



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARINA DE ALMEIDA GUALTIERI

**“AVALIAÇÃO DO FRUTOLIGOSSACARÍDEO INULINA:
TOXICIDADE E EFEITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO
FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXP3* E *TGFB*”**

KARINA DE ALMEIDA GUALTIERI

**“AVALIAÇÃO DO FRUTOLIGOSSACARÍDEO INULINA:
TOXICIDADE E EFEITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO
FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXP3* E *TGFB*”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação – Stricto sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe

Co-orientação: Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira Suzuki

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G912a Gualtieri, Karina de Almeida.

Avaliação do frutoligossacarídeo inulina : toxicidade e efeitos na expressão gênica do fator de transcrição *FOXP3* e *TGFB* / Karina de Almeida Gualtieri. – Londrina, 2013.
97 f. : il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Co-orientador: Karen Brajão de Oliveira Suzuki.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Inulina – Teses. 2. Genética – Expressão – Teses. 3. Citotoxicidade – Teses. 4. Células T – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica Ehara. II. Suzuki, Karen Brajão de Oliveira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

KARINA DE ALMEIDA GUALTIERI

**“AVALIAÇÃO DO FRUTOLIGOSSACARÍDEO INULINA:
TOXICIDADE E EFEITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO FOXP3 E TGFB”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação – Stricto sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dr^a. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho – UNESP/Botucatu

Profa. Dr^a. Carolina Batista Ariza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dr^a. Gabriela Gonçalves de Oliveira
Centro Universitário Filadélfia – UniFil

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de novembro de 2013.

Dedicatória

Aos meus pais, Edenir e Rozelli, que me ensinaram a conduzir a vida com amor e dignidade, pela confiança, amor incondicional, apoio e incentivo durante toda esta trajetória de minha vida.

À vocês minha eterna gratidão!

*...Também a minha irmã
Giselle, uma força sempre presente e
apoio aos meus sonhos,
incondicionalmente...*

Agradecimientos

À Deus, pelo sagrado “Dom” da vida, que neste momento se faz presente e eterno. Acima de tudo, por estar abençoando minha vida pessoal, profissional e acadêmica, que me encoraja a vencer obstáculos, me incentiva a buscar o melhor e principalmente, por colocar em meu caminho pessoas iluminadas, que fizeram parte deste trabalho e o tornaram possível.

À minha família, como um todo, por ter abraçado parte desta conquista, em especial meus pais, Edenir e Rozelli e irmã, Giselle, mas não menos aos meus avós, Geniplo e Zaira, que de certa forma compartilharam desta jornada demonstrando amor, carinho e compreensão.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe pela dedicação, apoio, contribuição pessoal e acadêmica, fundamentais para a realização deste trabalho. Ficam aqui registrados meus eternos agradecimentos. A você sempre terei a agradecer.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira Suzuki pela amizade, compreensão, atenção, apoio e pelo conhecimento compartilhado neste trabalho.

A uma amiga especial, que tive o privilégio de contribuir ao longo de sua jornada acadêmica, transmitindo singelos conhecimentos, hoje Dr^a. Carolina Batista Ariza pelo carinho, auxiliando e buscando soluções, experimentos realizados, técnicas testadas, conselhos e sua imprescindível colaboração, meus eternos agradecimentos ao longo destes anos de trabalho.

À Dr^a. Roberta Losi Guembarovski, exímia pesquisadora e didata por vocação, agradeço pelo apoio, conhecimentos transmitidos, por sua valiosa colaboração e sugestões em todas as fases da realização deste estudo.

À minha ex-aluna MSc. Julie Massayo Maeda Oda que com muito orgulho se sobressaiu e hoje contribuiu de forma expressiva para as pesquisas aqui realizadas. Por sua dedicação, competência, comprometimento, carinho e amizade, auxiliando e buscando soluções em horas críticas, agradeço todas as contribuições, otimismo e imprescindível colaboração.

Ao colega MSc. Carlos Eduardo Coral de Oliveira, por todas as significantes contribuições ao longo deste trabalho, que com boa disposição, entusiasmo e brilhantismo, auxiliou na concretização de etapas cruciais deste estudo.

À Dr^a. Gabriela Gonçalves de Oliveira, pela dedicação, amizade e incentivo ao longo das jornadas acadêmicas que partilhamos. Pelas significantes contribuições e espírito coletivo demonstrados durante a análise deste estudo ao compor parte esta banca de exame de qualificação.

Aos amigos Leandra Fiori Lopes, Marla Karine Amarante, Thiago César Fujita e Vânia Darc de Castro, pela atenção e por tantas vezes terem se disponibilizado a ajudar, o que certamente fez a diferença neste trabalho.

A toda a equipe e membros do Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos de DNA, da Universidade Estadual de Londrina, Bruna Karina Banin Hirata, Glauco Akelington Freire Vitiello, Patricia Midori Murobushi Ozawa, e outros integrantes não nominados aqui, pela oportunidade conferida e contribuições técnicas que garantiram resultados a esta conquista.

A todos os docentes do Programa *Stricto sensu* em Patologia Experimental, que transmitiram com dedicação seus conhecimentos e experiências profissionais.

Agradeço em especial aos AMIGOS que se mostraram verdadeiros ao longo desta etapa de minha vida, Fábio Suano de Souza, Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori, Mirian Ribeiro Alves Maiola, Newton Hashimoto, Thaciana Gomes Casasanta Cimitan e Thiago César Fujita que me apoiaram. Obrigada pelos sábios conselhos e pela oportunidade de termos trabalhado juntos e compartilhado momentos determinantes para minha formação pessoal.

Em especial à amiga Cláudia de Oliveira, com a qual não dividi somente experiências, mas tive o privilégio de poder dividir minha vida, minhas alegrias, angústias e ideais! Pelos anos de confiança e expectativas de vida, sabendo cultivar uma amizade que o tempo amadureceu.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

*A amizade não se força, não se compra, não se vende...
Ela acontece, lentamente, em silêncio, devagar.
Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
porque é único para nós,
mas não vai sozinho e nem nos deixa só.
Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.
Essa é a mais bela responsabilidade de nossa vida,
a prova de que as almas não se encontram por acaso.*

*Cada dia que amanhece assemelha-se a uma
página em branco, na qual gravamos os nossos
pensamentos, ações e atitudes.
Na essência, cada dia é a preparação
de nosso próprio amanhã.*

Chico Xavier

GUALTIERI, Karina de Almeida. **Avaliação do Frutoligossacarídeo Inulina: Toxicidade e Efeitos na Expressão Gênica do Fator de Transcrição *FOXP3* e *TGFB***. 2013. 95f. Tese de Doutorado em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A identificação de componentes da dieta, a compreensão de seus mecanismos de ação, bem como seu desenvolvimento e utilização na alimentação humana são alguns dos objetivos junto a ciência dos alimentos funcionais. α -D-glucopiranosil-[α -D-fructofuranosil](n-1)-D-fructofuranoside, comumente conhecida como inulina, é um polissacarídeo de origem vegetal natural, com uma gama diversificada de aplicações alimentares e farmacêuticas. Oligossacarídeos do tipo inulina são considerados como prebióticos, por suas propriedades não digeríveis dos hidratos de carbono, encontradas em muitos vegetais, frutos e cereais. Embora a literatura indique que a inulina é um alimento funcional, eficaz e promissor, estudos ainda são necessários para elucidar o seu potencial na modulação da imunidade sistêmica e seu papel na prevenção de doenças crônicas. Nos últimos anos tornou-se evidente que uma subpopulação de células T, denominadas células T reguladoras (Tregs), desempenham papel importante na manutenção da tolerância a auto-antígenos, sendo o fator de transcrição *FOXP3* um marcador desse tipo celular e ainda podem ser induzidas por uma citocina denominada fator de transformação do crescimento- β (*TGF- β*). Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar se a inulina possui efeito tóxico *in vivo*, e também avaliar seu efeito sobre a expressão, *in vitro*, do *TGFB* e *FOXP3* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os resultados mostraram que a inulina não induziu qualquer lesão hepática ou renal e alterações nos parâmetros séricos, exceto para o nível de ALT. Não houve influência significativa da inulina junto às alterações histológicas, sugerindo outra causa para a alteração de ALT, concluindo assim, que frutanos do tipo inulina não têm efeito significativo sobre transaminases séricas, valores de MDA ou análises histopatológicas *in vivo*. As análises *in vitro* mostraram que não houve diferença nos níveis de *TGF- β* no sobrenadante de cultura de células, porém foi possível detectar, por PCR em tempo real, o aumento de expressão de *FOXP3* e uma tendência ao aumento de *TGFB* nas células tratadas com inulina. Embora a inulina represente uma potencial fonte como composto seletivo e de efeitos farmacológicos e imunológicos, sua utilidade na terapêutica revela um aspecto da investigação científica e abre perspectivas para pesquisas futuras.

Palavras-chave: Inulina. MDA. ALT. AST. *FOXP3*. *TGFB*. PBMC.

GUALTIERI, Karina de Almeida. **Evaluation of Frutoligosacarideo Inulin: Toxicity and Effects on Gene Expression of *FOXP3* and *TGFB***. 2013. 95p. Ph.D. Thesis in Experimental Pathology – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Identification of dietary components, understanding of their action mechanisms as well as their development and use in human diet are some of the objectives of functional food science. α -D-glucopyranosyl-[α -D-fructofuranosyl](n-1)-D-fructofuranoside, commonly known as inulin, is a natural plant-derived polysaccharide with a diverse range of food and pharmaceutical applications. Inulin oligosaccharides are considered as prebiotic for their non-digestible carbohydrate properties often found in many vegetables, fruits and cereals. Although literature indicates that inulin is an effective and promising functional food, further studies are still needed to elucidate its potential in modulating systemic immunity and its role in prevention of chronic diseases. During recent years it has become evident that a subpopulation of T cells, named T regulatory cells (Tregs), plays a major role in sustaining tolerance to self-antigens, with the transcription factor *FOXP3* a marker of this cell type. These Tregs could be induced by cytokine named transforming growth factor beta ($TGF-\beta$). This study also investigated the effect of inulin on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro*. Culture of PBMC was performed in presence or absence of inulin. The results showed that inulin did not induce any hepatic injury, serum parameters, except for ALT activity. There was no significant inulin influence by histological alteration, suggesting another cause, concluding that inulin-type fructans have no significant effect on serum transaminases, MDA values or histopathological analysis *in vivo*. Analyzes *in vitro* verified no difference of $TGF-\beta$ between supernatant of culture cell, by real time PCR was possible detect increase of expression of *FOXP3* and a trend for *TGFB* mRNA in inulin treated PBMC. Although inulin is a potential source of new and selective compound with pharmacological and immunological effect, its usefulness in the therapeutics should be further investigated, reveal an aspect of the scientific investigation, opening perspectives for further investigation for further research.

