescência que permite a classificação em: (I) classe 0 – onde os nucleóides não danificados não apresentam a formação de cauda em função da corrida eletroforética; (II) classe 1 – os nucleóides possuem cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (III) classe 2 – os nucleóides apresentam cauda correspondente a até duas vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide; e (IV) classe 3 – os nucleóides possuem cauda superior a duas vezes o tamanho do diâmetro dos nucleóide (KOBAYASHI et al., 1995). Os nucleóides que se apresentaram totalmente fragmentos em geral não são contabilizados. Mas, os mesmos podem ser usados como medida da frequência de apoptose (SPEIT et al., 1996).

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar os efeitos da restrição protéico-calórica e da suplementação de inulina em quadro carencial em camundongos induzidos ao desenvolvimento de lesões genômicas e carcinogênese colorretal

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade genotóxica e antígenotóxica da Inulina
- Analisar o comportamento de biomarcadores na carcinogênese intestinal

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Agentes químicos

4.1.1 1,2-Dimetilhidrazina

Utilizou-se a 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma®, CAS No. 306-37-6) na concentração de 20mg/kg peso corpóreo (p.c) diluída em solução aquosa de Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA - 0,37mg/ml) e administrada aos animais, 2x/semana, durante duas semanas, por via intraperitoneal (i.p) (Mauro et al., 2013).

4.1.2 Inulina

O alimento funcional inulina foi doado pela ORAFIT®, Bélgica. A inulina foi diluída em água destilada e administrada na dose de 50mg/kg (p.c) por via oral (v.o.) segundo Mauro et al. (2013).

4.1.3 Dietas

Ao primeiro lote de animais foi fornecida ração comercial (RC – Nuvital, Brasil) e água *ad libitum*. Ao segundo lote foi oferecida ração hipoprotéica (RH) e água *ad libitum*. Em ambos os grupos a quantidade de ração administrada foi a mesma. A preparação desta ração foi realizada no Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica (CENUGEN) do Centro Universitário Filadélfia - UniFil.

A formulação da dieta básica regional, descrita por Teodósio et al. (1990) e Ferreira et al. (2005), baseou-se em inquéritos dietéticos que demonstraram (g/100g) a presença de 18,3g de feijão mulatinho, 64,8g de farinha de mandioca, 4,1g de charque e 12,8g de batata doce. Já a composição centesimal indicou 7,8% de proteína, 73,2% de carboidrato, 1,5% de gordura, 7,2% de fibras, 1,3% de cinzas e 9,0% de umidade. Essa dieta foi também escolhida por ser capaz de induzir, em ratos, quadro carencial semelhante ao marasmo de humanos.

Para o preparo da ração, a batata doce, o charque e o feijão foram cozidos, moídos e em seguida misturados à farinha de mandioca. Acrescentou-se água e em seguida a mistura foi pelletizada. Os pellets foram acondicionados em embalagens descartáveis e em freezer (-4°C) e foram descongelados somente no momento do oferecimento da suplementação aos animais.

Em estudo piloto, em camundongos, dados não apresentados, a suplementação com esta dieta apresentou resultados semelhantes àqueles relatados por Ferreira *et al.* (2005) em relação ao desenvolvimento poderal de ratos.

4.2 Animais

Foram utilizados 8 grupos experimentais com 11 animais em cada, sendo estes, camundongos *Swiss* machos em idade reprodutiva, 60 dias, provenientes do Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica – CENUGEN localizado no Centro Universitário Filadélfia – Unifil, Londrina, PR. Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por cepilho. A temperatura e luminosidade foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de luminosidade e 12 horas escuro), com temperatura em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\%\pm 10$. O experimento foi conduzido segundo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Protocolo Número 240/2009).

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram tratados por 120 dias segundo os protocolos de Mauro *et al.* (2013) e Pesarini *et al.* (2013), com modificações, sendo os grupos experimentais descritos a seguir e representados na Figura 1.

Figura 2. Delineamento experimental.



Ração Normoprotéica

Grupo Controle



Grupo DMH



Grupo Inulina



Grupo Associado



Ração Hipoprotéica

Grupo Controle



Grupo DMH



Grupo Inulina



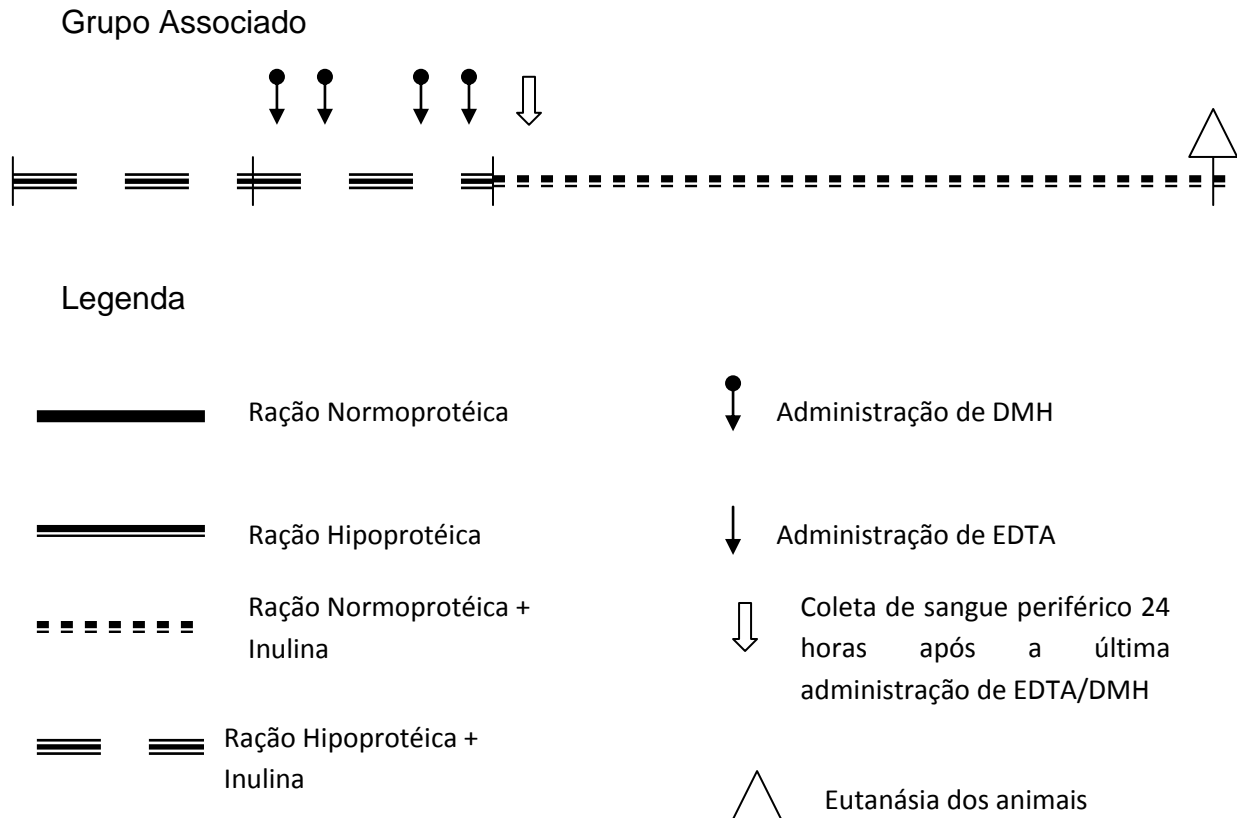


Figura 1. Delineamento experimental

Lote 1- Animais suplementados com ração normoprotéica/comercial (RN):

Grupo Controle Negativo (EDTA RN) - os animais receberam ração comercial durante todo o período de experimentação, na 4ª e 5ª semanas foi administrada a solução de EDTA (0,1ml/10g p.c.,i.p), duas vezes por semana, administrou-se também água destilada (0,1mL/10g p.c, v.o) durante todo o período experimental; Grupo Controle Positivo (DMH RN) - os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anteriormente descrito para o grupo EDTA RN sendo essa solução substituída pela solução de DMH administrada na dose de 20mg/Kg p.c,i.p; Grupo Inulina RN - os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito para o grupo EDTA RN sendo a água destilada substituída pela solução de Inulina administrada na dose de 50mg/Kg p.c., v.o; Grupo Associado RN: os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito para o grupo DMH RN e a água foi substituída pela solução de Inulina administrada na concentração de 50mg/Kg p.c., v.o.

Para avaliação da genotoxicidade a coleta de sangue periférico foi realizada 24 horas após a última administração i.p., seja ela de EDTA ou DMH. Aos 120 dias

de experimentação os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e seus cólons e retos coletados para análise.

Lote 2 – Animais suplementados com ração hipoprotéica (RH):

Os mesmos grupos e protocolos anteriormente descritos foram realizados também para o lote 2. No entanto, a ração normoprotéica/comercial foi substituída pela ração hipoprotéica 28 dias anteriormente à administração das primeiras doses de inulina ou água destilada (v.o.). Os grupos para o Lote 2 foram nominados Controle Negativo (EDTA RH), Controle Positivo (DMH RH), Inulina RH e Associado RH.

Em experimento piloto, dados não apresentados, verificou-se que a suplementação hipoprotéica acima de 40 dias causa morte de 40% dos animais. Frente ao exposto, a presente pesquisa, optou pelo desenvolvimento de um período de depleção de 28 dias (período de suplementação com dieta hipoprotéica) seguido de período de repleção de 92 dias (suplementação com dieta normoprotéica). Assim, os focos de criptas aberrantes foram induzidos, pela administração de 1,2-dimetilhidrazina, quando os animais estavam em estado de desnutrição grave e somente depois os animais voltaram ao consumo da ração normoprotéica/comercial.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (2000) com modificações. Para a montagem das lâminas depositou-se 20,0 µL do sangue periférico, coletado 24 horas após a última administração de DMH ou EDTA, com 120µL de agarose LMP (0,75%), a 37°C, em lâmina previamente coberta com agarose normal (1,5%), sendo estas recobertas por lamínula de vidro e resfriadas a 4°C por 20 minutos. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise, recentemente preparada, composta por 89,0mL de solução de lise estoque (2,5 NaCl, 100,0mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido, 890,0mL de água destilada), 1,0mL de Triton X-100 (Merck) e 10,0mL de DMSO. A lise ocorreu por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em

seguida, as lâminas foram encaminhadas para a cuba de eletroforese com tampão pH>13,0 (300,0mM NaOH e 1,0mM EDTA) a 4°C por 20 minutos para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada a 25,0V e 300,0mA (1,25V/cm). Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCL) durante 3 ciclos de 5 minutos, secas ao ar livre, fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos e armazenadas para posterior análise. Para análise, as lâminas foram coradas com 100,0µL de Brometo de Etídeo (20×10^{-3} mg/ml) e analisadas visualmente em microscópio de fluorescência (Bioval, Modelo L 2000A) no aumento de 40 vezes, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira de 520nm.

Foram analisadas 100 células por tratamento, classificando-se os cometas em: classe 0 - células não danificadas que não apresentam cauda; classe 1 - células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 - células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 - células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentam nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas (Kobayashi et al., 1995). O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão a qual pertenciam pelo valor da classe. A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey ($p<0,05$).

4.4.2 Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes

Após a eutanásia fez-se a coleta do coração, pulmão, fígado, rins para pesagem. Enquanto que a porção final do cólon foi destinada ao ensaio de focos de criptas aberrantes. Para tanto realizou-se uma incisão na face ventral, ao longo da linha média da região púbica, até o processo xifóide. Os músculos do abdômen foram rebatidos lateralmente por meio de incisões na parte proximal e distal. Após localizar o cólon proximal, foi feita uma ligadura com fio de algodão. Após a ligadura, o cólon foi removido, desde a parte proximal até o reto, e lavado com solução salina 0,9% para retirar as fezes. Após a lavagem, o cólon foi aberto longitudinalmente pela borda da inserção mesentérica, distendido sobre placas de isopor e suas extremidades fixadas com alfinetes. As placas foram mergulhadas em cuba contendo solução de formalina 10% tamponada, por no mínimo 24 horas.