Keywords: Inulin. MDA. ALT. AST. *FOXP3*. *TGFB*. PBMC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
Blimp	Proteína de Maturação Induzida em Linfócito B
CCR	Receptor de Quimiocina CC
CD	Conjunto de Diferenciação
CD62L	Receptor de Alojamento Linfocitário (L-selectina)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno 4 Associado a Linfócito T Citotóxico)
DC	Células Dendríticas
Fas	Receptor de Morte Celular
FOS	Frutoligossacarídeos
FOSHU	<i>Foods for Specified Health Use</i> (Alimentos para Uso Específico de Saúde)
FOXP3	Fator de Transcrição da Família <i>Forkhead</i>
FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i> (Ciência de Alimentos Funcionais na Europa)
GATA	Fator de Transcrição e Diferenciação de Células T
GITR	<i>Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor Receptor</i> (Receptor do Fator Necrose Tumoral induzido por Glicocorticóides)
HLA-DR	Complexo Principal de Histocompatibilidade Humana-DR
ICOS	Proteína Coestimuladora de Linfócito T
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon Gama
IRF	Fator Regulador de Interferon
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MDA	Malondialdeído
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
NF-kB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>

PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
Stat	Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição
TCR	Receptor de Células T
Th	Linfócitos T helper
TNFR-2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-2</i> (Receptor do Fator de Necrose Tumoral-2)
TGI	Trato Gastrointestinal
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TGF- β RI e II	Receptor I e II do Fator de Transformação do Crescimento Beta
Tregs	Linfócitos T Regulatórios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
1.2	INULINA.....	19
1.2.1	Propriedades Gerais	19
1.2.2	Efeitos Biológicos da Inulina	23
1.3	CÉLULAS T REGULATÓRIAS	27
1.3.1	Fator de Transcrição <i>FOXP3</i>	29
1.3.2	Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF β).....	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
	<i>Produção Científica</i>	37
	<i>Apêndice A</i> - Inulin: therapeutic potential, prebiotic properties and immunological aspects.....	38
	<i>Apêndice B</i> - Inulin intake does not cause hepatic ou renal injury in Wistar rats.....	56
	<i>Apêndice C</i> - Effect of inulin on human peripheral blood mononuclear cells:increase of gene expression for transcription factor <i>FOXP3</i>	70
	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Devido a sua expansão, alta incidência e mortalidade na sociedade moderna, o câncer é uma preocupação social, política e científica, sendo retratado como um problema de saúde pública (INCA, 2012). Assim, faz-se necessário mobilizar os esforços na prevenção e cura desta doença.

De acordo com dados do INCA (2012): “Estudos epidemiológicos estimam que cerca de 80% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais”. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida).

Segundo Lee e Park (2003), um terço de todos os cânceres humanos estão relacionados à dieta. Uma hiperalimentação, consumo reduzido de frutas e hortaliças, bem como o consumo excessivo de gorduras e carnes seriam as causas alimentares mais prováveis do câncer.

Frente ao grande número de novos casos de cânceres, entende-se que técnicas de diagnóstico precoce e prevenção são necessárias (VERGHESE et al., 2002). Nesta busca, incluem-se substâncias quimioprotetoras que não permitam que a doença se instale ou progrida, evitando ao máximo sua toxicidade, razão pela qual têm sido extraídos diferentes extratos de plantas, já descritas como medicinais.

“O termo quimioprevenção surgiu para descrever uma nova área em Oncologia, que consiste no uso de compostos, sintéticos ou naturais, para inibir, retardar ou reverter a carcinogênese. A quimioprevenção se baseia na hipótese de que a interrupção dos eventos biológicos envolvidos na carcinogênese inibirá este processo e reduzirá a incidência de câncer” (BELTRAN-RAMIREZ et al., 2006).

De acordo com Sardo (2011) quimioprevenção do câncer é um termo que foi cunhado na década de 70 por Michael Sporn e é um conceito-chave para a prevenção da recorrência de câncer e prevenção primária de tumores secundários. Compostos polifenólicos presentes em frutas, legumes, ervas, raízes e folhas agem

como componentes bioativos e foram reconhecidos como agentes quimiopreventivos de câncer (LEE, PARK, 2003).

Cada vez mais as pesquisas mostram a interação positiva entre alimentos e saúde, mas o grau com que a dieta pode influenciar a prevenção de doenças não está totalmente definido. Entre os especialistas já é aceito que 1/3 dos casos de câncer e 1/2 das doenças cardiovasculares estão relacionados à dieta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), e as gorduras, especialmente as saturadas, seriam os principais componentes nutricionais associados a estas doenças, além de baixo consumo de fibras, vegetais e frutas. Tais características estão relacionadas principalmente ao estilo moderno de vida, comprovando assim, mais uma vez o papel dos alimentos funcionais como atributos específicos de saúde (ALISSA, FERNS, 2012).

O desenvolvimento de estratégias preventivas tem levado ao aumento da expectativa e qualidade de vida, de modo que a prevenção é hoje amplamente estudada. Sabe-se que, mais de 500 agentes químicos estão sendo analisados em relação a sua atuação na quimioprevenção do câncer, e cerca de 25 diferentes classes químicas apresentam este potencial. Portanto a quimioprevenção é definida como a administração de agentes que previnem a indução, inibem, cessam a progressão ou contribuem para a reversão ou inibição da carcinogênese em estágios pré-malignos (DE FLORA, FERGUSON, 2005).

A influência de componentes da dieta no desenvolvimento do câncer e do crescimento do tumor tem sido tema de investigações. A contrapartida também é verdadeira: a baixa incidência de doenças em alguns povos tem despertado interesse em relação à dieta alimentar. Por exemplo, os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega 3 e 6, têm apresentado baixo índice de problemas cardiovasculares. Assim como os franceses, devido ao consumo de vinho tinto, o qual apresenta grande quantidade de compostos fenólicos. Os orientais, devido ao consumo de soja, que contém fitoestrogênios, apresentam baixa incidência de câncer de mama. Nestes países, o hábito de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovada por dados epidemiológicos (ANJO, 2004). Essas evidências levaram a observar que os componentes químicos presentes nos alimentos podem apresentar atividade

biológica o qual auxilia na manutenção da saúde (ANGELIS, 2001).

O uso de determinados alimentos na redução de riscos de doenças crônicas não transmissíveis vem motivando o desenvolvimento de novas pesquisas que esclareçam os efeitos benéficos dos elementos fitoquímicos ou compostos bioativos das dietas (GAMARANO, FRAIGE FILHO, 2004).

A identificação de tais componentes, a compreensão de seus mecanismos de ação, bem como seu desenvolvimento e seu uso na alimentação humana estão entre os objetivos da ciência dos alimentos funcionais. Essas substâncias bioativas ou funcionais podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou serem adicionadas aos alimentos industrializados (MELO et al., 2004).

O conceito de alimentos funcionais surgiu no início dos anos 80, a partir da preocupação com os problemas de saúde associados ao aumento da expectativa de vida da população (GARCIA, 2004). Para Maynard e Franklin (2003), tais alimentos prometem ainda mais benefícios, além do valor nutricional básico. Moraes e Colla (2006) afirmaram que os alimentos funcionais são considerados promotores da saúde, pois além de suas propriedades nutricionais produzem benefícios específicos, tais como a redução dos riscos de diversas doenças degenerativas, diabetes, câncer, entre outras, e a manutenção do bem estar físico e mental, sendo apresentados na forma de alimentos comuns.

Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011) considera como alimento funcional “O alimento ou ingrediente com propriedades funcionais ou de saúde que pode, além das funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos, fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

Segundo Roberfroid (2005), para elaborar o conceito de alimento funcional, a Functional Food Science in Europe (FUFOSE), considera que o alimento funcional: (I) deve estar presente na alimentação diária, ou ser constituinte de algum alimento; (II) ter ocorrência natural nos alimentos; (III) prover efeitos benéficos, tais como a nutrição básica; (IV) fortalecer o organismo e/ou melhorar o bem estar e/ou diminuir os riscos de alguma doença e/ou melhorar a qualidade de vida.

Milner (2000) propõe que o aumento de interesse em alimentos funcionais está relacionado aos custos de tratamento de saúde, legislação e descobertas científicas. Sarkar (2007) afirma que existe uma tendência a utilizar os alimentos funcionais e que dentre os fatores responsáveis estão principalmente: (I) adultos

conscientes da saúde e com cuidado próprio; (II) custos de tratamento de saúde oscilantes associados a doenças crônicas advindas do envelhecimento; (III) avanços da tecnologia; (IV) mudanças nos regulamentos relacionados aos alimentos; (V) oportunidade de marketing; (VI) desenvolvimento de novas descobertas científicas em alimentos e/ou componentes alimentares para otimizar a saúde; (VII) novas tecnologias em processamento de alimentos, varejo e distribuição; (VIII) mudanças nas demandas do consumidor e nas atitudes sociais; (IX) evidências científicas nos benefícios de saúde de certos ingredientes; e (X) procura por novas oportunidades para adicionar valor a produtos existentes e para aumentar os lucros.

Os alimentos funcionais provêm à oportunidade de combinar produtos comestíveis de alta flexibilidade com moléculas biologicamente ativas como estratégia para, consistentemente, corrigir distúrbios metabólicos (WALZEM, 2004), resultando em redução dos riscos de doenças e manutenção da saúde (ANJO, 2004).

Dados epidemiológicos mostraram a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, neoplasias, diabetes, entre outras (CALABRESE et al., 2008; BALSANO, ALISI, 2009; YNGVE, 2009). Assim, o consumo de alimentos funcionais é um fator importante para a melhoria da qualidade de vida, não somente para a nutrição básica do organismo, mas também para a melhora dos efeitos metabólicos e fisiológicos, prevenindo o agravo causado por essas doenças e promovendo a saúde do indivíduo (AMARAL, 2006).

Diante desta correlação, são citadas as fibras alimentares, definidas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) como resíduos de células vegetais resistentes à hidrólise pelas enzimas alimentares humanas. No Brasil, o Ministério da Saúde, através da portaria nº 41, de 14/01/1988 define fibras alimentares como qualquer material comestível de origem vegetal que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano (HAULY, MOSCATTO, 2002).

Moraes e Colla (2006) afirmam que as fibras alimentares são compostos vegetais presentes na parede celular de plantas, que inclui os poli e oligossacarídeos não amido. A fibra alimentar é conhecida pelos efeitos positivos que traz para a saúde de um modo geral. Elas podem ser classificadas como

solúveis, insolúveis ou mistas, podendo ser fermentáveis ou não-fermentáveis (CHERBUT, 2002). Estudos ressaltaram a ação da fibra alimentar e frutoligossacarídeo inulina, um prebiótico que apresenta estudos nos quais sugerem que seu consumo diminui o câncer de cólon, passando assim pelo primeiro crivo de identificação da funcionalidade deste alimento (FEMIA et al., 2002).

A dieta pode possuir um grande efeito ao modular as várias funções do organismo. Visto que, hoje em dia, a nutrição enfatiza o uso promissor dos alimentos para uma redução no risco de doenças e promoção do bem-estar, em particular os alimentos funcionais.

1.2 INULINA

1.2.1 Propriedades Gerais

Dentro deste contexto, destaca-se o papel da inulina como ingrediente de alimento funcional, pois interfere beneficemente em vários processos fisiológicos e bioquímicos nos seres humanos, promovendo melhoria na saúde e redução no risco de muitas doenças, em especial adenocarcinoma de cólon e doença de Crohn. (KAUR, GRUPTA, 2002).

O termo “alimentos funcionais”, introduzido no Japão em meados dos anos 80, refere-se aos alimentos processados, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo, além de serem nutritivos, definidos ainda como “alimentos para usos específico de saúde”, do inglês *Foods for Specified Health Use* – FOSHU. Estes, por sua vez, têm efeitos específicos sobre a saúde, devido a sua constituição química e não expõe ao risco de saúde (MORAES, COLLA, 2006).

Nas últimas décadas, o conceito de alimentos funcionais tem oferecido uma abordagem nova e prática para proporcionar benefícios à saúde, promovendo o uso de produtos com compostos biologicamente ativos que reduzem o risco de várias doenças crônicas (SHAHIDI, 2009).

Ingredientes alimentares formados por hidratos de carbono, não digeríveis, denominados prebióticos, influenciam bactérias específicas apresentando efeito favorável para a microbiota intestinal do hospedeiro, estimulam seletivamente o crescimento de bactérias benéficas no cólon e servem de alimento para probióticos (bactérias intestinais) (NAIR et al., 2010).

Segundo estudos, para que um composto seja considerado prebiótico deve atender a alguns requisitos, ser classificado como composto resistente ao trato gastro intestinal, não digerido por enzimas, sais e ácidos, seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrintestinal (TGI), cumprindo ainda requisitos como a origem vegetal; constituir parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas; estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (RODRÍGUEZ et al., 2003; GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROY, GIBSON, 1999). Dentre estes, destacam-se alguns exemplos de oligossacarídeos como a oligofrutose e a inulina, prebióticos que conduzem a um aumento significativo do número de bifidobactérias (OLIVEIRA, 2006a).