No momento da análise, cada segmento do cólon foi corado com Giemsa 10% por 10 minutos e depositado em uma lâmina histológica com a mucosa voltada para cima. A análise foi realizada em microscópio óptico (Microscope DBG®) em aumento de 10 vezes. Toda a mucosa foi avaliada para a identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes. A identificação dos focos de criptas aberrantes foi baseada nos critérios utilizados por Bird (1987): (I) foco constituído de uma única cripta - a cripta aberrante apresenta revestimento por camada epitelial espessa, com abertura luminal elíptica e de tamanho superior (ao menos 2 vezes) aos das criptas normais circunvizinhas; (II) foco com duas ou mais criptas - as criptas aberrantes formam blocos distintos e ocupam uma área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas de morfologia normal. Não há presença de criptas normais separando as criptas aberrantes dentro desses focos.

Para análise estatística dos dados provenientes do teste de focos de criptas aberrantes (o número total de FCA, de criptas aberrantes por focos e a relação cripta/foco), dos diferentes grupos comparados utilizou-se ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

4.4.3 Porcentagem de redução de danos

A porcentagem de redução de danos (%RD) , de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$X = [(Média do Controle Positivo - Média do Grupo Associado) / (Média do Controle Positivo - Média do Controle Negativo)] \times 100$$

5. RESULTADOS

Apesar dos animais terem sido distribuídos nos grupos aleatoriamente, o peso no 1º dia experimental apresentou diferença ($p < 0,05$) sendo maiores as médias dos pesos corporais dos animais dos grupos EDTA RH e DMH RH. No 28º dia experimental, após o período de depleção, os animais suplementados com ração normoprotéica apresentaram pesos semelhantes entre si e distintos dos animais suplementados com a ração hipoprotéica ($p < 0,05$), sendo a menor média atribuída ao grupo tratado com a Inulina. O ganho/perda de peso no período de depleção (1º ao 28º dia experimental) demonstrou que os grupos submetidos à dieta normoprotéica apresentaram ganhos de peso semelhantes. No entanto, o grupo Associado RH apresentou uma tendência à perda de peso. Já os grupos suplementados com a ração hipoprotéica perderam peso de forma semelhante entre si e apresentaram diferenças se comparados com os grupos tratados com ração normoprotéica. No 120º dia experimental, após o período de repleção, o peso final não apresentou diferenças entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) e o mesmo foi observado para o ganho de peso no período de repleção (Tabela 1).

Tabela 1 – Desenvolvimento ponderal relativo ao período de experimentação:

Grupos Experimentais	Peso Inicial – 1º dia experimental (g)	Período de Depleção		Período de Repleção	
		Peso no 28º dia experimental (g)	Ganho de peso 1-28º dia experimental (g)	Peso final – 105º dia experimental	Ganho de peso 28-105º dia experimental
Ração Normoprotéica					
EDTA RN	38,20±5,69 ^a	42,88±5,21 ^a	4,44±7,20 ^a	45,77±5,52 ^a	8,88±8,43 ^a
DMH RN	39,00±5,18 ^a	41,33±5,91 ^a	4,11±7,04 ^a	47,55 ±5,64 ^a	3,6±16,16 ^a
INULINA RN	36,00±3,65 ^a	41,33±6,08 ^a	6,88±8,25 ^a	43,55±4,98 ^a	8,00±6,16 ^a
Associado	39,80±4,66 ^a	37,77±3,93 ^{a,c}	-1,33±3,46 ^{a,b}	41,33±3,87 ^a	1,11±5,01 ^a
Ração Hipoprotéica					
EDTA RH	44,40±2,27 ^b	33,77±2,53 ^{b,c}	-9,55±2,60 ^{b,c}	49,33±4,47 ^b	4,66±4,35 ^a
DMH RH	44,40±6,02 ^b	31,77±5,14 ^{b,c}	-10,66±6,85 ^c	46,22±5,14 ^a	2,88±6,41 ^a
INULINA RH	39,40±4,90 ^a	29,11±3,90 ^b	-7,77±4,05 ^{b,c}	47,77±6,034 ^a	7,33±7,34 ^a
Associado RH	42,00±3,26 ^a	30,88±3,33 ^{b,c}	-7,11±3,88 ^{b,c}	44,88±3,62 ^a	4,88±3,76 ^a

Controle – EDTA 0,1ml/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas; Inulina 50mg/Kg p.c. durante 12 semanas; Associado – DMH 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + Inulina 50mg/Kg p.c.; EDTA RH – ração hipoprotéica durante 28 dias; DMH RH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Inulina – 50mg/Kg p.c. durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Associado RH – DMH 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + inulina 50mg/kg p.c. durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05).

O peso absoluto do pulmão, fígado e rins, e o peso relativo do coração, do pulmão e dos rins não apresentaram diferenças (p > 0,05). O peso absoluto do coração demonstrou maior média (p < 0,05) nos grupos EDTA RH e Inulina RH e o peso relativo do fígado apresentou redução da média (p < 0,05) nos grupos Associado RN e Associado RH (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios \pm erro padrão da média do peso absoluto e relativo de órgãos dos animais ao final do período de experimentação.

Grupos Experimentais	Peso Absoluto de Órgãos (g)			
	Coração	Pulmão	Fígado	Rins
Ração Normoprotéica				
EDTA RN	0,2416 \pm 0,027 ^a	0,2429 \pm 0,610 ^a	2,4085 \pm 0,328 ^a	0,6047 \pm 0,101 ^a
DMH RN	0,2116 \pm 0,217 ^a	0,2475 \pm 0,302 ^a	2,2787 \pm 0,000 ^a	0,6149 \pm 0,139 ^a
INULINA RN	0,2643 \pm 0,058 ^a	0,2656 \pm 0,588 ^a	2,2219 \pm 0,491 ^a	0,7040 \pm 0,098 ^a
Associado	0,2445 \pm 0,557 ^a	0,2390 \pm 0,299 ^a	1,7826 \pm 0,435 ^a	0,5852 \pm 0,103 ^a
Ração Hipoprotéica				
EDTA RH	0,3063 \pm 0,828 ^b	0,3037 \pm 0,400 ^a	2,2233 \pm 0,482 ^a	0,6739 \pm 0,097 ^a
DMH RH	0,3036 \pm 0,828 ^a	0,3509 \pm 0,151 ^a	2,2774 \pm 0,318 ^a	0,7126 \pm 0,153 ^a
INULINA RH	0,3055 \pm 0,812 ^b	0,3100 \pm 0,820 ^a	2,6419 \pm 0,381 ^a	0,6964 \pm 0,158 ^a
Associado RH	0,2468 \pm 0,892 ^a	0,2602 \pm 0,881 ^a	1,9009 \pm 0,324 ^a	0,6089 \pm 0,127 ^a
Peso Relativo de Órgãos				
	Coração	Pulmão	Fígado	Rins
Ração Normoprotéica				
EDTA	0,0065 \pm 0,009 ^a	0,0067 \pm 0,022 ^a	0,0666 \pm 0,317 ^b	0,0167 \pm 0,040 ^a
DMH	0,0055 \pm 0,010 ^a	0,0064 \pm 0,012 ^a	0,0548 \pm 0,062 ^{a,b}	0,0159 \pm 0,028 ^a
INULINA	0,0075 \pm 0,018 ^a	0,0074 \pm 0,016 ^a	0,0625 \pm 0,125 ^{a,b}	0,0200 \pm 0,039 ^a
Associado	0,0061 \pm 0,010 ^a	0,0060 \pm 0,010 ^a	0,0475 \pm 0,099 ^a	0,0146 \pm 0,024 ^a
Ração Hipoprotéica				
EDTA RH	0,0068 \pm 0,019 ^a	0,0068 \pm 0,010 ^a	0,0503 \pm 0,126 ^{a,b}	0,0151 \pm 0,025 ^a
DMH RH	0,0054 \pm 0,010 ^a	0,0077 \pm 0,028 ^a	0,0527 \pm 0,079 ^{a,b}	0,0164 \pm 0,030 ^a
INULINA RH	0,0075 \pm 0,016 ^a	0,0077 \pm 0,023 ^a	0,0656 \pm 0,095 ^b	0,0174 \pm 0,043 ^a
Associado RH	0,0062 \pm 0,024 ^a	0,0065 \pm 0,024 ^a	0,0481 \pm 0,111 ^a	0,0154 \pm 0,041 ^a

Controle – EDTA 0,1ml/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas; Inulina 50mg/Kg p.c. durante 12 semanas; Associado – DMH 20mg/Kg, p.c durante 2 semanas + Inulina 50mg/Kg p.c.; EDTA RH – ração hipoprotéica durante 28 dias; DMH RH – controle positivo(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c durante 2 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Inulina – 50mg/Kg p.c durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Associado RH – DMH 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + inulina 50mg/kg p.c. durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

As frequências de células com dano no DNA no ensaio do cometa, nos grupos suplementados com ração normoprotéica, indicam que a Inulina é genotóxica, mas também possui atividade antígenotóxica com porcentagem de redução de danos de 44,59%. A administração de DMH e Inulina aumentaram ($p < 0,05$) a frequência de lesões genômicas na ordem de 95,44 e 53,33x, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios \pm erro padrão da média da frequência de células com lesão de DNA, distribuição entre classe de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade da inulina em animais submetidos à ração normoprotéica e hipoprotéica no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos machos.

Grupos Experimentais	Células com lesão de DNA	Classes de danos				Escore
		Classe 0	Classe1	Classe 2	Classe 3	
Ração Normoprotéica						
Genotoxicidade						
EDTA	1,00 \pm 1,80 ^a	99,88 \pm 0,33	0,11 \pm 9,00	0,11 \pm 0,33	0,00 \pm 0,00	0,11 \pm 0,33 ^d
DMH	95,44 \pm 4,79 ^d	3,77 \pm 3,86	14,33 \pm 8,86	37,55 \pm 9,81	43,55 \pm 5,63	220,11 \pm 20,63 ^a
INULINA	53,33 \pm 8,07 ^b	46,66 \pm 8,07	19,77 \pm 3,03	19,11 \pm 4,83	14,44 \pm 4,24	101,33 \pm 17,64 ^b
Antigenotoxicidade						
Associado	71,22 \pm 5,95 ^c	26,11 \pm 6,93	29,11 \pm 4,10	20,66 \pm 5,19	22,11 \pm 6,00	139,66 \pm 18,80 ^c
Ração Hipoprotéica						
Genotoxicidade						
EDTA RH	63,88 \pm 6,58 ^{b,c}	36 \pm 6,53	26,44 \pm 5,91	19,55 \pm 4,72	17,88 \pm 4,19	125,33 \pm 16,45 ^{b,c}
DMH RH	58,22 \pm 6,94 ^{b,c}	41,77 \pm 3,34	23,11 \pm 7,80	19,77 \pm 4,73	15,33 \pm 4,47	108,66 \pm 14,48 ^b
INULINA RH	53,33 \pm 3,74 ^b	44,55 \pm 3,34	19,55 \pm 4,06	16,33 \pm 3,08	20,11 \pm 2,08	110,55 \pm 7,33 ^b
Antigenotoxicidade						
Associado RH	58,44 \pm 3,74 ^{b,c}	41,77 \pm 3,34	22,88 \pm 3,29	18,44 \pm 2,35	15,00 \pm 6,10	108,88 \pm 6,71 ^b

Controle – EDTA 0,1MI/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas; Inulina 50mg/Kg p.c. durante 12 semanas; Associado – DMH 20mg/Kg, p.c durante 2 semanas + Inulina 50mg/Kg p.c.; EDTA RH – ração hipoprotéica durante 28 dias; DMH RH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c durante 2 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Inulina – 50mg/Kg p.c durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Associado RH – DMH 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + inulina 50mg/kg p.c. durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Na Tabela 3 observa-se também que animais submetidos à dieta hipoprotéica (EDTA RH, DMH RH, Inulina RH e Associado RH) possuem frequências de lesões no DNA semelhantes entre si ($p > 0,05$) e superiores ao grupo EDTA RN ($p < 0,05$). Logo, a condição de desnutrição (EDTA RH) elevou em 63,88% os níveis de lesão no DNA. Nessa condição os níveis de lesões causadas pela DMH (grupo DMH RH) não foram diferentes daqueles apresentados pelos demais grupos submetidos ao período de depleção ($p > 0,05$), mas demonstrou diferença em relação ao grupo DMH RN. A Inulina apresentou o mesmo nível de danos no DNA que os demais grupos submetidos à dieta hipoprotéica e semelhante também ao grupo Inulina RN. O grupo Associado RH apresentou uma baixa porcentagem de redução (3,89%).