Nesta classe de alimentos funcionais também se encontram as fibras ou oligossacarídeos capazes de resistir ao processo digestivo, chegando ao intestino para serem fermentados pelas bactérias da microbiota intestinal. Estes compostos também auxiliam no alívio da constipação intestinal, visto que absorvem água ou ainda outros compostos facilitando a eliminação tanto de bactérias patogênicas do nosso intestino quanto do bolo fecal, como afirma Santos e Cançado (2009).

As fibras dietéticas e os oligossacarídeos não digeríveis são os principais substratos de crescimento dos microrganismos dos intestinos. Estes estimulam o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana, tais como as *Bifidobactérias* e os *Lactobacillos*, que são benéficos para a saúde humana (BLAUT, 2002; MORAES, COLLA, 2006). Os frutoligossacarídeos (FOS), além das propriedades descritas, reduzem a atividade de organismos potencialmente patogênicos promovendo seletivamente o crescimento de probióticos (ROBERFROID, 2002), características pelas quais, promovem uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer, como o adenocarcinoma de cólon (PASSOS, PARK, 2003).

Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (ROBERFROID, 2001; GILLILAND, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Na fermentação de prebióticos há produção de ácidos lácticos, ácidos graxos de cadeia curta e gases, que alteram o pH do meio, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas. O consumo regular deste tipo de alimento está

relacionado à diminuição de níveis de colesterol, prevenção de câncer de cólon, tratamento de pacientes imunodeprimidos, tratamento contra diarreias, entre outros efeitos biológicos da inulina.

Os frutanos do tipo inulina dividem-se em dois grupos gerais: a inulina e os compostos a ela relacionados - a oligofrutose e os FOS. A inulina, a oligofrutose e os FOS são grupos quimicamente similares, com as mesmas propriedades nutricionais. Essas semelhanças químicas e nutricionais são conseqüentes à estrutura básica (ligações β (2 \rightarrow 1) de unidades frutossil), bem como à sua via metabólica em comum, diferenciando-se pelo grau de polimerização, ou seja, o número de unidades individuais de monossacarídeos que compõem cada molécula (CARABIN, FLAMM, 1999 *apud* SAAD, 2006).

Quimicamente, a inulina (Figura 01) é um tipo linear de carboidrato polidisperso, constituída por subunidades de frutose, ligadas entre si através de ligações frutíl-frutose β (2 \rightarrow 1), com uma unidade de glicose terminal (HAULY, MOSCATTO, 2002; ROBERFROID, 2005; SAAD, 2006).

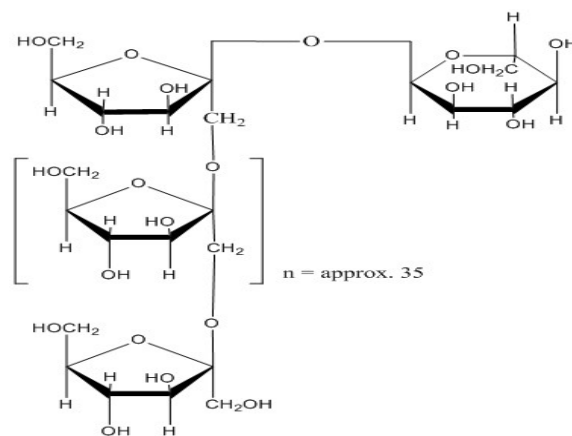


FIGURA 01 – Estrutura Molecular da Inulina (adaptado de RENHE, 2008).

Encontrada na natureza, a inulina está presente em uma grande variedade de plantas, destacando-se a chicória, alho, alcachofra, aspargo, cebola, banana, trigo, cevada e centeio, conforme Tabela 01 (HAULY, MOSCATTO, 2002; ROCHA et al., 2006). Entretanto, o único vegetal que tem sido até agora utilizada industrialmente para a extração do frutano inulina pertence à família *Compositae*, como por exemplo, a *Cichorium intybus*, popularmente conhecida como chicória (ROBERFROID, 2005).

Tabela 1 - Quantidade de inulina em plantas utilizadas na alimentação humana.

Plantas	Parte comestível	Inulina (% do peso fresco)
Cebola	Bulbo	2 – 6
Alcachofra de Jerusalém	Tubérculo	16 – 20
Chicória	Raiz	15 – 20
Alho-poró	Bulbo	3 – 10
Alho	Bulbo	9 – 16
Alcachofra	Folhas centrais	3 – 10
Banana	Fruta	0,3 – 0,7
Centeio	Cereal	0,5 – 1
Cevada	Cereal	0,5 – 1,5
Yacon	Raiz	3 – 19
Trigo	Cereal	1 – 4

Fonte: adaptada de Van Loo et al. (1995); Moshfegh et al. (1999) *apud* Hauly, Moscatto (2002, p.107).

Conforme descrito anteriormente, o termo oligofrutose é frequentemente empregado para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina extraída da chicória. Já o termo frutoligossacarídeo tende a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (SAAD, 2006). Logo, o termo inulina é empregado para identificar os frutanos do tipo inulina, provenientes da extração industrial da raiz da chicória.

Segundo Lattimer e Haub (2010), os produtos de inulina podem ser utilizados como substituto de gordura sem afetar o sabor e textura e podem ainda manter o valor nutricional dos alimentos.

Conforme já mencionado, a inulina resiste à digestão na porção superior do trato digestório, sendo significativamente fermentada no cólon, e apresentando assim, propriedades fermentativas diferentes de outras fibras, já que a maior parte de seus efeitos é processada essencialmente na microbiota intestinal pela modificação desta. Portanto a inulina afeta beneficemente a composição da microbiota intestinal, as funções da mucosa, as atividades endócrinas e a absorção de minerais (ROBERFROID, 2007; LATTIMER, HAUB, 2010).

1.2.2 Efeitos Biológicos da Inulina

Diversas ações fisiológicas elevam a inulina a cargo de alimento prebiótico, como a melhora do fluxo intestinal e aumento do peristaltismo do intestino grosso, fatos que diminuem a constipação intestinal em seres humanos adultos. Outro evento fisiológico relacionado é a redução do pH nos conteúdos do íleo, ceco e cólon, permitindo um aumento na concentração de minerais ionizados. Esta condição facilita a difusão passiva, a hipertrofia das paredes do ceco e o aumento da concentração de ácidos graxos voláteis, sais biliares, cálcio, fósforo, fosfato e, em menor grau, magnésio. Kaur e Grupta (2002) destacam também que o consumo da inulina proveniente da chicória, quando aumentado, favorece a entrada de cálcio nos tecidos ósseos melhorando a densidade mineral óssea e mostrando que tem o potencial de prevenir inclusive a osteoporose.

Ácidos graxos de cadeia curta, oriundos da degradação da inulina, possibilitam vários benefícios à saúde, entre eles destacam-se a diminuição do pH luminal, redução do número de vários patógenos, aumento da absorção mineral, absorção adequada de água e sódio, prevenção de colite, diferenciação celular (diferencia células normais de células tumorais/críptas aberrantes), proliferação celular da mucosa e auxílio na circulação sanguínea da mucosa beneficiando a nutrição celular (NAIR et al., 2010).

Quando fermentada, a inulina tende a favorecer a produção de propionato, que por sua vez, reduz a relação acetato propionato conduzindo a uma diminuição do colesterol sérico total e de LDL (Lipoproteína de baixa densidade), fatores de risco importantes para as doenças cardiovasculares, auxiliando assim, na prevenção e tratamento da obesidade (LATTIMER, HAUB, 2010).

Entre os seus atributos nutricionais, o frutoligossacarídeo inulina se encaixa em duas classes, as fibras dietéticas e os prebióticos. Ambas as classes possuem em diferentes graus, atividades quimioprotetoras e antitumorais.

Roberfroid (2002) afirma que o único prebiótico que fornece dados suficientes para permitir uma avaliação de sua ação são as frutanas, dentre elas a inulina. Em 2005, Roberfroid ressaltou que a inulina escapa praticamente intacta, da digestão do trato gastrointestinal superior, sendo posteriormente fermentada, e a partir de então agindo como alimento prebiótico.

Os frutanos do tipo inulina também se destacam por influenciar benéficamente o sistema imune, principalmente as funções imunes intestinais, tendo como alvo os tecidos linfoides associados ao intestino (especialmente as placas de Peyer) e, conseqüentemente demonstram redução no risco de doenças relacionadas à disfunção das defesas gastrointestinais (ROBERFROID, 2005).

Em estudos com ratos foi demonstrado que a administração de inulina suprimiu significativamente o número de focos de criptas aberrantes no cólon, quando comparados à dieta controle. Criptas aberrantes são lesões precursoras putrefativas, a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver. Deste modo, o papel desempenhado pela inulina na redução das criptas aberrantes, um marcador pré-neoplásico precoce do potencial maligno no processo de carcinogênese do cólon sugere que tenha potencial para suprimir esta doença (STEFE et al., 2008).

Segundo Ferguson (1994), algumas fibras presentes na dieta podem atuar como antimutágenos. As fibras dietéticas preparadas a partir do parênquima celular de frutas e vegetais apresentam capacidade adsorviva, desta forma, quanto mais hidrofóbica (menor a hidrólise da fibra), melhor a capacidade da fibra em adsorver a substância indutora de mutações.

Outra hipótese para explicar mais um efeito benéfico da inulina seria o aumento dos níveis séricos de glutamina. Isso seria possível devido à fermentação da inulina e conseqüente produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais servem de substrato para a mucosa colônica (bifidobactérias), poupando dessa forma a glutamina, considerada substrato preferencial para o sistema linfático. Este, por sua vez, relaciona-se diretamente com as funções de defesa, podendo assim, melhorar o sistema imune sob várias circunstâncias (OLIVEIRA, 2006a). Estudos realizados verificaram a capacidade quimiopreventiva da glutamina, reforçando a ideia de que a inulina desencadeia fatores que levam a quimioprevenção. Vicentini (2006) sugere a ação deste aminoácido como antioxidante coadjuvante no tratamento do câncer, diminuindo a frequência de micronúcleos e assim sugerindo uma ação antígeno-tóxica em camundongos tratados com cisplatina.

A inulina não atua apenas através de sua capacidade fermentativa, Roland et al. (1996) demonstraram capacidade aumentada de detoxificação do fígado (citocromo P-450) em ratos alimentados com inulina. A produção de glutathione-S transferase e glucoroniltransferase foi aumentada, sugerindo um papel importante

contra produtos carcinogênicos, uma vez que estas enzimas atuam como metabolizadoras de xenobióticos.

Estudos adicionais revelam a ação da inulina na regressão de tumores mamários e pulmonares, mas com mecanismos ainda não descritos (ROBERFROID, 2002), aumentando assim, o leque de possibilidades de ação deste frutano e a necessidade de melhor estudá-lo, entendendo seus mecanismos de ação.

Em adição aos seus demais benefícios, a influência protetora e inibitória da inulina no desenvolvimento do câncer e crescimento de tumores vem sendo muito discutida. Segundo Roberfroid (2005), modelos experimentais mostraram que, suplementando a dieta com frutanos do tipo inulina, ocorre redução de infecções sistêmicas; retardo no crescimento tumoral; redução da incidência de metástase e potencialização da terapia do câncer.

Cooper e Carter (1986) *apud* Hauly e Moscatto (2002) demonstraram a atividade imuno-estimulante da inulina em ratos. A ingestão desta resultou em um aumento na produção de macrófagos levando a morte de células cancerosas.

Kaur e Gupta (2002) inferem que a inulina inibe as lesões neoplásicas mudando a composição da flora intestinal. As bifidobactérias podem ligar-se aos carcinógenos, fisicamente removendo-os através das fezes. Além disso, entre os produtos finais de sua fermentação, observou-se a ação do lactato. O aumento do ácido láctico, modula enzimas bacterianas tais como a β -glucoronosidase.

Hughes e Rowland (2001) mostraram que a apoptose foi significativamente maior no cólon de ratos alimentados com inulina e oligofrutose quando comparado com o grupo padrão alimentado com dieta basal. Ademais, fatores que aumentam a apoptose podem reduzir as chances de formação de tumor de cólon.

Entre os ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela fermentação da inulina, o butirato se destaca pela capacidade de inibir a proliferação de um grande número de células *in vitro*, inclusive de células tumorais. Embora a atuação do butirato não seja o único mecanismo pelo qual a inulina pode inibir o câncer de cólon, pode explicar em parte porque este agente parece ser protetor. Adicionalmente à sua ação supressora na proliferação celular, o butirato é capaz de inibir a síntese de DNA, regulando, assim, a diferenciação terminal de células neoplásicas (CHERBUT, 2002; HAULY, MOSCATTO, 2002).

A inulina também atua como sinergista probiótico ao melhorar a sobrevivência, a implantação e o crescimento de bactérias vivas que se agregam à dieta do indivíduo

e promovem saúde. Observam-se efeitos benéficos no metabolismo de lipídios com a modificação da flora intestinal, surgindo a evidência de que uma combinação de probióticos (bifidobactérias e lactobacilos) e prebióticos (inulina) em indivíduos saudáveis promovem a redução do colesterol (ANDERSON, HANNA, 1999; MENNE, GUGGENBUHL, 2000; DE ROSS, KATAN, 2000).

Na obtenção dos chamados alimentos simbióticos, combinados de probióticos e prebióticos, há potencialização dos efeitos benéficos ao organismo. Produtos com tais ações funcionais possuem um efeito sinérgico, onde há melhores resultados no desenvolvimento de bactérias fermentadoras destas fibras, como sugerem Stefe (2008) e colaboradores. Essa união traz mais benefícios aos seres humanos do que apenas ingeri-los individualmente, pois os probióticos, na maioria das vezes, já estão adaptados aos prebióticos, o que fortalece essas bactérias e sua adaptação à microbiota intestinal humana, favorecendo sua multiplicação e sua ação funcional (BADARÓ et al., 2008).

As propriedades funcionais dos probióticos e prebióticos não se limitam apenas aos seres humanos, mas também são usadas na alimentação de aves, por exemplo. A baixa diversidade microbiana na microbiota intestinal das aves afeta não só o crescimento das mesmas, mas também favorece o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. O uso de simbióticos permite a resolução desse problema sem o uso de medicamentos, pois fortalecem o sistema autoimune dos animais e melhoram sua qualidade de vida, resultando assim em produtos cárneos de boa qualidade para o consumidor (MAIORKA et al., 2001). As buscas por alternativas como prebióticos, probióticos e simbióticos em substituição aos antibióticos vêm sendo enfatizadas na alimentação animal, pois estes além de proporcionarem uma modulação benéfica da microbiota intestinal, atuam na diminuição do estresse biológico (MURAROLLI, 2008).

O objetivo deste texto foi expor instrumentais teóricos para melhor refletir o papel da inulina frente a diferentes efeitos biológicos e sua influência junto ao sistema imunológico, que em última análise explica o caráter imprescindível e a necessidade de uma revisão proposta e realizada através do Artigo 01 em anexo.

1.3 CÉLULAS T REGULATÓRIAS

As Tregs representam uma linhagem de células T CD4⁺ que desempenham um papel indispensável para a manutenção da não responsividade imunológica a antígenos próprios e na supressão de respostas imunes excessivas, que são prejudiciais ao hospedeiro. Contudo, também podem limitar respostas benéficas, ao suprimir a imunidade ou limitar a imunidade antitumoral, por exemplo (SAKAGUCHI et al. 2008; TOKER; HUEHN, 2011; VIGNALI, COLLISON, WORKMAN, 2008).

Respostas eficientes contra a invasão de microrganismos patogênicos são conseguidas através da coordenação e sinalização de complexas redes que interligam a resposta imune inata e adaptativa. Após interação do antígeno com as células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas (DC), células TCD4⁺ diferenciam-se em uma variedade de subpopulações de células efetoras, que incluem as células clássicas Th1, Th2 e Th17 (ZHOU et al., 2007).

A diferenciação destes tipos celulares é predominantemente governada pela presença de citocinas no microambiente, bem como pela interação do receptor, presente nas células T com antígenos (BOYTON, ALTMANN, 2002). Células Th1 são caracterizadas pela produção de interferon gama (INF- γ), envolvidas na imunidade celular contra microrganismos intracelulares. A IL-12, produzida por células da imunidade inata, bem como interferon-gama (INF- γ), produzido por células *natural killer* (NK) e células T, polarizam a diferenciação de células Th1 através da ativação e ação do fator de transcrição Stat-4, Stat-1 e o fator de transcrição T Box (T-bet). As células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 atuando na imunidade humoral, para controle de helmintos e outros patógenos extracelulares. Sua diferenciação requer a ação de GATA-3 e Stat-6. Por fim, as células Th17 produzem IL-17 e IL-22 desempenhando papel importante contra bactérias extracelulares e fungos, em especial nas superfícies mucosas. A diferenciação das células Th17 requer ativação do fator de transcrição ROR[γ], induzido por uma combinação de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-21 e IL-23 com fator de transformação do crescimento (*TGFB*), através da fosforilação de Stat-3 (CHEN et al., 2007).

As células T regulatórias (Tregs) são componentes importantes da tolerância imunológica, podendo esta ser central, quando induzida nos órgãos linfoides primários, em consequência ao reconhecimento dos antígenos próprios pelos

linfócitos T imaturos; ou periférica, através de células T maduras que reconhecem especificamente os antígenos próprios presentes nos tecidos periféricos (ABBAS, 2011; MELO, CARVALHO, 2009).

Entre os mecanismos de tolerância periférica existem várias populações celulares específicas com função regulatória, importantes na modulação dos processos de eliminação de patógenos e antígenos tumorais. Segundo Cruvinel et al. (2008), para exercerem sua função, as células Tregs apresentam como propriedades básicas, a capacidade de produzir citocinas imunossupressoras como a IL-10 e TGF- β , além da capacidade de indução de supressão mediada por contato célula-célula. Sabe-se ainda, que a geração e sobrevivência das células Tregs é dependente das citocinas TGF- β e IL-2.

De modo particular, entre as células T com função imunorregulatória, tem havido destaque para as células Tregs de ocorrência natural, Tregs CD4⁺ CD25⁺, descritas por Sakaguchi (2005), potencialmente capazes de suprimir a ativação, a proliferação e/ou função efetora dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e, possivelmente células NK, NK/T, linfócitos B e células dendríticas (VON BOEHMER, 2005).

As células Tregs de ocorrência natural estão relacionadas com a manutenção da autotolerância e são de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imune (BAECHER, HAFLER, 2005). São comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos autoreativos nos tecidos periféricos e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e autoantígenos. Representam de 5 a 10% do total de células CD4⁺ no sangue periférico (SAKAGUSHI, 2006).

Estudos iniciais caracterizavam fenotipicamente as Tregs com base apenas na expressão constitutiva de marcadores CD4 e CD25 (SAKAGUSHI et al., 2008). Do ponto de vista molecular, Hori, Nomura e Sakagushi (2003) demonstraram que o fator de transcrição *FOXP3* é predominantemente expresso nas Tregs tímicas e periféricas.

Dentro deste contexto, as Tregs representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25⁺ e do fator nuclear *FOXP3*, sendo descritas pelo menos dois tipos, as Tregs naturais, que representam de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas (SAKAGUSHI, 2005) e adaptativas. Atuam na supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função

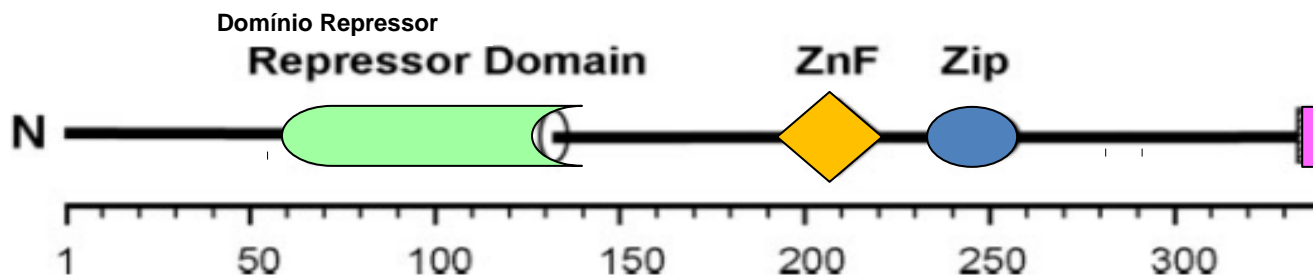
destas células e ainda desempenhando importante papel no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não próprios (CAMPBELL, ZIEGLER, 2007; SOJKA, HUANG, FOWELL, 2008).

1.3.1 Fator de Transcrição *FOXP3*

O *FOXP3* “*transcription factor forkhead FOXP3*” é um membro da família *forkhead* de fatores de transcrição, expresso principalmente por um subtipo de células T CD4⁺ que expressam CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2), conhecido como células T regulatórias (Tregs), desempenhando um papel importante na diferenciação, desenvolvimento, manutenção e função deste importante subtipo celular (CAMPBELL, ZIEGLER, 2007; SAHIN, SAHIN, KOKSOY, 2013).

O gene *FOXP3* foi identificado em 2001, como causador de doenças em camundongos *Scurfy*, que desenvolviam autoimunidade/inflamação aguda quando possuíam uma única mutação sobre o cromossomo X (BRUNKOW et al., 2001). Este gene possui um comprimento de 1296 pares de bases e consiste de 11 diferentes éxons. Está localizado no braço curto do cromossomo X (Xp11.23), e codifica uma proteína de 431 aminoácidos (GAMBINERI et al. 2003; FONTENOT et al. 2005a; BAN et al. 2007; TORGERSON, OCHS, 2007).

A proteína *FOXP3* (Figura 02) possui três domínios funcionais: um repressor, correspondente à região N-terminal composta por dedos de zinco e rica em prolina, necessária para suprimir a transcrição (200-223 aminoácidos), um zíper de leucina na região central da molécula, necessária para homo e hetero dimerização da proteína (240-261 aminoácidos) e um domínio *forkhead* carboxi-terminal, necessário para a ligação do *FOXP3* ao DNA e para importação nuclear (338-421 aminoácidos) (LOPES et al. 2006; CAMPBELL, ZIEGLER, 2007).



Repressão de Fatores de Transcrição

Fonte: Hori, Sakagushi, 2003.

FIGURA 02. Representação da Proteína FOXP3.

Estudos têm mostrado que o *FOXP3* se liga na região promotora de 700 a 1100 genes, muitos deles associados com a sinalização do receptor de células T (TCR), podendo agir tanto como ativador quanto repressor transcricional (MARSON et al. 2007; ZHENG et al. 2007).

Polimorfismos no gene *FOXP3* podem alterar a proteína funcionalmente ou quantitativamente, levando a perda de Tregs funcionais, resultando em algumas doenças autoimunes (WILDIN et al. 2002), tais como a síndrome IPEX (imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X) (VAN DER VLIET, NIEUWENHUIS, 2007), diabetes tipo I (BASSUNY et al., 2003) e doenças autoimunes da tireoide (BAN et al. 2007).

Vários marcadores de superfície têm sido utilizados para identificar as células Tregs naturais, porém, até o momento, somente o fator de transcrição FOXP3 é um marcador intracelular encontrado nas células Tregs (HORI, NOMURA, SAKAGUCHI, 2003; FONTENOT et al., 2005b; YI et al., 2006). Além disso, o *FOXP3* é um fator de transcrição crucial para o desenvolvimento e funcionalidade das células Tregs CD4⁺CD25⁺. É descrito que uma mutação do *FOXP3* resulta na ausência de células Tregs naturais e consequente desenvolvimento de doenças autoimunes (WILDIN, FREITAS, 2005; WILDIN, SMYK-PEARSON, FILIPOVICH, 2002).