Os grupos controles negativos (EDTA RN e EDTA RH) e Inulina (Inulina RN e Inulina RH) não apresentaram nenhum foco de cripta aberrante o que os faz serem diferentes estatisticamente de todos os outros grupos experimentais onde hoje a incidência de focos. Os controles positivos DMH RN e DMH RH apresentaram uma média de $5,1 \pm 2,69$ e $8,1 \pm 1,90$, respectivamente sendo observado um aumento da ordem de 1,59x em função do estado nutricional. As porcentagens de redução de danos foi da ordem de 47,05 e 59,25% para os grupos Associado RN e Associado RH, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Número, distribuição e redução de danos de focos de criptas aberrantes (FCA) no colón de camundongos tratados com inulina e submetido com ração normoprotéica e hipoprotéica:

Tratamento	Total de FCA		%RD	Total de CA	Valores absolutos de CA/Foco				Relação de CA/Focos
	Valores absolutos	Valores médios \pm DP			1CA/Foco	2CA/Foco	3CA/Foco	4CA/Foco	
Normoproteica									
Controle	0,00	0 ^a	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DMH	51	5,1 \pm 2,69 ^c	-	82	21	20	9	1	1,60
Inulina	0,00	0 ^a	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Anticarcinogenicidade									
Associado	27	2,7 \pm 1,06 ^b	47,05%	50	13	4	5	3	1,85
Hipoproteica									
Controle RH	0,00	0 ^a	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DMH RH	81	8,1 \pm 1,90 ^d	-	83	15	25	19	11	1,02
Inulina RH	0,00	0 ^a	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Anticarcinogenicidade									
Associado RH	33	3,3 \pm 1,42 ^c	59,25%	166	32	13	4	2	5,03

Controle – EDTA 0,1MI/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg, p.c. durante 2 semanas; Inulina 50mg/Kg p.c. durante 12 semanas; Associado – DMH 20mg/Kg,p.c durante 2 semanas + Inulina 50mg/Kg p.c.; EDTA RH – ração hipoprotéica durante 28 dias; DMH RH – controle positivo-(1,2dimetilhidrazina) 20mg/Kg,p.c durante 2 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Inulina – 50mg/Kg p.c durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias; Associado RH – DMH 20mg/Kg,p.c. durante 2 semanas + inulina 50mg/kg p.c. durante 12 semanas + ração hipoprotéica durante 28 dias. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Revisões a cerca do binômio desnutrição-câncer relacionam-se em geral à caquexia que se caracteriza pela perda de peso progressiva, anorexia, astenia, anemia, náuseas crônicas e imunossupressão sendo responsável por um elevado número de mortes em pacientes com câncer em estadiamento avançado. Logo, clinicamente essa síndrome destaca-se pela relação inversamente proporcional entre o grau de caquexia e a sobrevivência do paciente oncológico além de implicar em prognóstico desfavorável, diminuição de respostas adequadas às terapias e da qualidade de vida (Argilés et al., 2006).

Poucos são os estudos sobre os efeitos da desnutrição protéico-calórica e o desenvolvimento do câncer e nenhum estudo foi encontrado sobre a suplementação da inulina na carcinogênese química em estado carencial. Logo esse trabalho demonstra pioneirismo e ineditismo.

Segundo Monteiro (2003), a desnutrição se faz pela deficiência crônica de um ou mais nutriente na alimentação visto que para o crescimento e manutenção corporal são necessárias condições adequadas de ingestão e utilização biológica de calorias e proteínas (Hoffmann, 1995). A instalação da desnutrição associa-se ao desenvolvimento de outras tais como infecções, imunossupressão, diabetes, hipertensão e obesidade, por exemplo. Estudos ainda relatam que a desnutrição durante períodos críticos e específicos do desenvolvimento acarreta efeitos duradouros e/ou persistentes que podem ser nominados de *imprinting* metabólico (Waterland e Giza, 1999; Sawaya, 2006). Estudos ainda relatam que a programação nutricional (Wells, 2003), no desenvolvimento embrio-fetal (programação fetal) pode acarretar predisposição para o desenvolvimento de doenças na vida adulta ou refletir em adaptações irreversíveis que acarretam funcionamento inadequado de um órgão (Langley-Evans, 2004) ou até mesmo a diminuição da longevidade (Lucas, 1991).

No presente estudo, as fêmeas e machos acasalados e em seguida, as fêmeas durante os períodos de gestação, lactação e desenvolvimento das proles, possuíam acesso livre à água e ração comercial (*ad libitum*), bem como

os filhotes, o que permite inferir que se desenvolveram em condições ótimas de disponibilidade de alimentos e utilização biológica das calorias e das proteínas. Em seguida, os animais suplementados com ração hipoprotéica, pelo período de depleção, apresentaram perda de peso significativa o que valida a experimentação e comprova que a ração hipoprotéica quando suplementada por um período de 28 dias é suficiente para promover o quadro carencial nos animais como citado por Teodósio et al. (1990) e Ferreira et al. (2005). Destaca-se ainda que no período de repleção, ou seja, quando a RH foi substituída pela RN, os animais depletados tiveram um ganho de peso rápido e ao final do experimento não mais havia indícios de animais com baixo peso e/ou em estado carencial. No entanto, em relação ao peso relativo do fígado pode-se observar uma tendência na redução do peso de todos os animais exceto no grupo Inulina RH e uma redução estatisticamente significativa nos grupos Associado RN e Associado RH.

Ao se analisar a frequência de lesões genômicas (ensaio do cometa) e lesões pré-neoplásicas (ensaio de focos de criptas aberrantes) é possível observar que o estado de desnutrição aumentou em 63,88x a frequência de lesões no DNA (grupo EDTA RH). No entanto, não se correlacionou ao aparecimento do biomarcador para o câncer.

A relação entre a desnutrição e os danos no DNA já foi relatada e dentre os danos indica-se as aberrações cromossômicas (Vijayalaxmi, 1975; Alu; Murthy, 1993), o aumento da frequência da troca entre cromátides-irmãs (Murthy; Srikantia, 1981; Betancourt; Balvanera; Ortiz, 1986), os micronúcleos (Ortiz et al., 1995) e os cometas (Cortés et al., 2001). No entanto, outros estudos não correlacionam à desnutrição e o aumento de danos genéticos sejam eles genotóxicos e/ou mutagênicos (Betancourt et al., 1995; Celik et al., 2012).

Para explicar o aumento da genotoxicidade observada nesse experimento pode-se inferir que: (I) a falta de nutrientes pode levar a uma inadequada síntese de proteínas relacionadas ao ciclo celular, à manutenção da integridade e do reparo do DNA; (II) células de organismos desnutridos não conseguem manter o reparo de danos no DNA que são considerados basais; e

(III) a desnutrição levaria a falta de enzimas que impedem processos oxidativos e a geração de radicais livres (Webster; Grawde; Bhattacharya, 1996; Cortés et al., 2001).

Estudos também relatam que a restrição protéico-calórica diminui a atividade da glutathione peroxidase (Thurman, 1990; Albrecht; Pélissier, 1995; Cortés et al., 2001), da enzima antioxidante glutathione redutase e da glicose-6-fosfato desidrogenase (Becher et al, 1995; Cortés et al, 2001) além de redução sérica de vitamina E e glutathione, dois importantes antioxidantes (Albrecht; Pélissier, 1995; Becher et al, 1995; Cortés et al, 2001).

Evidências epidemiológicas ainda sugerem que dietas ricas em verduras e frutas associam-se à diminuição da incidência de câncer/danos genéticos, e que na ausência dos efeitos de proteção advindos destas dietas poderá haver a uma exacerbação dos efeitos de xenobióticos que poderiam relacionar-se ao desenvolvimento da carcinogênese. Verifica-se então que uma dieta desequilibrada, que deixa de oferecer os agentes quimiopreventivos, por si só já estará indiretamente contribuindo para a maior ocorrência de iniciação e desenvolvimento do câncer (IARC,1997; Lutz, 1999) fato que também pode ser considerado para o quadro carencial na desnutrição protéico-calórica.

A ausência de focos de criptas aberrantes no grupo EDTA RH, mesmo frente à alta frequência de danos no DNA, detectados pelo ensaio do cometa, sugerem que essas lesões não estão diretamente correlacionadas ao processo de iniciação do tumor de intestino. Corrobora essa afirmativa o fato da DMH possuir maior eficácia na indução de focos de criptas aberrantes no grupo DMH RH, mesmo sem causar aumento estatisticamente significativo da frequência de cometas, visto que esse grupo desenvolveu 1,59x mais focos que o grupo DMH RN.

A DMH é um importante agente cancerígeno e a sua classificação de risco segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) é 2^a (Brasil, 2012). No entanto, esse composto é um forte promotor e um fraco iniciador da carcinogênese. Esse é um agente indireto, ou seja, necessita de enzimas para convertê-lo em espécies eletrofílicas que se ligarão ao DNA

(Newell; Heddle, 2004; Tanaka, 2009) para promover a formação de adutos de grupos metila, mutações de ponto e troca entre cromátides irmãs (Newell & Heddle, 2004) que podem então ser avaliadas pelo ensaio do cometa na versão alcalina $\text{pH} > 13$, como realizado nesse estudo, que detecta danos diretos do tipo quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, *crosslinks* e sítios de reparo por excisão; e danos indiretos como lesões por metilação e adutos, que sendo álcali-lábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino (Singh et al, 2000; Tice et al, 2000; Vieira et al In press; Hermeto et al, In press).

A administração da inulina tanto em animais saudáveis (Inulina RN) quanto em animais desnutridos (Inulina RH) demonstram 47 frequência 47 semelhantes de lesões no DNA e nenhum dos dois grupos experimentais apresentaram o desenvolvimento de biomarcadores para o câncer intestinal. Essa atividade genotóxica e a não indução de focos de criptas aberrantes já foram relatadas na literatura por Mauro et al. (2013). Segundo esses autores, tais danos genotóxicos são passíveis de reparo e por isso a frequência de biomarcadores para tumores nem sempre será correspondente às frequência de cometas. Essa possibilidade de reparo e a não correspondência também é citada por Salvadori et al. (2003) e Oliveira et al. (2007).

No ensaio de antigenotoxicidade, a Inulina apresentou porcentagens de redução de danos da ordem de 25,64 e 3,87% para os protocolos com RN e RH, respectivamente. Essa mesma dose foi testada por Mauro et al. (2003), em animais tratados com ração normoprotéica, e as porcentagens de redução de danos foram da ordem de 1,02, 9,97, -0,55 e 3,92% para os protocolos de pré-tratamento, simultâneo, pós-tratamento e pré+contínuo, respectivamente. Logo ambos os estudos sugerem que a atividade antigenotóxica da inulina seja pouco expressiva. No entanto, esse composto apresenta uma atividade antimutagênica que deva ser considerada com porcentagens de redução de danos que podem variar de 77,46 a 141,75% após 48 horas da administração da última dose de DMH (Mauro et al, 2013). As porcentagens de redução de danos quando ultrapassam 100% indicam inclusive a prevenção de danos clastogênicos e/ou aneugênicos basais. Relatos dessa natureza também foram observados para o sacarídeo β -glucana em experimentos *in vivo* e *in vitro* e em

diversos protocolos (Oliveira et al, 2006; Primo et al, 2010; Silva et al, 2013; Oliveira et al., 2014).