Novos trabalhos associaram mais complexidade às funções supressoras das células Tregs. Sugeriu-se que para estas células exercerem sua função supressora

e migrar para o foco inflamatório frente a respostas do padrão Th1, Th2 ou Th17, precisem co-expressar o *FOXP3* e os fatores de transcrição T-bet (padrão Th1), IRF-4 (padrão Th2) ou STAT-3 (padrão Th17), conforme padrão inflamatório presente no tecido alvo (CHAUDHRY et al., 2009; KOCH et al., 2009; ZHENG et al., 2009).

Além do marcador CD25, as Tregs naturais também expressam outros marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação destas células, entre os quais se destaca o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), pois acredita-se que seu bloqueio possa afetar a função das Tregs, GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*) e HLA-DR (*human leucocyte antigen*) (READ et al., 2006; GRUPTA, SHANG, SUN, 2008). Estudos ainda mencionam outros receptores de superfície como o CD27, Fas, CD62L; e os receptores de quimiocina CCR6, CCR7, CCR8, CD103, que permitem a migração das Tregs até o local da resposta inflamatória (BACCHETTA, GAMBINERI, RONCAROLO, 2007; GRUPTA, SHANG, SUN, 2008).

As Tregs podem atuar suprimindo a resposta imune tanto por meio de fatores solúveis como o TGF- β e a IL-10, quanto por meio de um mecanismo dependente de contato célula a célula, como mediados pelo CTLA-4 (READ et al., 2006; YOU et al., 2007).

Segundo Yagi et al. (2004), a descoberta do fator de transcrição *FOXP3* no desenvolvimento e função das Tregs foi crucial para melhor caracterizá-las. Sendo o *FOXP3* um marcador nuclear, o receptor de IL-7 (CD127), que é regulado negativamente pelo *FOXP3*, tem sido descrito como um marcador de superfície fidedigno para selecionar as Tregs dentre a subpopulação de linfócitos T, além de caracterizar aquelas com maior função supressora (NDHLOVU et al., 2008). O referido fator é expresso predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos e particularmente nas células T CD4⁺ CD25⁺ (YAGI et al., 2004; TORGERSON, OCHS, 2007).

Conforme descrito anteriormente, as Tregs podem ainda ser adaptativas, quando geradas na periferia após uma variedade de estímulos antigênicos ou em condições ditas tolerogênicas (BACCHETTA, GAMBINERI, RONCAROLO, 2007; TAAMS et al., 2006). São células que exercem sua função através da expressão de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (SAKAGUCHI, 2006).

Acredita-se que o *FOXP3* exerça funções efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular (TORGERSON, OCHS, 2007). A sinalização nuclear através do *FOXP3* nas Tregs não está bem definida. De acordo com estudos experimentais, após a ligação do antígeno com o receptor de célula T (TCR), há uma atenuação na sinalização celular em decorrência da interação física de fatores nucleares NF- κ B e NFAT com o *FOXP3*, reprimindo os genes de transcrição das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ (MELO, CARVALHO, 2009).

De acordo com Sojka (2008), Tang e Bluestone (2008), embora os mecanismos utilizados pelas Tregs para exercer a função supressora ainda não estejam esclarecidos, postula-se que existam pelo menos três mecanismos de atuação destas células, contato célula-célula, dependente da interação entre a Treg com a célula T CD4⁺ efetora; liberação de citocinas inibitórias, demonstrada em modelos experimentais (PICCIRILLO, 2008) pelo papel das citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β regulando a resposta imunológica; e a terceira forma de atuação das Tregs seria a competição por fatores de crescimento, em especial a IL-2, com as células-alvo, levando assim à apoptose celular por privação de citocinas.

Em recente revisão, foi descrita a descoberta de 2 novos subtipos de células T reguladoras FOXP3⁺ derivadas do timo (LOURENÇO, LA CAVA, 2011). Tais células têm sido identificadas com base na expressão de moléculas co-estimulatórias (ICOS). Pesquisas demonstraram que células com fenótipo ICOS⁺FOXP3⁺ são caracterizadas pela alta capacidade de produzir IL-10, enquanto as células com fenótipo ICOS⁻FOXP3⁺ são caracterizadas pela alta capacidade de produzir TGF- β . Ambas as subpopulações celulares parecem utilizar os mecanismos dependentes ou independentes do contato célula-célula para o desenvolvimento da supressão imunológica na periferia (ITO et al., 2010).

Estudos têm correlacionado a ação das Tregs em diferentes doenças, tornando estas células uma opção terapêutica em doenças alérgicas, autoimunes, neoplásicas e infecciosas (CHAI et al., 2005; TAAMS et al., 2006). Trabalhos sobre Tregs, em neoplasias malignas, ainda sugerem que o aumento na atividade destas células associa-se a uma resposta prejudicada na imunidade antitumoral. Há co-estimulação deficiente das células T CD4⁺ sobre as células T CD8⁺, bem como alteração na citotoxicidade mediada por células NK contra os antígenos tumorais (ABBAS, LICHTMAN, 2011; TAAMS et al., 2006). Uma das formas de inibição das Tregs sobre as células efetoras da imunidade tumoral é a liberação das citocinas IL-

10 e TGF- β . Taams et al. (2006), inferem ainda que a inibição da função das Tregs pode ter resultados positivos, como estratégia terapêutica para o tratamento do câncer.

O fator de transcrição FOXP3 controla diretamente ou indiretamente a expressão de moléculas responsáveis por conferir a função supressora das células Tregs. Trabalhos desenvolvidos por Ohkura e Sakagushi (2011) descreveram que o FOXP3 regula diretamente a expressão dos fatores de transcrição Blimp-1 e IRF-4 que estão relacionados com a expressão das moléculas presentes em células Tregs. De modo que, o fator de transcrição IRF-4 participa da ativação dos genes da IL-10, CCR6 e ICOS, enquanto o fator Blimp-1, associado a ativação de IRF-4, participa da ativação direta do gene da IL-10 e indiretamente dos genes de ICOS e CCR6.

Até o presente momento sabe-se que as células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras podem ser ativadas por antígenos próprios ou não próprios e, uma vez ativadas, podem suprimir células T de maneira não antígeno-específica. Os efeitos supressivos destas células não são restritos ao sistema imune adaptativo (células T e B), e podem influenciar a ativação e função de células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos, células dendríticas). As células Tregs adaptativas são induzidas por antígenos, desenvolvem-se na periferia e exercem sua função através da secreção de citocinas inibitórias como IL-10, TGF- β e recentemente IL-35 (COLLISON et al., 2007) ou as APC por interações célula-célula (MAROLY, POWRIE, 2001).

1.3.2 Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF- β)

O TGF β compreende um grupo de proteínas diméricas altamente conservadas, com um peso molecular de aproximadamente 25 kDa (ROBERTS, SPORN, 1993), pertence a família das citocinas e é conhecido por regular diferentes processos celulares envolvidos na carcinogênese, incluindo proliferação celular, diferenciação, motilidade, adesão e morte (LE MARCHAND et al., 2004; SHIN et al., 2005). Descoberto como um produto tumoral, o TGF- β está relacionado à promoção e sobrevivência de células tumorais *in vitro*, compreende uma família de moléculas muito próximas codificadas por genes distintos. Dentre as isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, destaca-se a TGF- β 1, conhecida por ser expressa em células endoteliais, hematopoiéticas e tecido conjuntivo (LEE et al., 2005).

As células do sistema imunológico sintetizam principalmente o TGFB1, proteína homodimérica sintetizada e secretada por células T reguladoras CD4⁺, macrófagos ativados e outros tipos de células. Segundo Klass et al. (2009), o receptor de TGFB1 consiste em duas proteínas diferentes, TGF-βRI e TGF-βRII, as quais fosforilam fatores de transcrição chamados SMAD. Assim, na ligação com a citocina, um domínio de TGF-βRI fosforila SMAD2 e SMAD3, que se transloca com SMAD4 para o núcleo, liga-se aos genes promotores alvos e regula sua transcrição. São ubiquamente expressos em células eucariotas e normalmente segregado para o meio extracelular numa forma inativa, tornando-se ativados em resposta a estímulos apropriados (ANNES et al., 2003).

A geração e sobrevivência de células Tregs é dependente das citocinas TGF-β e IL-2. TGF-β estimula a expressão de *FOXP3*, o fator de transcrição que leva à diferenciação de células T para linhagem reguladora, destacando sua importância relacionada a este contexto. A citocina IL-2, também envolvida na promoção e diferenciação das células Tregs, atua para sobrevivência e manutenção desta subpopulação celular e ativa o fator de transcrição STAT-5, que pode aumentar a expressão de *FOXP3* (YOU et al. 2007).

As células Tregs parecem suprimir respostas imunológicas em múltiplas etapas, na indução da ativação da célula T em órgãos linfoides e na etapa efetora destas respostas em tecidos. O TGF-β apresenta funções importantes e diferenciadas junto ao sistema imunológico, entre as quais se destacam a inibição da proliferação e funções efetoras das células T, bem como a ativação de macrófagos (KIM et al., 2003).

O TGF-β desempenha um papel indispensável, contudo complexo, na carcinogênese e a progressão de tumores (BENSON, 2004). No que diz respeito às células imunes, é reconhecido como uma citocina imunossupressora, inibindo respostas imunes. Além disso, o TGF-β desempenha um papel central na geração e na função das células CD4⁺CD25⁺. Ressalta-se também que o efeito final do TGF-β em células imunes é fortemente dependente do microambiente e da presença de outros fatores e citocinas (LEE et al., 2005). Maharaj et al. (2008), destacam um papel fundamental deste fator na manutenção da integridade vascular. Este processo envolve, provavelmente, um nível basal de sinalização endógena, protegendo contra o desenvolvimento de lesões neoplásicas precoces.

Como descrito anteriormente, o desenvolvimento de células T reguladoras FOXP3⁺ periférica, depende de TGF- β (READ et al., 2006; YOU et al., 2007). Entretanto, a combinação com outras citocinas, como IL-1 e IL-6, regula a diferenciação de subtipos funcionais diferentes de células T, como a Th17, em virtude de induzir o fator de transcrição ROR[γ]t.

Destaca-se também a habilidade do TGF- β em promover o reparo de tecidos depois que reações imunológicas e inflamatórias diminuem. Esta função é mediada pela habilidade desta citocina em estimular a síntese de colágeno e a produção de enzimas modificadoras de matrizes por macrófagos e fibroblastos e pela promoção de angiogênese (ABBAS, LICHTMAN, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico e os efeitos da inulina na modulação do sistema imune, *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar o potencial citotóxico da inulina, através de análises dos níveis plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e MDA (malondialdeído), e por análise histopatológica, *in vivo*.

✓ Avaliar o dano potencial causado pela inulina através da análise de LDH liberado pelas células polimorfonucleares do sangue periférico (PBMCs) em cultura.

✓ Avaliar o efeito da inulina na expressão gênica de FOXP3 e TGF- β de PBMCs em cultura por PCR quantitativo;

- ✓ Avaliar o efeito da inulina na secreção de TGF- β pelas PBMCs por ELISA.

Produção Científica

Apêndice A - Artigo 01

Review published in 2011, 1-11, First article, by **Food and Agricultural Immunology**
Inulin: therapeutic potential, prebiotic properties and immunological aspects

Food and Agricultural Immunology

2011, 1-11, First article

Inulin: therapeutic potential, prebiotic properties and immunological aspects

Karina de Almeida Gualtieri^{a,b}, Roberta Losi Guembarovski^a, Julie Massayo Maeda Oda^a, Leandra Fiori-Lopes^a, Natalia Ketelut Carneiro^a, Vania Darc de Castro^a, Jamil Soni Neto^a and Maria Angelica Ehara Watanabe^{a*}

^aDepartment of Pathological Sciences, Biological Sciences Centre, State University of Londrina, Campus Universitario, Londrina PR 86060-220, Brazil;

^bDepartment of Biomedicine, Filadelfia University, Londrina, PR, Brazil.

(Received 12 May 2011; final version received 11 November 2011)

The protective influence of dietary components on diseases development is a topic of major interest. Identification of such dietary components, understanding of their mechanisms of action as well as their development and use in human diet are some of the objectives of functional food science. Inulin oligosaccharides are among the substrates considered as prebiotic for their non-digestible carbohydrate properties often found in many vegetables, fruits and cereals. There is convincing data to suggest that consumption of prebiotics such as inulin can modulate immunological parameters in gut-associated lymphoid tissues, micro-flora and may present potential health implications in protection against colon diseases. This

review shows the prebiotic properties, therapeutic potential and immunological aspects of inulin.

Keywords: inulin; prebiotics; colon disease; immunity.

Introduction

Prebiotics are a category of nutritional compounds that selectively promote selectively the growth of bacteria known to confer health benefit to the host. The potential health benefits of prebiotics have been investigated, with special interest in the effects on the immunological system, the host's ability to fight infection and inflammatory processes and conditions (Lomax & Calder, 2009). Substrates considered prebiotics include the oligosaccharides inulin, fructooligosaccharides (FOS), galacto-oligosaccharides (GOS) and lactulose (Sherman et al., 2010).

Inulin-type fructans containing prebiotics form a category of nutritional compounds naturally occurring in plants, in which one or more fructosyl-fructose linkages comprise the majority of glycosidic bonds. Inulin and its derivative compounds (oligofructose, FOS) are usually called fructans because they are essentially based on linear fructose chains (Marteau et al., 2011) and are present in significant amounts in several fruits and vegetables (Van Loo, Coussement, de Leenheer, Hoebregs, & Smits, 1995).

Chemically, inulin-type fructans are a linear polydisperse carbohydrate material consisting mainly, if not exclusively, of β -2-1)-fructosyl-fructose glycosidic bond linkages (Liu, Waterhouse, & Chatterton, 1993), which gives inulin their unique structural and physiological properties, allowing them to resist enzymatic hydrolysis by human salivary and small intestinal digestive enzymes (Kelly, 2008). Fructans are proposed to be classified as "functional fiber" according to recent concepts drawn from physiological effects on human individuals (Madrigal & Sangronis, 2007).

The average daily consumption has been estimated to be between 3 and 11 g in Europe (Van Loo et al., 1995) and between 1 and 4 g in the USA (Moshfegh, Friday, Goldman, & Ahuja, 1999). The most common sources are wheat, onion, banana, garlic and leek.

Inulin is produced industrially from chicory root (*Cichorium intybus*) and it is widely used as ingredient in functional foods. Clinical research has led to

discussion about inulin-type prebiotics, including effects on infant nutrition, gastrointestinal health, bone mineralisation, fatty liver disease, obesity, blood sugar and lipid metabolism, colon cancer prevention and immunity (Kelly, 2009).

The impact of 15 g chicory native inulin daily consumption on fecal levels of bifidobacteria, stool parameters and quality of life of elderly constipated volunteers was investigated in a randomised, double-blind, controlled versus placebo clinical trial. Inulin supplementation led to a significant increase in total fecal bacteria and bifidobacteria concentrations after 28 days of consumption. Daily supplementation of 15 g of inulin improved constipation and quality of life in an elderly sample with constipation (Marteau et al., 2011).

Nutritional status of populations living in the developed countries is affected by poor habits, such as excessive consumption of fats, especially of the saturated, high intake of sugars and considerable reduction in the consumption of starch, fibre, vitamins and minerals that may be causing the high incidence of chronic diseases in such countries (Silva, Engstrom, & Zaborowski, 2002).

Parallel to this phenomenon is an accelerated development of foods having, in addition to adequate technological and nutritional characteristics, components that exert biological functions to prevent disease and promote health functional foods, especially prebiotics and probiotics (Roberfroid, 1999). Given this context, several studies have called attention to the health benefits of prebiotics, including inulin (Fuchs, Borsato, Bona, & Haully, 2005).

Food is one of the determining factors in population health and its levels express “the social and economic organization of the country” (Brasil, 2011).

This review discusses the prebiotic properties, therapeutic potential and immunological aspects of inulin.

Inulin as prebiotics

Probiotics are defined as microorganisms in sufficient amounts that reach the intestine in an active, viable state and exert positive health effects. Prebiotics are “selectively fermented ingredients that allow specific changes both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microflora that confers benefits upon host well being and health” (Macfarlane, Steed, & Macfarlane, 2008).

Only bifidogenic and non-digestible oligosaccharides (particularly inulin and its hydrolysis product oligofructose and trans-galactooligosaccharides) selectively promote the growth of certain types of bacteria, for example, Bifidobacteria (Gibson, Beatty, Wang, & Cummings, 1995) and fulfil all the criteria for prebiotic classification. It is also known that the prebiotic factor is able to stimulate the growth of bifidobacteria.

Prebiotics include dietary fibres with a well-established positive impact on the intestinal microflora (de Vrese & Schrezenmeir, 2008). Inulin is a natural prebiotic which produces many desirable effects in humans, including increased production of short-chain fatty acids, growth and activity of bifidobacteria, reduced triglycerides and serum cholesterol and reduced risks of colon cancer and intestinal infections (Meyer & Stasse-Wolthuis, 2009; Ramirez-Farias et al., 2009).

Prebiotic fibres likely have unique modes of action with respect to cholesterol metabolism, specifically on fermentability and microflora modulation (Parnell & Reimer, 2010).

Some studies have shown both probiotics and prebiotics (non-digestible food ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth or activity of one or a limited number of resident colonic bacteria) to suppress preneoplastic lesions and tumours in the colons of animals treated with chemical carcinogens (Rafter et al., 2007).

The predominance of beneficial bacteria in gut microflora of breast-fed infants is thought to be, at least in part, supported by the metabolism of the complex mixture of oligosaccharides present in human breast milk, as a more adult-type intestinal microbiota can be achieved in formula-fed infants. Inadequate gut colonisation (dysbiosis) may lead to an increased risk of infectious, allergic and autoimmune disorders in later life (Sherman et al., 2010).

Prebiotics such as inulin-type fructans and alternative natural sweeteners have also become more popular as food ingredients. Accumulating evidence suggests that carbohydrates and carbohydrate-containing biomolecules can be considered true antioxidants, capable of scavenging reactive oxygen species (ROS). It has been found that inulin and stevioside are superior scavengers of both hydroxyl and superoxide radicals, being more effective than mannitol and sucrose (Stoyanova, Geuns, Hideg & Van Den Ende, 2010).

Waligora-Dupriet et al. (2007) verified that bifidobacteria, tended to increase slightly with oligofructose supplementation when compared with placebo. Simultaneously, a decrease in potential pathogens, significant for Clostridia but not for Staphylococcus, was observed in the oligofructose group. Oligofructose supplementation was accompanied by less flatulence, diarrhoea, vomiting and fever events. Related to this, it has been reported by Kapiki et al. (2007) that infant formula containing a small quantity of prebiotic oligosaccharides is well accepted and leads to rapid growth of bifidobacteria in the gut of bottle-fed preterm infants while decreasing the number of pathogenic microorganisms. Likewise, results from Martin et al. (2008) provide evidence for the potential use of prebiotics for modifying the gut microbial balance, as well as host energy and lipid homeostasis beneficially.

Influence of prebiotics during childhood

During and following birth, the sterile gastrointestinal tract of newborn infants becomes inoculated and colonised with bacteria derived from the mother and the environment (Fanaro, Chierici, Guerrini, & Vigi, 2003). As prebiotics, inulin-type fructans act essentially via a modification of the endogenous intestinal microflora, modified microflora directly or indirectly cause most, if not all, of their effects (Roberfroid, 2007).

Euler, Mitchell, Kline, and Pickering (2005) proposed a study to determine the prebiotic effect of infant formula supplemented with fructo-oligosaccharides. They verified that infant formula supplemented with 1.5 or 3.0 g/L fructooligosaccharides was safe, but had a minimal effect on fecal flora and Clostridium difficile toxin.

Kapiki et al. (2007) investigated the effect of a fructooligosaccharide supplemented formula on gut flora of pre-term infants. They verified that infant formula containing a small quantity of prebiotic oligosaccharides is well accepted

and leads to rapid growth of bifidobacteria and decreased numbers of pathogenic microorganisms in the gut of bottle-fed pre-term infants.

Infant formulas supplemented with inulin and FOS diets were studied clinically and in vitro and were compared with mature breast milk. There were no significant differences in the fecal numbers of lactobacilli, total aerobes, anaerobes, yeasts and fungi. In contrast, bifidobacteria numbers in the stools of infants receiving the supplemented formula increased significantly during the study. The comparative in vitro test showed that a bifidogenic effect was similarly found in experiments using infant formula and breast milk in terms of bifidobacteria number. Consumption of infant formula with added inulin and FOS stimulated the bifidogenic effect both clinically and in vitro (Lugonja et al., 2010).

According to Gregory (2008), fructans are a category of nutritional compounds that encompasses naturally occurring plant oligo- and polysaccharides in which one or more fructosyl-fructose linkages comprise the majority of glycosidic bonds.

“Inulin-type” fructans must have beta (2-1) fructosyl-fructose glycosidic bonds, which give inulin its unique structural and physiological properties.

Daily consumption of a combination of prebiotic inulin-type fructans significantly increase calcium absorption and enhances bone mineralization during pubertal growth. Effects of dietary factors on calcium absorption may also be modulated by genetic factors including specific vitamin D receptor gene polymorphisms (Abrahms et al., 2005). In humans, the most convincing data to date have been obtained in adolescents (Griffin, Davila & Abrahms, 2002; Griffin, Hicks, Heaney & Abrams, 2003; van den Heuvel, Muys, van Dokkum & Schaafsma, 1999).

Calcium supplementation has been shown to increase bone mineralisation in children and adolescents. Genetic and lifestyle factors can be used to guide optimal calcium intake during childhood (Abrams, 2005).

Inulin in colon disease

Most studies involving prebiotic oligosaccharides have been carried out using inulin and its fructooligosaccharide derivatives together with various forms of GOS. Although many intestinal bacteria are able to grow on these carbohydrates, most investigations have demonstrated that growth of bifidobacteria, and to a

lesser degree lactobacilli, is particularly favoured. Even though literature dealing with the health significance of prebiotics is not as extensive as that concerning probiotics, considerable amount of research supports the notion that consumption of GOS and fructooligosaccharide can have significant health benefits, related to mineral absorption, lipid metabolism and anti-inflammatory and immunological effects and anti-cancer properties (Macfarlane et al., 2008).

Colon cancer is, by definition, a genetic disease of colonial epithelial cells in which accumulated epigenetic and/or genetic mutations promote hyperplasia and dysplasia that result in cancer (Markowitz & Bertagnoli, 2009). Certain dietary fibres were found to be factors preventing the start and, possibly, the promotion of carcinogenesis. These products were classified as anticarcinogens (Wattenberg, 1992).

The impact of specific dietary components on colon tissue probably depends on a host of genomic processes which influence growth, development and differentiation of the epithelial cells in the colon crypt surface. The expanded use of high-throughput technologies will contribute to the understanding of gene expression patterns and protein fingerprints and ultimately elucidate the physiological significance of bioactive food components in cancer protection (Kim & Milner, 2007).