Em relação à anticarcinogenicidade observaram-se porcentagens de redução de danos da ordem de 47,05 e 59,25% para os protocolos com RN e RH, respectivamente. No estudo de Mauro et al. (2013) as porcentagens de redução de danos foram de 69,12, 87,56, 55,78 e 72,89% para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo, pós-tratamento e pré+contínuo, respectivamente. Esses resultados, associados aos resultados de micronúcleo sugerem que a Inulina possa agir tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese e, portanto, a presente pesquisa se valendo desse conhecimento utilizou um protocolo que somasse esses dois modos de ação o que justifica a inulina ter sido oferecida antes, durante e após as administrações da DMH. Além disso, a mesma era parte da composição tanto da ração normoprotéica quanto da ração hipoprotéica. Entre os dois protocolos, suplementação com RN e RH, houve uma diferença de 12,2 pontos percentuais para a redução na incidência de focos de criptas aberrantes. Logo, os resultados sugerem que a inulina tenha maior capacidade de prevenir o desenvolvimento de tumores em animais desnutridos.

A administração do pró-carcinógeno DMH, com repetidas exposições da mucosa intestinal, provoca lesões, estimula a proliferação celular seguida de hiperplasia de criptas aberrantes e hipertrofia da mucosa ocasionando os focos de criptas aberrantes que mais tarde pode se desenvolver em adenoma (Wiebecke et al, 1973; Richards, 1977; Krutovskikh; Turosov, 1994; Mauro et al., 2013). No entanto, para que a DMH seja convertida a um agente cancerígeno a mesma deverá ser metabolizada no fígado. Primeiramente a DMH será oxidada em azometano e posteriormente à azoximetano e então hidroxilado enzimaticamente tornando-se o metilazoximetanol (Weisburger, 1971; Fiala, 1975; Lamont; O’Gorman, 1978).

O metilazoximetanol por sua vez possui três destinos sendo que (I) o mesmo pode se decompor, em temperatura corporal, em formaldeído, água, nitrogênio e metildiazônio que é um potente agente alquilante (Weisburger, 1971; Nagasawa et al, 1972); ou (II) sofrer metabolização pela enzima álcool

desidrogenase sendo convertido em metilazoxiformaldeído no fígado, cólon e em menor capacidade no jejuno e íleo (Grab; Zedek, 1977); ou ainda (III) ser conjugado, no fígado, com ácido β -glicurônico e levado à luz intestinal onde a microflora intestinal produzirá a enzima β -glicuronidase que liberará o metabólico carcinogênico da DMH (Lamont; O’Gorman, 1978).

Até o presente momento considera-se que a capacidade metabolizadora dos animais desnutridos é menos eficaz. Logo é possível sugerir que a maior porcentagem de redução de danos da Inulina no grupo desnutrido não se deva somente à ação deste frutoligossacarídeo, mas sim a uma menor capacidade de ativação da DMH. Destaca-se ainda que a desnutrição protéico-calórica pode associar-se à atrofia das vilosidades intestinais bem como com o desequilíbrio da microbiota intestinal (Morais; Neto, 2003) esse fato determinaria ainda uma menor capacidade de ativação da DMH no intestino em função da menor disponibilidade de β -glicuronidase uma vez que essa enzima é produzida por bactérias no intestino.

Outro fato a ser mencionado é que a inulina é metabolizada preferencialmente por bifidobactérias no intestino de humanos e de roedores. Essas bactérias não são produtoras, ou produzem pouca, de β -glicuronidase e, portanto, há uma menor possibilidade de liberação de xenobióticos carcinogênicos. Logo, a ingestão de inulina exerce a sua atividade anticarcinogênica de forma indireta, ou seja, permite a colonização do intestino por bifidobactérias que competem com outras bactérias que são capazes de aumentar a produção de enzimas não desejáveis (Haully; Moscatto, 2002; Pool-Zobel et al., 2002; Mauro et al, 2013). Destaca-se ainda que essas bactérias podem produzir ácido láctico e diminuir o pH do bolo fecal e do intestino. Essa redução de pH funciona como bactericida para as bactérias putrefativas e auxilia na redução da absorção de amônia, dois eventos envolvidos no aumento da carcinogenicidade intestinal. Em função do equilíbrio da flora intestinal, sugere-se também que essas ações ocorram preferencialmente no grupo que recebeu a RN.

Dentre as propriedades anticancerígenas da inulina ainda destacam-se: (I) a modulação do processo de apoptose por meio por meio da produção de

ácidos graxos de cadeia curta, e especificamente do butirado, que são produzidos a partir da metabolização da inulina por bactérias; (II) proteção e reparo da mucosa intestinal do cólon que contribuem para a redução de doenças intestinais por meio da ação de ácidos graxos de cadeia curta (Reddy, 1999; Cherbut, 2002; Roberfroid, 2005); (III) aumento da capacidade de detoxificação do fígado pela maior produção de de glutathione S-transferase e glucoroniltransferase que são enzimas metabolizadoras de xenobióticos (Roland et al., 1994^a, 1994b, 1995, 1996); (IV) característica de fibra dietética (pré-biótica) com capacidade adsortiva de agentes capazes de causar danos no DNA; (V) capacidade de formar microcristais de alta capacidade adsortiva que facilita a eliminação de xenobióticos (Niness, 1999).

Frente ao exposto considera-se que o estado de desnutrição relaciona-se ao aumento da frequência de lesões genômicas, mas não predispõe ao desenvolvimento do câncer colorretal. A inulina apresenta atividade genotóxica, que precisa ser melhor compreendida, e possui uma baixa atividade antigenotóxica. Além disso, possui uma importante capacidade de reduzir os biomarcadores para a carcinogênese intestinal tanto em animais em estado de desnutrição ou saudáveis. Esses dados sugerem potencial terapêutico, sendo a inulina uma forte candidata a compor o grupo de alimentos funcionais utilizado na prevenção do câncer tanto de pessoas com adequada nutrição quanto em pessoas em quadros de desnutrição.

7. CONCLUSÃO

- O estado de desnutrição relaciona-se ao aumento da frequência de lesões genômicas, mas não predispõe ao desenvolvimento do câncer colorretal;
- A inulina apresenta atividade genotóxica, que precisa ser melhor compreendida;
- Possui uma baixa atividade antígeno-tóxica;
- Possui importante capacidade de reduzir os biomarcadores para carcinogênese intestinal tanto em animais em estado de carência nutricional ou saudáveis.

REFERÊNCIAS

Agarwal D, Chakravarty J, Sundar S, Gupta V, BhatiaBD. Correlation between clinical features and degree of immunosuppression in HIV infected children. *Indian Pediatr.* v.45, p.140-143, 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos funcionais (2006). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>> Acesso em: 22 de out. 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos funcionais, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 jul 2014.

Albrecht R, Pélissier MA. About the oxidative stress status in children with kwashiorkor. *Food. Chem. Toxicol.* 33: 1081–1083.1995.

Alu V and Murthy PB. Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats and in utero upon rehabilitation. *Experientia* 49: 258–262.1993.

Anderson D, Plewa MJ. The international comet assay workshop. *Mutagenesis*, v.13, p.67-73, 1998.

Anderson D, Yu TW, Mc-Gregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, v.13, p.539-555, 1998.

Argilés JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Figueras M. Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutr. Hosp.* 21: 4-9.2006

Becker K, Leichsenring M, Gana L, Bremer HJ, et al. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: results of study in Nigeria. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 257–263.1995.

Bedi KS, Warren MA. The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fibre number and size-frequency distribution. *J. Comp. Neurol.*, v.219, p.125-132, 1983.

Betancourt M, Balvanera P, Ortiz R. Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutat. Res.* 175: 29–31.1986

Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, et al. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.*331: 65–77.1995

Bird RP. Observation and qualification of aberrant crypt in the murine colon treated with a colon carcinogenic: Preliminary findings. *Cancer Lett.*, v.37, p.147-151, 1987.

Blsck RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*, v.361, p.2226-2234, 2003.

Bondt V. Novas Tendências para bebidas funcionais. *Rev. Brasil Alim.* v.18, p.26- 27, 2003.

Borges VC. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L.. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 96, p. 1495-1509.2001.

Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/diretrizes_vigilancia_cancer_trabalho.pdf>. Acessado em: 09 jul. 2014. 2012

Burns AJ, Rowland IR. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* 551: 233-243.2004

Camargo JLV, Oliveira MLC, Rocha NS, Ito NA. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. *Rev. Bras. Cancerol.*, v.40, p.21-30, 1994.

Carvalho AT, Almeida ER, Nilson EAF, Ubarana JÁ, Coutinho JG, Vianna RPT, Lima FEL. Situação nutricional de crianças menores de cinco anos em municípios do nordeste brasileiro. *J. Hum. Growth Dev.*, v. 24, p.221-227, 2014.

Celik M, Sermatov K, Abuhandan M, Kocyigit DZA et al. Oxidative status and DNA damage in children with marasmic malnutrition. *J. Clin. Lab. Anal.* 26: 161-166.2012

Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br. J. Nutr.* 2: S159-S162.2002

Cherbut C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.S159-S162, 2002.

Chong VH. Hepatobiliary tuberculosis: a review of presentations and outcomes. Conboy VB, Santer RM, Swift GL. Effects of prenatal undernutrition on prevertebral sympathetic neurons in the rat: a morphological and fluorescence histochemical study. *J. Anat.*, v.154, p.47053, 1987.

Conradi G, Sjöström A, Karlsson B, Sourander P. Functional development of the visual system in normal and protein deprived rats. II. Morphometric and biochemical studies on adult optic nerve. *Acta Physiol. Scand.*, v.125, p.277-283, 1985.

Cornblath DR, Brown MJ. Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves. *Experim. Neurol.*, v.99, p.403-411, 1988.

Cortés E, González C, Betancourt M, Ortiz R. Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21: 231-247.2001

De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.*, v. 402, p. 151-158, 1998.

De flora, S, Ferguson, LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*, v.591, p.8-15, 2005.

Deschner EE. Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon. *Z. Krebsforsch.*, v.91, p.205-216, 1978.

Dias MC. Influência do extrato de *Ginkgo biloba* sobre o desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas induzidas pela dietilnitrosamina (den) em ratos *Wistar* machos. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências de Botucatu. 2007.

Diehl D, Oesterle D, Elmlinger MW, Heoflich A, Wolf E, Lahm H. IGF-II transgenic mice display increased aberrant colon crypt multiplicity and tumor volume after 1,2-dimethylhydrazine treatment. *J. Carcinog.*, v.5, 2006.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* v. 339, p. 37-59, 1995.

Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.*, v. 307, p. 395-410, 1994.

Ferrari CKB, Torres EA. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. *Rev. Bras. Canc.*, v. 48, p. 375-382, 2002.

Ferrari CKB. Oxidative stress pathophysiology searching for an effective antioxidant protection. *Int. Med. J.*, v. 8, p. 175-184, 2001.

Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, et al. Efetividade da “multimistura” como suplemento de dietas deficientes em vitaminas e/ou minerais na recuperação ponderal de ratos submetidos à desnutrição pós-natal. *Rev. Nutr.* 18: 63–74.2005.

Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, Moura FA. Efetividade da “multimistura” como suplemento de dietas deficientes em vitaminas e/ou minerais na recuperação ponderal de ratos submetidos à desnutrição pós-natal. *Rev. Nutr.*, v.18, p.63–74, 2005.

Ferreira HS, Cesar JA, Assunção ML, Horta, BL. Time trends (1992-2005) in undernutrition and obesity among children under five years of age in Alagoas State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 29: 793-800.2013.

Fiala ES. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer* 36:2407-2412.1975.

Fiala ES. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer*, v.36, p.2407-2412, 1975.

Flagg EW, Coates RJ, Greenberg RS. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 14, p. 419-427, 1995.

Frieauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.

Gibson GR, Macfarlane GT. (Eds.). Human colonic bacteria. Role in physiology, pathology and nutrition. Boca Raton: CRC Press, 1995.

Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofrutose and inulin. *J. Nutr.* v. 129, p. 1438-1441, 1999.

Gomes EM, Soutot PRF, Felzenszwalb I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutat. Res.* v. 367, p. 203-208, 1996.

Grab DJ, Zedek MS. Organ-specific effects of the carcinogen methylazoxymethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent dehydrogenases. *Cancer Res.* 37: 182-189.1977

Grüter A, Friederich U, Würzler FE. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutat. Res.*, v. 231, p. 243-249, 1990.

Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. *Envir. Molec. Mutagenesis*, v. 15, p. 145-182, 1990.

Haully MC, Moscatto JA. Inulin and oligofructions: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Tech. Ex.*, v.23, p.105-118, 2002.

Haully MCO and Moscatto JA. Inulin and oligofructions: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Cienc. Exatas Technol.* 23: 105-118.2002

Hedley-White ET, Meuser CS. The effect of undernutrition on myelination of rat sciatic nerve. *Lab. Invest.*, v.24, p.156-161, 1971.

Hedley-White ET. Myelination of rat sciatic nerve: comparison of undernutrition and cholesterol biosynthesis inhibition. *J. Neuropathol. Experim. Neurol.*, v.32, p.284-302, 1973.

Hoffmann R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estud. Av.* 9: 159-172.1995

Hoffmann R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estud. Av.*, v.9, p.159-172, 1995.

Ishii PL, Prado CK, Mauro MO, Carreira CM, Mantovani MS, Ribeiro LR, Dichi JB, Oliveira RJ. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.59, p.412-422, 2011.

Ishii PL, Prado CK, Mauro MO, Carreira CM et al. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 59: 412-422.2011

Kada T, Shimoi K. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. *Bio Essays*, v. 7, p. 113-115, 1987.

Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosc.* 27: 703-714.2002

Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J.Biosc.*, v.27, p.703-714, 2002.

Keiji U, Ishiguro Y, Yoshida M, Onoreda S, Shiomi N. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chem. Cent. J.*, v.5, p.1-9, 2011.

Kellof GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J. Cell Biochem.*, v.20, p1-24, 1994.

Kennedy N, Ramsay A, Uiso L, Gutmann J, Ngowi FI, Gillespie SH. Nutritional status and weight gain in patients with pulmonary tuberculosis in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.90, p.162-166, 1996.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, v. 363, p. 89-96, 1996.

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, et al. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3: 103-115.1995

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni TA. comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, v. 3, p. 103-115, 1995.

Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.S193-S197, 2002.

Krutovskikh VA, Turosov VS. Tumor of intestines. In: Turosov VS, Morh U (Eds). *Pathology of tumors in laboratory animals*. 2nd ed., Lyon:Yarc, V II, p.195-211, 1994.

Krutovskikh VA, Turosov VS. Tumors of intestines. In: TUROSOV, V.S.; MOHR, U. (Eds.). *Pathology of tumors in laboratory animals*. 2nd ed., Lyon: Yarc, v.II, p.195-211, 1994.

Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Res.*, v. 436, p. 69-97, 1999.

Lamont JT and O'Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterol.* 75: 1157-1169.2011

Lamont JT, O'gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterol.*, v.75, p.1157-1169, 1978.

Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult disease: Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. *CABI Publishing*, UK.2004

Lima JMDX and Navarro AC. Sistema de vigilância alimentar e nutricional em crianças de Minas Gerais, Brasil: histórico, cobertura e estado nutricional. *Rev. Bras. Obes. Nutr. Emag.* 8: 55-64.2014

Lippman SM, Lee JS, Lotan R, Hottelman W, Wargovich MJ, Hong WK. Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. *J. Nat. Cancer. Inst.*, v.82, p.555-560, 1990.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. (1991) *Ciba Found Symp* 156: 38-50.1991

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.*, v.156, p.38-50, 1991.

Lutz KW. Carcinogens in the diet vs. overnutrition Individual dietary habits, malnutrition, and genetic susceptibility modify carcinogenic potency and cancer risk. *Mutat. Res.* 443: 251–258.1999

ManoharanK and BanerjeeMR. Beta-carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* 9: 783-789.1985

Mauro MO, MONREAL MTFD, SILVA MTP, PESARINI JR et al. Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet. Mol. Res.* 12: 2281-2293.2013

Mauro MO, Pesarini JR, Marin-Morales MA, Monreal MTFD, Monreal ACD, Mantovani MS, Oliveira RJ. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genet. Mol. Res.*, v. 13, p. 4808-4819, 2014.

Mauro, M.O.; Monreal MTFD, Silva MTP, Pesarini .R.; Mantovani MS, Ribeiro LR, Dichi JB, Carreira CM, Oliveira RJ. Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet. Mol. Res.*, v. 12, p. 2281-2293, 2013.

MC Lellan EA, Medline A, Bird RP. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis*, v.12, p.2093-2098, 1991.

Milner JA. Functional foods and health promotion. *J. Nutr.*, v. 129, p. 1395-1397, 1999.

Monteiro CA, Benicio MHDA, Konno SC, Silva ACF, et al. Causes for the decline in child undernutrition in Brazil, 1996-2007. *Rev. Saude Publica* 43: 35-43.2009

Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. *Estud. Av.* 17: 7-20.2003

Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. *Estud. Av.*, v.17, p.7-20, 2003.

Morais MB, Neto UF. Enteropatia ambiental. *Estud. Av.* 48: 137-148.

Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* v. 173, p. 279-86, 2005.

Murthy PB and Srikantia P (1981). SCE frequency in malnourished mice. *Metabolism* 30:1–2.2003

Nagasawa HT, Shirota FN, Matsumoto H. Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin in H₂O. *Nature* 236: 234-235.1972

Nagawasa HT, Shirota FN, Matsumoto TOH. Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin in H₂O. *Nature*, v.236, p.234-235, 1972.

Newell LE and Heddle JA. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mut. Res.* 564: 1-7.204

Niness KR. Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129: 1402-1406.1999

Oldfords A, Persson M. Peripheral nerve fibre degeneration in protein-deprived Young rats. An ultrastructural study. *Acta. Neuropathol.*, v.57, p.1-6, 1982.

Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Exper. Cell Res.*, v. 198, p. 259-267, 1992.

Oliveira RJ, Matsuo R, Da Silva AF, Matiazi HJ, Mantovani MS, Ribeiro LR. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol. in Vitro*, v. 21, p. 41-52, 2007.

Oliveira RJ, Matsuo R, Da Silva AF, Matiazi HJ, Mantovani MS. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol. in Vitro*, v. 20, p. 1225-1233, 2006.

Oliveira RJ, Matuo R, Silva AF, Matiazi HJ, et al. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol. In Vitro* 21: 41-52.2007

Oliveira RJ, Pesarini JR, Salles MJS, Kanno, TYN, et al. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. *Genet. Mol. Biol.* 37: 111-119.2014

Oliveira RJ, Ribeiro LR, Silva, AF, Matuo R, et al. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol. In Vitro* 20: 1225-1233.2006

Oliveira VM, Aldrighi JM, Rinaldi JF. Quimioprevenção do câncer de mama. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.52, p.453-459, 2006.

Onis M, Borghi MB, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. *Public Health Nutr.* 15: 142-148.2011

Ortiz R, Cortés E, González C, Pérez L, et al. Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 55–59.1995

Pelletier DL, Frongillo Jr EA, Schroeder DG, Habicht JP. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J. Nutr.*, v.124, p.2106S-2122S, 1994.

Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. *J Gastrointest Oncol.* December; 4(4): 409–423.2013

Pesarini JR, Zaninetti PT, Mauro M.O, Carreira CM, Dichi JB, Ribeiro LR, Mantovani MS, Oliveira RJ. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet. Mol. Res.*, v. 12, p. 1646-1659, 2013.

Pesarini JR, Zaninetti PT, Mauro MO, Carreira CM, et al. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet. Mol. Res.* 12: 1646-1659.2013

Pool-Zobel B, van Loo J, Rowland I and Roberfroid MB. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br. J. Nutr.* 87 (Suppl 2): S273-S281.2002

Pool-Zobel B, Van Loo J, Rowland I, Roberfroid MB. Experimental evidences in the potential if prebiotic fructans ti reduce the risk of colon cancer. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.S273-S281, 2002.

Pool-Zobel B. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental ans human data. *Br. J. Nutr.* 93: S73-S90.2005

Primo MS, Calliari CM, Castro-Goméz RJH, Mauro MO, et al. Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade de um biopolímero extraído do microrganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss. *Rev. Bras. Farmacog.* 20: 340-347.2010

Rana SV, Chopra JS, Mehta S, Chand UK, Sharma U. Electrophysiological and histopathological changes in peripheral nerves of postnatally undernourished and rehabilitated young rhesus monkeys. *Ind. J. Experim. Biol.*, v.29, p.385-390, 1991.

Reddy B. Possible mechanisms by wich pro and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.*, v.129, p.1478S-1482S, 1999.

Reddy BS. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.* 129: 1478S-1482S.1999

Ribas G, Frenzilli G, Barale R, Marcos R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat. Res.*, v. 344, p. 41-54, 1995.

Ribeiro CCC, Silva MCB, Machado CMP, Ribeiro MRC, et al. A gravidade da cárie está associada à desnutrição protéico-calórica em pré-escolares? *Ciênc. saúde coletiva* 19: 957-965.2014

Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ.* v.78, p.1207-1221, 2000.

Richards TC. Early changes in the dynamics of cryptcell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 37: 1680-1685.1977

Richards TC. Early changes in the dynamics of cryptcell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.*, v.37, p.1680-1685, 1977.

Roberfroid MB. Functional foods: concept and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87: S139-S143.2002

Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.* 93: S13-S25.2005
Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.*, v.93, p.S13-S25, 2005.

Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.71, p.1682S-1687S, 2000.

Roland N, Nugon-Baudon L, Flinois JP, Beaune P. Hepatic and intestinal cytochrome P-450, glutathione-S-transferase and UDP-glucuronosyl transferase are affected by six types of dietary fiber in rats inoculated with human whole fecal flora. *J. Nutr.* 124: 1581-1587.1994

Roland N, Nugon-Baudon, Andrieux C, Szylit O. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. *Br. J. Nutr.* 74: 239-249.1995

Roland N, Rabot S, Nugon-Baudon L. Modulation of the biological effects of glucosinolates by inulin and oat fibre in gnotobiotic rats inoculated with a human whole faecal flora. *Food Chem. Toxicol.* 34: 671-677.1996

Ross GM, McMillan TJ, Wilcos P, Collins AR. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications – Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. *Mutat. Res.*, v. 337, p.57-0. 1995.

Roy S, Singh N, Deo MG, Ramalingaswami V. Ultraestrutura de skeletal muscle and peripheral nerve in experimental protein deficiency and its correlation with nerve conduction studies. *J. Neurol. Scien.*, v.17, p.399-409, 1972.

Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.42, p.1-16, 2006.

Salvadori DMF, Ribeiro LR, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK (Eds). *Mutagênese Ambiental*. ULBRA, Canoas, pp. 201-219.2003

Sawaya AL. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estud. Av.* 20: 147-158.2006

Sawaya AL. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estud. Av.*, v.20, p.147-158, 2006.

Silva AF, Oliveira RJ, Niwa AM, D'Epiro GFR, et al. Anticlastogenic effect of β -glucan, extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, on cultured cells exposed to ultraviolet radiation. *Cytotechnology* 65: 41-48.2013

Silva RCP, Perez MG, Zaninetti PT, Escobar DS, et al. Efeitos da restrição alimentar, pelo método de *Meal Feeding*, e da suplementação de semente de linhaça (*Linum Usitatissimum*) no câncer de colorretal de camundongos Swiss. *Terra e Cultura* 53: 51-65.2011

Silva, CRM, Naves MMV. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Rev. Nutr.*, v.14, p.135-143. 2001.

Sima A, Sourander P. The effect of early undernutrition on the caliber spectrum of the rat optic nerve. A morphometric ultrastructural study. *Acta Neuropathol.*, v.28, p.151-160, 1974.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.1988

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exper. Cell Res.*, v. 175, 184-191, 1988.

Singh, NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455: 111-127.2000

Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A, Hartmann A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol. Lett.*, v. 88, p. 91-98, 1996.

Stevens RG, Swede H, Rosenberg DW. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci : review and analysis of existing studies. *Cancer Lett.* , 2007.

Stevens RG, Swede H, Rosenberg DW. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies. *Cancer Lett.*, v. 252, p.171-183, 2007.

Surh YJ, Shlyankevich M, Lee JW, Yoo JK. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a] pyrene by isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. *Mutat. Res.*, v. 367, p. 219-224, 1996.

Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *J. Carcinog.* 8: 5.2009

Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. Regional Basic Diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoamer. Nut.* 40: 532-547.1990

Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. Regional Basic Diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoamer. Nut.*, v.40, p.532-547, 1990.

Thurman DI. Antioxidants and prooxidants in malnourished populations. *Proc. Nutr. Soc.* 49: 247–259.1990

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206–221.2000

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. *Mutat. Res.*, v. 35, p. 206-221, 2000.

Tice RR. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H.; VENITT, S. *Environ. Mutagen.*, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995, p. 315-339.

Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfoid M, Van Vliet T, Van Den Heuvel E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXIIIAIRRR-CT94-1095). *Br. J. Nutr.*, v.81, p.121-132, 1999.

Vasconcelos FAG. A epidemiologia das deficiências nutricionais no Nordeste: a contribuição de Malaquias Batista Filho à institucionalização da Nutrição em Saúde Pública no Brasil. *Cad. Saúde*, v.16, p.533-544, 2000.

Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, et al. Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371: 340-357.2008

Vijayalaxmi. Chromosomal aberration in malnutrition. *Metabolism* 24: 1415–1417.1975

Vincent M, Radermecker MA. Histologic investigation of muscle tissue in kwashiorkor. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.8, p.511-517, 1959.

Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.69, p-179-197, 1999.

Wargovich MJ, Goldberg MT, Newmark HL, Bruce WR. Nuclear aberrations as a short term for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.71, p.133-137, 1983.

Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 553-559.1999

Waters MD, Brady AL, Stack HF and Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* 238: 57-85.1990

Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.*, v. 238, p. 57-85, 1990.

Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* 98: 129–135.1996

Weisburger JH. Colon carcinogenesis: their metabolism and mode of action. *Cancer*, v. 28, p. 60-69, 1971.

Weisburger JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer* 28: 60-69.1991

Weisburger JH. Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, v. 16, p. 767-773, 2000.

Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.*, v. 37, p. 943-948, 1999.

Wells JCK . The thrifty phenotype hypotesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J. Theor. Biol.* 221: 143-161.2003

Wells JCK. The thrifty phenotype hypotesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J. Theor. Biol.*, v.221, p.143-161, 2003.

Wiebecke B, Krey B, Löhrs U. Morphological ad autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp developmental in the intestinal tract of rats and mice. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, v.360, p179-193, 1973.

Wiebecke B, Krey U, Lohrs U and Eder M. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice. *Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.* 360: 179-193.1973

Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, Rosner BA, Speizer FE, Colditz GA, Manson JE, Hankison SE, Willett WC. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 91, p. 547-556, 1999.

ANEXOS

ARTIGO

TITLE: Genomic lesions and colorectal carcinogenesis: The effects of protein-calorie restriction and inulin supplementation on deficiency status

AUTHORS: W.B. Cantero^{1,2}, N.A. Takahachi³, M.O. Mauro⁴, J.R. Pesarini^{1,2}, A.P.M. Rabacow^{1,5}, R.J. Oliveira^{1,2,6,*}, A.C.M.B. Antonioli^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Centro de Estudos em Célula Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica, Núcleo de Hospital Universitário, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

³Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica, Centro Universitário Filadélfia, Londrina, PR, Brasil

⁴Programa de Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade – Rede Pró Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁵Instituto de Perícias Científicas - Exames de DNA LTDA, Campo Grande, MS, Brasil.

⁶Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*To whom correspondence should be addressed:

Rodrigo Juliano Oliveira

Medicine College, Federal University of Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária, S/N. Campo Grande, MS – Brasil. CEP: 79070-900. Telephone: +55 (67) 3345-7671.

E-mail: rodrigo.oliveira@ufms.br

ABSTRACT

The present study investigated the effects of protein-calorie restriction and supplementation of inulin, a fiber formed by a linear type of polydisperse carbohydrates composed primarily of fructil-fructose bonds β -(2 \rightarrow 1), on deficiency status in animals in which the development of genomic lesions and colorectal carcinogenesis was induced. The experiment was conducted with adult male Swiss mice (n=11/group). The experimental groups were as follows: Negative Control (EDTA), Positive Control, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), Inulin and Associate. The administration of the substance promoting colorectal cancer (DMH) occurred over two weeks in four doses of 20 mg/kg of body weight (bw) intraperitoneally (ip), and inulin was administered daily orally (po) at a dose of 50 mg/kg bw. Each group was split in two; half of each group was fed a normal protein diet, and the other half was fed a low protein diet. The results indicated that malnutrition is related to an increased frequency of genomic lesions but does not predispose animals to the development of colorectal cancer. Inulin exhibited genotoxic activity that requires further investigation and low antigenotoxic activity. Moreover, inulin reduced the levels of biomarkers for intestinal carcinogenesis in both malnourished and healthy animals. These data suggest therapeutic potential, with inulin being a strong candidate for inclusion in the group of functional foods used in cancer prevention for both individuals with proper nutrition and malnourished individuals.

Keywords: Malnourished; Mice; Genotoxicity; Protein-calorie restriction.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most frequent causes of death in individuals in developed countries who consume diets high in saturated fat and protein value and low in vegetables, fruits, leafy greens and fiber. Thus, it is believed that decreased intake of animal proteins and fats reduces the development of colorectal tumors (Mauro et al., 2013).

The Brazilian population is undergoing a nutritional transition; approximately two-thirds of individuals have transitioned from a state of malnutrition to an overweight and/or obese state (Lima and Navarro, 2014). This transition occurred due to socio-economic changes, lifestyle changes, physical inactivity and inappropriate intake of caloric foods (Ferreira, 2005). However, in several parts of the world, such as northeastern Brazil, there remain severely malnourished individuals (protein-calorie malnutrition) who represent an important public health issue (Ribeiro et al., 2014).

According to Silva et al. (2011), there are no sufficient records to conclude whether or how nutritional deficiency can cause cancer or predispose individuals to such an illness. Experimental data are also insufficient to correlate malnutrition and chemical carcinogenesis. However, Silva et al. (2011) have reported that malnutrition caused by meal-feeding is not correlated with the development of aberrant crypt foci (ACF), an important biomarker for colorectal cancer.

Studies demonstrate that diets that promote, proliferate and maintain intestinal microbiota are capable of improving quality of life and preventing chronic diseases such as cancer and/or preventing the development of biomarkers for cancer. Diets with these characteristics are generally rich in pre- and probiotics (Burns, 2004; Mauro et al., 2013; Pesarini et al., 2013).

According to Roberfroid (2002), prebiotic foods beneficially modulate intestinal microflora, stimulating selective growth and/or activity of a limited number of bacteria in the colon, such as lactobacilli and bifidobacteria. The oligosaccharide inulin is a possible component of a healthy diet and may be considered a functional food that acts as a prebiotic, as it interferes beneficially in different physiological and biochemical processes in humans, thereby promoting improved health and reduced risk of diseases (Kaur and Gupta, 2002). This fructan is further described as capable of reducing the tumor and mutagenic activity of xenobiotics present in the daily diet of the population (ANVISA, 2006), in addition to modulating genetic and cytological factors of the colon, which prevent or reduce genetic lesions and the formation of malignancies (Pool-Zobel et al., 2002; Mauro et al., 2013).

In view of the above, the present study assessed the effects of protein-calorie restriction and inulin supplementation on deficiency status in animals in which the development of genomic lesions and colorectal carcinogenesis were induced.

MATERIALS AND METHODS

Chemical agents

1,2-Dimethylhydrazine

The chemical agent 1,2-dimethylhydrazine (DMH; Sigma®, CAS No. 306-37-6) at a concentration of 20 mg/kg body weight (bw) diluted in aqueous solution of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA – 0.37 mg/mL) was administered to animals intraperitoneally (ip) 2x/week for two weeks (Mauro et al., 2013).

Inulin

The functional food inulin was donated by ORAFIT®, Belgium. Inulin was diluted in distilled water and administered at a dose of 50 mg/kg (bw) orally (po) according to Mauro et al. (2013).

Diets

The first lot of animals was provided a normal protein/commercial diet (NPD - Nuvital, Brazil) and water *ad libitum*. The second lot received a low protein diet (LPD) and water *ad libitum*. The diet was prepared at the Center for Studies in Nutrition and Toxicological Genetics (Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica -CENUGEN) of Filadélfia University Center (Centro Universitário Filadélfia – UniFil).

The formulation of the basic regional diet, described by Teodósio et al. (1990) and Ferreira et al. (2005), was based on dietary surveys that have detected (g/100 g) the presence of 18.3 g of brown beans, 64.8 g of cassava flour, 4.1 g of jerked beef and 12.8 g of sweet potato. Chemical analysis indicated a composition of 7.8% protein, 73.2% carbohydrate, 1.5% fat, 7.2% fiber, 1.3% ash and 9.0% moisture. This diet was also chosen because it is able to induce in rats a deficiency status similar to the marasmus of humans.

To prepare the diet, the sweet potato, jerked beef and beans were cooked, ground and mixed with cassava flour. Water was added, and the mixture was pelletized. The pellets were placed in disposable containers and frozen (-4° C) and were thawed only at the time the supplementation was offered to the animals.

In a pilot study using mice (data not shown), supplementation with this diet produced results similar to those reported by Ferreira et al. (2005) with respect to the weight gain of rats.

Animals

Eight experimental groups of 11 animals each were used. The animals were male Swiss mice of reproductive age (60 days) from the CENUGEN located at Unifil, Londrina, Paraná state. The animals were kept in polypropylene boxes lined with wood shavings. The temperature and light were controlled, and a twelve-hour photoperiod (12 hours of light and 12 hours dark), temperature of 22±2° C, and humidity of 55±10% were maintained. The experiment was conducted according to the guidelines of the Universal Declaration of Animal Rights and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of Londrina State University [Universidade Estadual de Londrina] (Protocol Number 240/2009).

Experimental design

The animals were treated for 120 days according to the protocols of Mauro et al. (2013) and Pesarini et al. (2013), with modifications. The experimental groups are described below.

Lot 1 - Animals supplemented with normal protein/commercial diet (NPD):

Negative Control Group (EDTA NPD) – the animals received commercial diet throughout the experimental period; the 4th and 5th week, the EDTA solution was administered (0.1 mL/10 g bw, ip) twice a week; distilled water was also administered (0.1 mL/10 g bw, po) throughout the experimental period. Positive Control Group (DMH NPD) - the animals underwent the same protocol described above for the EDTA NPD group, but EDTA solution was replaced by DMH solution administered at a dose of 20 mg/kg bw, ip; Inulin NPD Group – the animals underwent the same protocol described for the EDTA NPD group, but distilled water was replaced by inulin solution administered at a dose of 50 mg/Kg bw, po; Associate NPD Group: the animals underwent the same protocol described for the DMH NPD group, but the DMH solution was replaced by inulin solution administered at a concentration of 50 mg/Kg bw, po.

To evaluate genotoxicity, a peripheral blood collection was performed 24 hours after the last ip administration of either EDTA or DMH. On experimental day 120, the animals were euthanized by cervical dislocation, and their colons and recta were collected for analysis.

Lot 2 – Animals supplemented with low protein diet (LPD):

The same groups and protocols described above were also performed for Lot 2. However, the normal protein/commercial diet was replaced by a low protein diet for 28 days prior to the administration of the first dose of inulin or distilled water (po). Groups for Lot 2 were named Negative Control (EDTA LPD), Positive Control (DMH LPD), Inulin LPD and Associate LPD.