Among the earliest detectable neoplastic lesions in the colon are the aberrant crypt foci (ACF). ACF lesions may be identified by highmagnification-chromoscopic-colonoscopy which otherwise normally appear as colonic mucosa. They consisted of crypts that are microscopically elevated above the normal mucosa, are composed of excessively thickened epithelia and have altered luminal openings clearly circumscribed from the normal adjacent crypts. Although the progression of the ACF to polyp, adenoma and adenocarcinoma parallels the accumulation of several genetic and biochemical alterations, only a small fraction of ACF evolve to colon cancer. Currently, it is not clear which crypts develop into tumours and which do not. However, many studies support the concept that the formation of ACF precedes the development of colon cancer (Alrawi et al., 2006).

In studies reported by Pool-Zobel (2005), some fibres which promoted a stable butyrate-producing colonic ecosystem decreased the rate of ACF, thus adding to the line of evidence that a stable butyrate producing colonic ecosystem, reduces risks of developing colon cancer.

The study done by Hijova, Chmelarova, Bomba, and Zitnan (2009) evaluated the effects of prebiotics in chemically induced carcinogenesis using Wistar albino rats fed a high-fat diet. The study showed that prebiotics may provide potential protection against colon cancer. Munjal, Gleis, Pool-Zobel, and Scharlau (2009) prepared a fermentation supernatant fraction of inulin and studied biological properties in human colon cell lines, LT97 and HT29 (representing early and late stages of colon cancer, respectively). The results indicated growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects in fermentation supernatant fractions containing inulin. There are potential implications for chemoprevention, as early adenoma cells (LT97) were found to be more sensitive to the growth-inhibitory than late stages of colon cancer (HT29) cells. Inulin-induced protection against colorectal cancer was observed. Probiotic therapy can be potentially improved through combination with a Prebiotic, known as a synbiotic, that promotes growth of the probiotic in the large bowel. Several colorectal cancer biomarkers can be altered favourably by synbiotic intervention (Rafter et al., 2007). Furrie et al. (2005) have verified that consumption of synbiotic twice daily over 4 weeks significantly reduced mucosal inflammatory markers in active ulcerative colitis. This was concurrent with a reduction in colitis at the macroscopic and microscopic levels. A synbiotic was developed for use in ulcerative colitis patients combining a probiotic, *Bifidobacterium longum*, isolated from healthy rectal epithelium, and a prebiotic, a preferential inulinoligofructose growth substrate for the probiotic strain. Tumour Necrosis Factor (TNF alpha) and interleukin 1 (IL-1), which are inflammatory cytokines that drive inflammation and induce defensin expression, were also significantly reduced after treatment.

“Synergy1” is a prebiotic composed of inulin and oligofructose in equal proportion. Gourineni, Verghese, Boateng, Shackelford, and Bhat (2011) showed the chemopreventive potential of Synergy1 and soybean in reducing azoxymethane-induced ACF in Fisher 344 male rats.

Although statistical power was limited by the relatively small sample size in a study, Limburg et al. (2011) do not provide convincing evidence of colorectal cancer risk reduction from 6 month interventions with atorvastatin, sulindac or oligofructose-enriched inulin.

Another study suggests that in addition to the number, size and growth rate of adenomatous polyps, the signalling pattern of adenomas should be considered

when evaluating preventive dietary strategies (Misikangas et al., 2008). There is also considerable evidence that inulin modulates parameters within the risk group of colon cancer cells in humans and animals. These include suppression of tumour cell survival and reduced exposure to other risk factors (Pool-Zobel & Sauer, 2007).

Because Crohn's disease and ulcerative colitis, also called chronic inflammatory bowel diseases, result from a combination of genetic, environmental and immunological factors, inulin may promote beneficial effects. In light of the efficacy of providing probiotic bacteria to patients with inflammatory bowel diseases, there has been interest in the prophylactic and therapeutic potential of prebiotics that are easily administered and do not require large numbers of live bacteria. Studies using beta-fructan oligosaccharides for the treatment of chronic intestinal inflammation have shown benefit in animal models of colitis (Leenen & Dieleman, 2007).

Further studies are required to elucidate which mechanisms are essential in the tumour inhibiting and/or anticarcinogenic effects of non-digestible carbohydrates. This information will enable their introduction as food compounds lead to reducing the risk of cancer.

Immunological aspects of inulin

Diet is known to modulate immunological functions in multiple ways and to affect host resistance to infections. Besides the essential nutrients, non-essential food compounds such as non-digestible carbohydrates may also have an impact on the immunological system, especially the gut-associated lymphoid tissue (GALT). Boder (2008) reviewed the research done on the immunity-enhancing effects of prebiotics and noted that there is enough evidence showing prebiotics such as inulin modulating immunological functions to suggest that the consumption of prebiotics can modulate immunological parameters in GALTs, secondary lymphoid tissues and peripheral circulation.

The innate immune system acts as a first line defence by preventing entry of infectious agents or eliminating invading pathogens. It comprises physical barriers such as skin or mucous membranes, cells in blood and tissue, such as

phagocytes, natural killer (NK) cells and soluble mediators, such as complement proteins and cytokines. In animal studies, inulin primarily activates immunological cells in Peyer's patches including IL-10 production and NK cell cytotoxicity. Other immunological functions modulated by inulin include IgA signalling in the ileum and caecum, splenic NK cell cytotoxicity and splenocyte cytokine levels. Results from Watzl, Girrbach, and Roller (2005) propose that inulin primarily modulates immunological parameters in the GALT (but splenocytes are also activated).

Human studies are needed to find out whether inulin has the potential to modulate systemic immunity in well-nourished individuals and to lower the risk of diseases such as colon cancer. It is known that prebiotics may increase zinc (Zn^{2+}) absorption, an ion known to play a central role in the immunological system. Zinc-deficient states are characterised by suppressed immunological function, while prebiotics may improve both gut and cell-mediated immunity. Ryz, Meddings, and Taylor (2009) proposed that the higher proportion and number of dendritic cells in Peyer's patches of inulin-fed rats indicate a need for further research on how prebiotics and their metabolites affect immunological function of intestinal dendritic cells action.

Further studies with pro and prebiotics in small children in the developing and developed countries are necessary to elucidate their influence on health in general and the cellular and humoral immune status, in particular. In this context, Haschke, Firmansyah, Meng, Steenhout, and Carrié (2001) showed that after vaccination with measles vaccine IgG antibody titres were higher in the group receiving the prebiotic mixture.

Benyacoub et al. (2008) investigated the effects of inulin mixtures in the murine response to Salmonella vaccine and its relevance towards protection. Peritoneal macrophage phagocytic activity was significantly increased in FOS-inulin-fed mice compared with control. No detectable effects were observed on the percentage of lymphoid cell subsets in the spleen. However, production of cytokines, interferon-gamma, interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha, was numerically increased in spleen cell cultures stimulated with mitogens from FOS-inulin-fed mice at post immunization.

The increase in interleukin-2 and interleukin-4 measured in blood was also noted in rats fed with inulin and oligofructose. The increase in activity of peritoneal macrophages was confirmed by enhanced superoxide anion (O_2^-) evaluation and

phagocytosis, and immunological-enhancing effects of prebiotics were confirmed by morphological investigation of peripheral lymphoid organs (Trushina, Martynova, Nikitiuk, Mustafina, & Baïgarin, 2005).

A challenge to the innate immune system often leads to the activation of the adaptive immunological system. This system consists of two major cell types, the T and B-lymphocytes, which enable the specific recognition of and response to invaders. T-lymphocytes develop in functionally different cell types with specific cytokine patterns. The cellular immunological response (Th1 pattern) consists mainly in production of IFN- γ and IL-2, while the humoral immunological response (Th2 pattern) shows high production of IL-4 and IL-6 (Watzl et al., 2005). The use of a mixture containing galacto and FOS in dietary compounds might provide an opportunity to stimulate the adaptive immunological response towards the Th1 pattern, inhibiting infections subsequently and to module Th2-related immunological disorders in humans, such as allergies (Vos et al., 2006).

Another important immunological point is that despite better tolerability, pure soluble, recombinant and synthetic antigens are often much less immunogenic than live or killed whole organism vaccines. Thus, the development of safer and more potent vaccines has created a need for better adjuvants, in particular, adjuvants capable of boosting the cellular (Th1) immunological response, with acceptable toxicity.

Inulin-type prebiotics are increasingly being used for food applications. This has potential clinical relevance since consumers might be consuming sufficient quantities of inulin-type prebiotics in foods and beverages to generate physiological responses, including gastrointestinal side effects (Figure 1). The inulin could be directly influencing immunological cells with access to the epithelial surface by different cytokine pathways and stimulating a more immunomodulatory and tolerant immune response. Although further studies are needed to elucidate its potential to modulate systemic immunity and prevent chronic diseases such as colon cancer, inulin promises to be an effective and functional food.

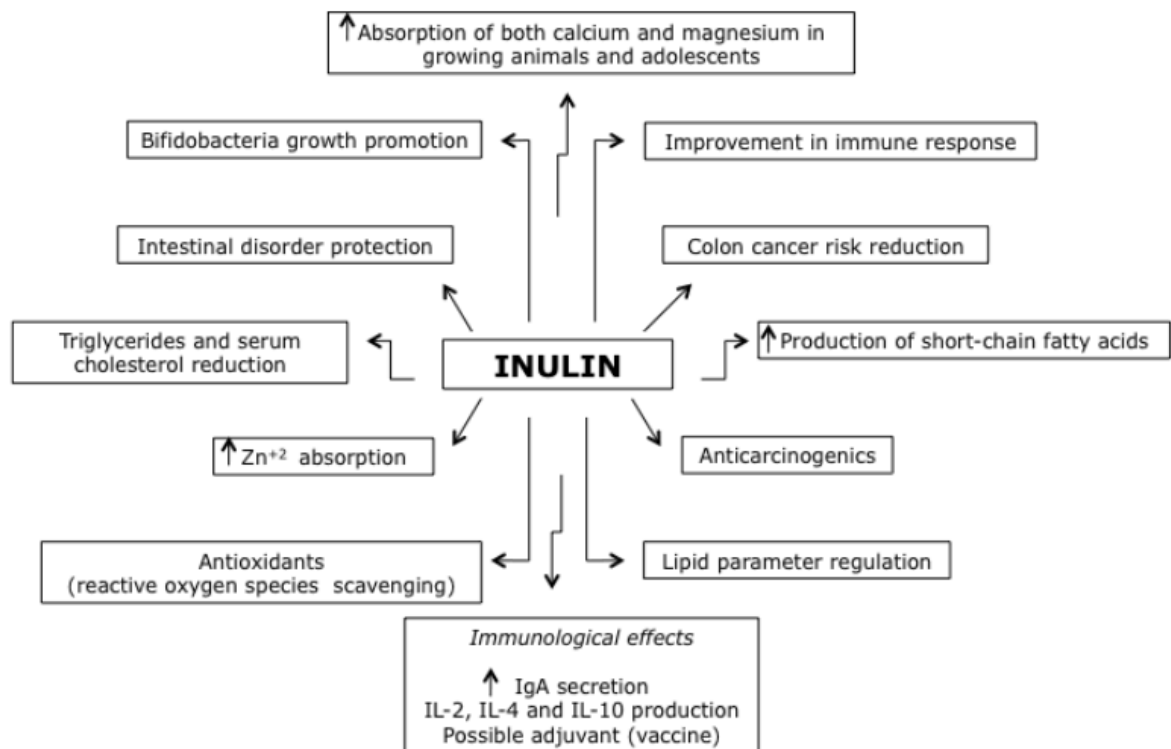


Figure 1. Schematic overview of the biological effect of inulin in humans.

References

- Abrams, S.A. (2005). Calcium supplementation during childhood: Long-term effects on bone mineralization. *Nutrition Reviews*, 63(7), 251-255.
- Abrams, S.A., Griffin, I.J., Hawthorne, K.M., Liang, L., Gunn, S.K., Darlington, G., et al. (2005). A combination of prebiotic short and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 471-476.
- Alrawi, S.J., Schiff, M., Carroll, R.E., Dayton, M., Gibbs, J.F., Kulavlat, M., et al. (2006). Aberrant crypt foci. *Anticancer Research*, 26, 107-119.
- Benyacoub, J., Rochat, F., Saudan, K.Y., Rochat, I., Antilles, N., Cherbut, C., et al. (2008). Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice. *The Journal of Nutrition*, 138(1), 123-129.