In a pilot experiment (data not shown), low protein supplementation over 40 days caused the death of 40% of the animals. Based on these data, in the present study, a depletion period of 28 days (period of supplementation with low protein diet) followed by a repletion period of 92 days (normal protein diet supplementation) was established. Thus, ACF were induced by the administration of DMH when the animals were in a state of severe malnutrition; subsequently, the animals returned to a normal protein/commercial diet intake.

Biological assays

Comet assay

The comet assay was performed according to Singh et al. (1988) with modifications. To mount the slides, 20 µL of peripheral blood collected 24 hours after the last dose of DMH or EDTA was deposited with 120 µL of LPM agarose (1.5%) at 37° C on a slide previously covered with standard agarose (5%). The slides were covered with coverslips and refrigerated at 4° C for 20 minutes. After removal of the coverslips, the slides were immersed in lysis solution, freshly prepared, consisting of 89.0 mL of stock lysis solution (2.5 NaCl, 100.0 mM EDTA, 10.0 mM Tris, pH 10.0 adjusted with solid NaOH, 890.0 mL distilled water), 1.0 mL of Triton X-100 (Merck) and 10.0 mL of DMSO. Lysis occurred for 1 hour, at 4° C, protected from light. Subsequently, the slides were placed in an electrophoresis chamber in pH>13.0 buffer (300.0 mM NaOH and 1.0 mM EDTA) at 4° C for 20 minutes for DNA denaturation. Electrophoresis was performed at 25.0 V and 300.0 mA (1.25 V/cm). Subsequently, the slides were neutralized with pH 7.5 buffer (0.4 M Tris-HCl) for 3 cycles of 5 minutes, air dried, fixed in absolute

ethanol for 10 minutes and stored for later analysis. For staining, slides were covered with 100.0 μL Ethidium Bromide (20×10^{-3} mg/mL) and a coverslip. The material was evaluated with a fluorescence microscope (Bioval, Model L 2000A) at 40X magnification with a 420-490-nm excitation filter and a 520-nm barrier filter.

One hundred cells per treatment were visually analyzed, and comets were classified as follows: class 0 - undamaged cells that do not have a tail; class 1 - cells with a tail smaller than the nucleoid diameter; class 2 – cells with a tail size between 1 and 2 times the nucleoid diameter; and class 3 - cells with tail 2 times greater than the nucleoid diameter. Apoptotic cells, which exhibited totally fragmented nucleoids, were not counted (Kobayashi et al., 1995). The total score was calculated by summing the values resulting from the multiplication of the total cells observed in each lesion by the value of the class. Statistical analysis was performed by ANOVA/Tukey test ($P < 0.05$).

Aberrant Crypt Foci Assay

After euthanasia, the heart, lungs, liver, kidneys and the terminal portion of the intestine were collection to be used in the ACF assay. To collect the organs, an incision was made on the ventral side of the animal along the midline of the pubic area to the xiphoid process. The muscles of the abdomen were folded laterally from the incisions in the proximal and distal portions. After locating the proximal colon, a ligature was made with a cotton thread. Distal to the ligature, the colon was removed from the proximal part to the rectum and washed with 0.9% saline solution to remove the feces. After washing, the colon was opened longitudinally along the border of the mesenteric insertion and distended on Styrofoam plates, and the ends were fixed with pins. The plates were dipped in a vat containing a solution of 10% buffered formalin for at least 24 hours.

At the time of analysis, each colon segment was stained with 10% Giemsa for 10 min and placed on a histological slide with the mucosa facing up. The analysis was performed using an optical microscope (Microscope DBG®) at 10X magnification. The entire mucosa was examined to identify and count the number of ACF. The identification of ACF was based on criteria used by Bird (1987): (I) focus consisting of a single crypt - aberrant crypt exhibits coating by a thick epithelial layer with an elliptical luminal opening and a size larger (at least 2 times) than the surrounding normal crypts; and (II) focus with two or more crypts - aberrant crypts form distinct blocks and occupy an area larger than the area occupied by an equivalent number of crypts of normal morphology and with no normal crypts separating the aberrant crypts within these foci.

For the statistical analysis of the ACF test data (total number of ACF, number of aberrant crypts per foci and crypt/focus ratio), the different groups were compared using the ANOVA/Tukey test ($P < 0.05$).

Percentage of damage reduction

The percent damage reduction (%DR), in accordance with Waters et al. (1990), was calculated as per the following formula:

$$\%DR = \left[\frac{\text{Mean of positive control} - \text{Mean of associated group}}{\text{Mean of positive control} - \text{Mean of negative control}} \right] \times 100$$

RESULTS

Although the animals were assigned to groups randomly, the weight on the 1st experimental day was different ($P < 0.05$), with the animals in the EDTA LPD and DMH LPD groups exhibiting higher body weight means. On the 28th experimental day, after the depletion period, the animals supplemented with normal protein diet exhibited weights similar to each other and distinct from animals supplemented with a low protein diet ($p < 0.05$), with the lowest mean observed in the group treated with inulin. The weight gain/loss in the depletion period (1st to 28th experimental day) demonstrated that the groups fed a normal protein diet exhibited similar weight gain. However, the Associate LPD group exhibited a trend toward weight loss. The groups supplemented with a low protein diet lost weight similarly to each other and exhibited differences when compared with the groups treated with a normal protein diet. On the 120th experimental day, after the repletion period, the final weight did not differ among the experimental groups ($P > 0.05$), nor did weight gain in the repletion period (Table 1).

The absolute weight of the lungs, liver and kidneys and the relative weight of the heart, lungs and kidneys did not differ ($P > 0.05$). The mean absolute weight of the heart was higher ($P < 0.05$) in the EDTA LPD and Inulin LPD groups, and the mean relative liver weight decreased ($P < 0.05$) in the Associate NPD and Associate LPD groups (Table 2).

The frequency of damaged cells in the comet assay in groups supplemented with a normal protein diet indicated that inulin is genotoxic but also exhibits antigenotoxic activity, with a damage reduction of 44.59%. The administration of DMH and inulin increased ($P < 0.05$) the frequency of genomic lesions by 95.44-fold and 53.33-fold, respectively (Table 3).

Table 3 also demonstrates that animals treated with a low protein diet (EDTA LPD, DMH LPD, Inulin LPD and Associate LPD) exhibited similar frequencies of DNA lesions ($P > 0.05$) and higher frequencies than the EDTA NPD group ($p < 0.05$). Therefore, malnutrition (EDTA LPD) increased the levels of DNA damage by 63.88%. Under malnutrition conditions, the levels of damage caused by DMH (DMH LPD group) did not differ from those observed in the other groups subjected to the depletion period ($P > 0.05$) but were different compared with the DMH NPD group. The inulin group exhibited the same level of DNA damage as did the other groups subjected to the low protein diet as well as a similar level of DNA damage compared with the Inulin NPD group. The Associate LPD group exhibited little damage reduction (3.89%).

The negative control (EDTA NPD and EDTA LPD) and inulin (Inulin NPD and Inulin LPD) groups exhibited no ACF and thus were significantly different from all other experimental groups in which abnormal foci were observed. The DMH NPD and DMH LPD positive controls exhibited a mean number of ACF of 5.1 ± 2.69 and 8.1 ± 1.90 , respectively, and an increase of approximately 1.59-fold as a function of nutritional status was observed. The percent damage reduction was approximately 47.05 and 59.25% for the Associate NPD and Associate LPD groups, respectively (Table 4).

DISCUSSION

Reviews about the malnutrition and cancer binomial are related, in general, to cancer cachexia, which is characterized by progressive weight loss, anorexia, asthenia, anemia, chronic nausea and immunosuppression and is responsible for a large number of deaths in patients with advanced-stage cancer. Therefore, malnutrition and cancer is clinically distinct from the inversely proportional relationship between the degree of cachexia and the survival of cancer patients, and it also results in an unfavorable prognosis, reduction of suitable responses to therapies, and reduction of quality of life (Argilés et al., 2006).

There are few studies on the effects of protein-calorie malnutrition and cancer development, and no studies have been published on the supplementation of inulin in chemical carcinogenesis models of deficiency status. Thus, this study is original and pioneering.

According to Monteiro (2003), malnutrition results from chronic deficiency of one or more nutrients because adequate intake and the biological utilization of calories and protein are necessary for body growth and maintenance (Hoffmann, 1995). Malnutrition is associated with the development of other conditions, such as infections, immunosuppression, diabetes, hypertension and obesity. Studies also report that malnutrition during critical periods and periods specific to development has long-lasting and/or persistent effects that can be referred to as metabolic imprinting (Waterland and Gaza, 1999; Sawaya, 2006).

In the present study, female and male animals were mated, and the females had free access to water and commercial diet (*ad libitum*) during periods of pregnancy, lactation and development of the offspring; the pups also had free access to water and food, thereby ensuring that the animals developed under optimum conditions of food availability and biological utilization of calories and proteins. Subsequently, the animals treated with a low protein diet during the depletion period exhibited significant weight loss, which validates the experiment and indicates that the low protein diet when administered for a period of 28 days is sufficient to promote the deficiency status in animals, as reported by Teodósio et al. (1990) and Ferreira et al. (2005). It is also noted that during the repletion period, *i.e.*, when the LPD was replaced by NPD, the depleted animals exhibited rapid weight gain, and at the end of the experiment, there was no longer evidence of animals with low weight and/or deficiency status. However, the relative weight of the liver exhibited a trend toward weight loss in all animals except for the Inulin LPD group and a statistically significant decrease in the Associate NPD and Associate LPD groups.

When analyzing the frequency of genomic lesions (comet assay) and premalignant lesions (aberrant crypt foci test), the state of malnutrition increased the frequency of DNA damage by 63.88x (EDTA LPD group). However, there was no correlation with the levels of cancer biomarkers.

The relationship between malnutrition and DNA damage has been reported and includes effects on chromosomal aberrations (Alu and Murthy, 1993), increased frequency of sister chromatid exchange (Betancourt et al., 1986), micronuclei (Ortiz et al, 1995) and comets (Cortés et al., 2001). However, other studies report no correlation between malnutrition and increased genetic damage, whether genotoxic and/or mutagenic (Betancourt et al., 1995; Celik et al., 2012).

To explain the increased genotoxicity observed in this experiment, the following can be inferred: (I) the lack of nutrients causes inadequate synthesis of proteins involved in the cell cycle and maintenance of DNA integrity and DNA repair; (II) cells of malnourished bodies cannot sustain baseline DNA damage repair; and (III) malnutrition causes a lack of enzymes

that prevent oxidative processes and the production of free radicals (Webster et al., 1996; Cortés et al., 2001).

Studies also report that protein-calorie restriction decreases the activity of glutathione peroxidase, the antioxidant enzyme glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in addition to the serum reduction of vitamin E and glutathione, two important antioxidants (Cortés et al., 2001).

Epidemiological evidence also suggests that diets rich in vegetables and fruits are associated with a decreased incidence of cancer/genetic damage and that in the absence of the protective effects of these diets, there may be an exacerbation of the effects of xenobiotics that may be related to the development of carcinogenesis. Thus, an unbalanced diet that fails to provide chemopreventive agents indirectly contributes to a higher incidence of initiation and development of cancer (Lutz, 1999), a fact that can also be considered for the deficiency status in protein-calorie malnutrition.

The absence of aberrant crypt foci in the EDTA LPD group, even taking into account the high frequency of DNA damage detected by the comet assay, suggests that these lesions are not directly correlated with the process of intestinal tumor initiation. This assertion is corroborated by the fact that DMH has greater effectiveness in the induction of aberrant crypt foci in the DMH LPD group, even without causing a significant increase in the frequency of comets, given that this group developed 1.59-fold more foci than the DMH NPD group.

DMH is an important carcinogen, and its risk classification according to the International Agency for Research on Cancer is 2A (Brasil, 2012). However, this compound is a strong promoter and a weak initiator of carcinogenesis. DMH is an indirect agent; that is, it requires enzymes to convert it into an electrophilic species that will bind to DNA (Newell and Heddle, 2004) to promote the formation of methyl group adducts, point mutations, and sister chromatid breakage (Newell and Heddle, 2004), which can then be evaluated by the alkaline pH>13 version of the comet assay, as performed in this study. This assay detects direct damage of the single and double strand breaks, alkali-labile sites, crosslinks, and excision repair sites, as well as indirect damage such as lesions by methylation and adducts, which, being alkali-labile, are expressed as simple breaks under alkali treatment (Vieira et al., 2014).

The administration of inulin in healthy animals (Inulin NPD) and malnourished animals (Inulin LPD) resulted in similar frequencies of DNA damage, and neither of the two experimental groups developed biomarkers for intestinal cancer. This genotoxic activity and the non-induction of aberrant crypt foci have been reported by Mauro et al. (2013). According to these authors, such genotoxic damages are liable to repair, and therefore, the frequency of biomarkers for tumors will not always correspond to the frequencies of comets. This possibility of repair and non-correspondence is also reported by Oliveira et al. (2007).

In the antigenotoxicity test, inulin exhibited percentages of damage reduction on the order of 25.64 and 3.87% for the treatments with NPD and LPD, respectively. This same dose was tested by Mauro et al. (2003) in animals treated with a normal protein diet, and the percentages of damage reduction were approximately 1.02, 9.97, -0.55 and 3.92% for the pre-treatment, simultaneous, post-treatment and pre+continuous protocols, respectively. Thus, both studies suggest that the antigenotoxic activity of inulin is not significant. However, this compound exhibits antimutagenic activity that should be considered, with damage reduction percentages that may vary from 77.46 to 141.75% 48 hours after the last dose of DMH (Mauro et al., 2013).

When the percentages of damage reduction exceed 100%, they also indicate the prevention of clastogenic and/or aneugenic basal damage. Reports of this nature were also observed for β -glucan saccharide in *in vivo* experiments and in several treatments (Oliveira et al., 2014).

With respect to anticarcinogenicity, percentages of damage reduction of approximately 47.05 and 59.25% were observed for the treatments with NPD and LPD, respectively. In the study by Mauro et al. (2013), the percentages of damage reduction were 69.12, 87.56, 55.78 and 72.89% for the pre-treatment, simultaneous treatment, post-treatment and pre+continuous protocols, respectively. These results, combined with the micronucleus results, suggest that inulin can act both as a desmutagenic and as a bioantimutagenic; therefore, the present study, taking advantage of this knowledge, used a protocol that added these two modes of action, which explains why the inulin was offered before, during, and after the administration of DMH. Furthermore, inulin was part of the composition of both the normal protein diet and low protein diet. Between the two protocols (supplementation with NPD and LPD) there was a difference of 12.2 percentage points for the reduction in the incidence of aberrant crypt foci. Therefore, the results suggest that inulin exhibits the ability to prevent tumor development in malnourished animals.

The administration of the pro-carcinogenic DMH, with repeated exposure of the intestinal mucosa, causes lesions; cell proliferation is stimulated by DMH, followed by aberrant crypt hyperplasia and hypertrophy of the mucosa, leading to aberrant crypt foci that can later develop into adenomas (Mauro et al., 2013). However, for the DMH to be converted into a carcinogen, it must be metabolized in the liver. First, the DMH is oxidized to azomethane and subsequently to azoxymethane, after which it is enzymatically hydroxylated to methylazoxymethanol (Lamont and O’Gorman, 1978).

Methylazoxymethanol has three fates: (I) it can decompose, under body temperature, into formaldehyde, water, nitrogen and methyldiazonium, which is a potent alkylating agent (Nagasawa et al., 1972); (II) it can undergo metabolism by alcohol dehydrogenase, being converted into methylazoxyformaldehyde in the liver, colon, and, to a lesser degree, in the jejunum and ileum (Grab and Zedek, 1977); and (III) it can be conjugated in the liver with β -glucuronic acid and taken to the intestinal lumen, where the intestinal microflora will produce the enzyme β -glucuronidase, which will release the carcinogenic metabolite of DMH (Lamont; O’Gorman, 1978).

To date, the metabolizing capacity of malnourished animals has been believed to be less effective. Hence, it is possible to suggest that the higher percentage of damage reduction of inulin in the malnourished group was due not only to the action of this fructooligosaccharide but to a decreased capacity for DMH activation. Furthermore, protein-calorie malnutrition may be associated with intestinal villous atrophy as well as with an imbalance of the intestinal microbiota (Morais and Neto, 2003). This fact would also cause a lower capacity for DMH activation in the intestine due to the lower availability of β -glucuronidase because this enzyme is produced by bacteria in the intestine.

Another fact to be mentioned is that inulin is preferentially metabolized by bifidobacteria in the intestine of humans and rodents. These bacteria produce little or no β -glucuronidase, and thus, there is a smaller possibility of releasing carcinogenic xenobiotics. Therefore, the intake of inulin exerts its anti-carcinogenic activity indirectly, *i.e.*, it allows the colonization of the intestine by bifidobacteria that compete with other bacteria that are able to increase the production of undesirable enzymes (Pool-Zobel et al., 2002; Mauro et al., 2013). Furthermore, these bacteria can produce lactic acid and reduce the pH of the fecal bolus and intestine. This reduction in pH acts as a bactericide to the putrefactive bacteria and helps reduce the

absorption of ammonia, two events involved in increasing intestinal carcinogenicity. Due to the balance of the intestinal flora, it is also suggested that these actions occur preferentially in the group that received the NPD.

Among the anti-carcinogenic properties of inulin are the following: (I) the modulation of apoptosis by means of the production of short chain fatty acids, specifically butyrate, which are produced from the metabolism of inulin by bacteria; (II) the protection and repair of the intestinal mucosa of the colon that contribute to the reduction of intestinal diseases through the action of short-chain fatty acids (Cherbut, 2002); (III) increased detoxification capacity of the liver by increased production of glutathione S-transferase and glucuronyltransferase, which are xenobiotic-metabolizing enzymes (Roland et al., 1996); (IV) characteristics of dietary fiber (prebiotic) with the capacity for the adsorption of agents capable of causing DNA damage; and (V) the ability to form microcrystals of high adsorptive capacity that facilitate the elimination of xenobiotics (Niness, 1999).

Therefore, malnutrition status is related to the increased frequency of genomic lesions, but it does not predispose to the development of colorectal cancer. Inulin possesses genotoxic activity that requires further research and exhibits a low antigenotoxic activity. Moreover, inulin has an important ability to reduce biomarkers for intestinal carcinogenesis in malnourished or healthy animals. These data suggest therapeutic potential, with inulin being a strong candidate among a group of functional foods used in cancer prevention for both individuals having proper nutrition as well as malnourished individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

Research funded by “Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia” of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT; Edital Chamada FUNDECT #5/2011, PPP, Processo #23/200.702/2012, Termo de Outorga #0207/12), Fundação Araucária: “Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, “Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação” (UniFil).

REFERENCES

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2006). Alimentos funcionais. Available at [<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>]. Accessed August

05, 2014.

Alu V and Murthy PB (1993). Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats and in utero upon rehabilitation. *Experientia* 49: 258–262.

Argilés JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ and Figueras M (2006). Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutr. Hosp.* 21: 4-9.

Betancourt M, Balvanera P and Ortiz R (1986). Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutat. Res.* 175: 29–31.

Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, et al. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.* 331: 65–77.

Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas (2012). Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. Available at [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/diretrizes_vigilancia_cancer_trabalho.pdf]. Accessed August 04, 2014.

Burns AJ and Rowland IR (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* 551: 233-243.

Celik M, Sermatov K, Abuhandan M, Kocyigit DZA, et al. (2012). Oxidative status and DNA damage in children with marasmic malnutrition. *J. Clin. Lab. Anal.* 26: 161-166.

Cherbut C (2002). Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br. J. Nutr.* 2: S159-S162.

Cortés E, González C, Betancourt M and Ortiz R (2001). Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21: 231-247.

Ferreira HS, Assunção ML, França AOS, Cardoso EPC, et al. (2005). Efetividade da “multimistura” como suplemento de dietas deficientes em vitaminas e/ou minerais na recuperação ponderal de ratos submetidos à desnutrição pós-natal. *Rev. Nutr.* 18: 63–74.

Grab DJ and Zedek MS (1977). Organ-specific effects of the carcinogen methylazoxymethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent dehydrogenases. *Cancer Res.* 37: 182-189.

Hoffmann R (1995). Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estud. Av.* 9: 159-172.

Kaur N and Gupta AK (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosc.* 27: 703-714.

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, et al. (1995). Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3: 103-115.

Lamont JT and O’Gorman TA (1978). Experimental colon cancer. *Gastroenterol.* 75: 1157-1169.

Lima JMDX and Navarro AC (2014). Sistema de vigilância alimentar e nutricional em crianças de Minas Gerais, Brasil: histórico, cobertura e estado nutricional. *Rev. Bras. Obes. Nutr. Emag.* 8: 55-64.

Lutz KW (1999). Carcinogens in the diet vs. overnutrition Individual dietary habits, malnutrition, and genetic susceptibility modify carcinogenic potency and cancer risk. *Mutat. Res.* 443: 251–258.

Mauro MO, Monreal MTFD, Silva MTP, Pesarini JR, et al. (2013). Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet. Mol. Res.* 12: 2281-2293.

Monteiro CA (2003). A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. *Estud. Av.* 17: 7-20.

Morais MB and Neto UF (2003). Enteropatia ambiental. *Estud. Av.* 48: 137-148.

Nagasawa HT, Shirota FN and Matsumoto H (1972). Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin in H₂O. *Nature* 236: 234-235.

Newell LE and Heddle JA (2004). The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat. Res.* 564: 1-7.

Niness KR (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129: 1402-1406.

Oliveira RJ, Pesarini, JR, Salles MJS, Kanno TYN, et al. (2014). Effects of β-glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. *Genet. Mol. Biol.* 37: 111-119.

Oliveira RJ, Matuo R, Silva AF, Matiazi HJ, et al. (2007). Protective effect of β-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol. In Vitro* 21: 41-52.

Ortiz R, Cortés E, González C, Pérez L, et al. (1995). Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 55–59.

Pesarini JR, Zaninetti PT, Mauro MO, Carreira CM, et al. (2013). Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet. Mol. Res.* 12: 1646-1659.

Pool-Zobel B, van Loo J, Rowland I and Roberfroid MB (2002). Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br. J. Nutr.* 87 (Suppl 2): S273-S281.

Ribeiro CCC, Silva MCB, Machado CMP, Ribeiro MRC, et al. (2014). A gravidade da cárie está associada à desnutrição protéico-calórica em pré-escolares? *Ciênc. saúde coletiva* 19: 957-965.

Roberfroid MB (2002). Functional foods: concept and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87: S139-S143.

Roland N, Rabot S and Nugon-Baudon L (1996). Modulation of the biological effects of glucosinolates by inulin and oat fibre in gnotobiotic rats inoculated with a human whole faecal flora. *Food Chem. Toxicol.* 34: 671-677.

Sawaya AL (2006). Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estud. Av.* 20: 147-158.

Silva RCP, Perez MG, Zaninetti PT, Escobar DS, et al. (2011). Efeitos da restrição alimentar, pelo método de *Meal Feeding*, e da suplementação de semente de linhaça (*Linum Usitatissimum*) no câncer de colorretal de camundongos Swiss. *Terra e Cultura* 53: 51-65.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM and Guedes RCA (1990). Regional Basic Diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoamer. Nut.* 40: 532-547.

Vieira MHC, Oliveira RJ, Eça LPM, Pereira ISO, et al. (2014). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. *Genet. Mol. Res.* In Press.

Waterland RA and Garza C (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 553-559.

Waters MD, Brady AL, Stack HF and Brockman HE (1990). Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* 238: 57-85.

Webster RP, Gawde MD and Bhattacharya RK (1996). Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* 98: 129–135.