- Bodera, P. (2008). Influence of prebiotics on the human immune system (GALT). *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2(2), 149-153. doi:10.2174/187221308784543656.
- Brasil. (2011). Lei Orgânica da Saúde nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, DF, 20 set. 1990. Disponível em: Retrieved July 15, 2011, from <http://www.senado.gov.br> (In Portuguese only).
- De Vrese, M. & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 1-66. doi: 10.1007/10_2008_097.
- Euler, A.R, Mitchell, D.K, Kline, R., & Pickering, L.K. (2005). Prebiotic effect of fructooligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 40(2), 157-164.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: Composition and development. *Acta Paediatrica Supplement*, 91(441), 48-55.
- Fuchs, R.H.B., Borsato, D., Bona, E., & Haully, M.C.O. (2005). "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(1), 175-181.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J.H., Walsh, S.V., O'Neil, D.A et al. (2005). Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: A randomised controlled pilot trial, *Gut*, 54, 242-249. doi:10.1136/gut.2004.044834.
- Gibson, G.R., Beatty, E.B., Wang, X., & Cummings, J.H. (1995). Selective stimulation of Bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4), 975-982. doi:10.1016/0016-5085(95)90192-2.
- Gourineni, V.P., Verghese, M., Boateng, J., Shackelford, L., & Bhat, K.N. (2011). Chemopreventive potential of synergy 1 and soybean in reducing azoxymethane-induced aberrant crypt foci in fisher 344 male rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*, Article ID 983038, 8. doi:10.1155/2011/983038.

- Gregory, K. (2008). Inulin-Type Prebiotics - A Review: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 13(4), 315-329.
- Griffin, I.J., Davila, P.M., & Abrams, S.A. (2002). Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *The British Journal of Nutrition*, 87(2), S187-S191. doi:10.1079/BJN/2002536.
- Griffin, I.J., Hicks, P.M.D., Heaney, R.P., & Abrams, S.A. (2003). Enriched chicory inulin increases calcium absorption in girls with lower calcium absorption. *Nutrition Research*, 23, 901-909. doi:10.1016/S0271-5317(03)00085-X.
- Haschke, F., Firmansyah, A., Meng, M., Steenhout, P., & Carrié, A. L. (2001). Functional food for infants and children. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 149(13), S66-S70 doi: 10.1007/s001120170011.
- Hijova, E., Chmelarova, A., Bomba, A., & Zitnan, R. (2009). Prebiotic foodstuffs and their health benefits in experiment. *Bratislavské Lekárske Listy*, 10(9), 523-525.
- Kapiki, A., Costalos, C., Oikonomidou, C., Triantafyllidou, A., Loukatou, E., & Pertrouhilou, V. (2007). The effect of a fructo-oligosaccharide supplemented formula on gut flora of preterm infants. *Early Human Development*, 83(5), 335-339.
- Kelly, G. (2008). Inulin-type prebiotics: A review (Part 1). *Alternative Medicine Review*, 13(4), 315-329.
- Kelly, G. (2009). Inulin-type prebiotics: A review. (Part 2). *Alternative Medicine Review*, 4(1), 36-55.
- Kim, Y.S., & Milner, J.A. (2007). Dietary modulation of colon cancer risk. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2576S-2579S.
- Leenen, C.H., & Dieleman, L.A. (2007). Inulin and oligofructose in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2572S-2575S.
- Limburg, P.J., Mahoney, M.R., Ziegler, K.L., Sontag, S.J., Schoen, R.E., Benya, R., et al. (2011). Randomized phase II trial of sulindac, atorvastatin, and prebiotic dietary fiber for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prevention Research (Phila)*, 4(2), 259-269.
- Liu J., Waterhouse, A.L., & Chatterton, N.J. (1993). Proton and carbon NMR chemical-shift assignments for [β -D-Fru f-(2 \rightarrow 1)] $_3$ -(2 \leftarrow 1)- α -D-Glc p (nystose) and [β -D-Fru f-(2 \rightarrow 1)] $_4$ -(2 \leftarrow 1)- α -D-Glc p(1,1,1-

- kestopentaose) from two dimensional NMR spectral measurements *Carbohydrate Research*, 245 (1), 11-19. doi:10.1016/0008-6215(93)80056-K.
- Lomax, A.R., & Calder, P.C. (2009). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence. *British Journal of Nutrition*, 101, 633-658. doi:10.1017/S0007114508055608.
- Lugonja, N.M., Martinov, O.B., Rasovic, M.R., Spasic, S.D., Gojgic, G.D.J., & Vrvic, M.M. (2010). A comparative investigation of an in vitro and clinical test of the bifidogenic effect of an infant formula. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47(3), 208-216. doi:10.3164/jcbrn.10-54.
- Macfarlane, G.T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305-344. doi:10.1016/S0271-5317(03)00085-X.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). Inulin and derivatives as key ingredients in functional foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4), 387-396.
- Markowitz, S.D., & Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588.
- Marteau, P., Jacobs, H., Cazaubiel, M., Signoret, C., Prevel, J.M., & Housez, B. (2011). Effects of chicory inulin in constipated elderly people: A double-blind controlled trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2), 164-170. doi:10.3109/09637486.2010.527323.
- Martin, F.P., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I.K., Rezzi, S., Ramadan, Z., et al. (2008). Top-down systems biology integration of conditional prebiotic modulated transgenomic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*, 4, 205.
- Meyer, D., & Stasse-Wolthuis, M. (2009). The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(11), 1277-1289. doi:10.1038/ejcn.2009.64.
- Misikangas, M., Tanayama, H., Rajakangas, J., Lindén, J., Pajari, A.M., & Mutanen, M. (2008). Inulin results in increased levels of beta-catenin and cyclin D1 as the adenomas increase in size from small to large in the Min/+ mouse. *The British Journal of Nutrition*, 99(5), 963-970. doi:10.1017/S0007114507853414.

- Moshfegh, A.J., Friday, J.E., Goldman, J.P., & Ahuja, J.K. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1407S-1411S.
- Munjal, U., Gleis, M., Pool-Zobel, B.L., & Scharlau, D. (2009). Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *The British Journal of Nutrition*, 102(5), 663-671. doi:10.1017/S0007114509274770.
- Parnell, J.A., & Reimer, R.A. (2010). Effect of prebiotic fibre supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: A dose-response study in JCR:LA-cp rats. *British Journal of Nutrition*, 103, 1577-1584.
- Pool-Zobel, B.L. (2005). Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: Review of experimental and human data. *British Journal of Nutrition*, 93(Suppl. 1), S73-S90.
- Pool-Zobel, B.L., & Sauer, J. (2007). Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2580S-2584S.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., et al. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 488-496.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *The British Journal of Nutrition*, 101(4), 541-550. doi:10.1017/S0007114508019880.
- Roberfroid, M.B. (1999). Concept in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129(Suppl.), 1398-1401.
- Roberfroid, M.B. (2007). Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2493S-2502S.
- Ryz, N.R., Meddings, J.B., & Taylor, C.G. (2009). Long-chain inulin increases dendritic cells in the Peyer's patches and increases ex vivo cytokine secretion in the spleen and mesenteric lymph nodes of growing female rats, independent of zinc status. *The British Journal of Nutrition*, 101 (11), 1653-1663. doi:10.1017/S000711450812342X.
- Sherman, P.M., Cabana, M., Gibson, G.R., Koletzko, B.V., Neu, J., Veereman-Wauters, G., et al. (2010). Potential roles and clinical utility of prebiotics in

- newborns, infants, and children: Proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, June 27-28, 2008. *Journal of Pediatric*, 155(5), S61-S70. doi:10.1016/j.jpeds.2009.08.022.
- Silva, D.O., Engstrom, E.M., Zaborowski, E.L. (2002). *Sisvan: Instrumento para o combate aos distúrbios nutricionais na atenção à saúde: o diagnóstico coletivo*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 187 p. (In Portuguese only).
- Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, E., & Van Den Ende, W. (2010). The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3), 207-214. doi:10.3109/09637486.2010.523416.
- Trushina, E.N., Martynova, E.A., Nikitiuk, D.B., Mustafina, O.K., & Baïgarin, E.K. (2005). The influence of dietary inulin and oligofructose on the cell-mediated and humoral immunity in rats. *Voprosy pitaniya*, 74(3), 22-27.
- Van den Heuvel, E.G., Muys, T., van Dokkum, W., & Schaafsma, G. (1999). Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 544-548.
- Van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., & Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 525-552. doi:10.1080/10408399509527714.
- Vos, A.P., Haarman, M., Bucu, A., Govers, M., Knol, J., Garssen, J., et (2006). A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a urine influenza vaccination model. *International Immunopharmacology*, 6(8), 1277 - 1286. doi:10.1016 / j.intimp. 2006.03.010.
- Waligora-Dupriet, A.J., Campeotto, F., Nicolis, I., Bonet, A., Soulaines, P., Dupont, C., et al. (2007). Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 108-113.
- Wattenberg, L. (1992). Inhibition of carcinogenicity by minor dietary constituents. *Cancer Research*, 52(7), 2085s-2091s.
- Watzl, B., Girrbaach, S., & Roller, M. (2005). Inulin, oligofructose and immunomodulation. *The British Journal of Nutrition*, 93(1), S49-S55. doi: 10.1079/BJN20041357.

Apêndice B - Artigo 02

Inulin intake does not cause hepatic or renal injury in Wistar rats.

Inulin intake does not cause hepatic or renal injury in Wistar rats.

ABSTRACT

Nowadays there is interest in identification of substances, present in diet or supplements with protective activity. The α -D-glucopyranosyl-[α -D-fructofuranosyl](n-1)-D-fructofuranoside, commonly referred to as inulin, is a natural plant-derived polysaccharide with a diverse range of food and pharmaceutical applications. It is used by the food industry as a soluble dietary fiber and fat or sugar replacement, and in the pharmaceutical industry as a stabilizer and excipient. Inulin oligosaccharides as prebiotic for their non-digestible carbohydrate properties often found in many vegetables, fruits and cereals. Lipid peroxidation, the result of non-enzymatic anti-oxidation of polyunsaturated fatty acids, presents numerous harmful effects on biological systems and has been implicated in many diseases. This study examined alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and malondialdehyde (MDA) in plasma from Wistar rats treated with inulin for 24h, 48h and 72h. Plasma MDA was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC). At the present study, inulin did not induce any hepatic injury, however serum alanine aminotransferase (ALT) increased significantly after 48 h. No statistically significant difference occurred between MDA concentration in peripheral blood from treated or without inulin. The histopathological analysis demonstrated that tissue

architecture was preserved in groups treated with inulin. In the experimental ranges 24h and 48h, cellular swelling and hydropic degeneration (characteristic of pathological reversible changes) was observed in renal and liver tissue. In conclusion, serum parameters, except for the ALT activity, were not significantly influenced by inulin and the mild hepatic histological alteration suggest another cause, concluding that inulin-type fructans have no significant effect on serum transaminases, MDA values or histopathological analysis in rats.

Keywords: Inulin. ALT. AST. MDA.

INTRODUCTION

Prebiotics as natural dietary compounds modulate microbial composition and ensure a healthy gastrointestinal tract environment that could prevent disease development, such as cancer, as potential chemopreventive agent (Emilia et al., 2013). In recent years, a great deal of attention has been paid to inulin, a polysaccharide (5.5 kDa) purified from the root of *Chicorium intybus* (De Bruyn et al., 1992), for their beneficial physiological effect on the microflora of gastrointestinal tract.

Inulin is considered a prebiotic factor, since it is able to stimulate growth of bifidobacteria selectively at the expense of more putrefactive bacteria. The production of toxic metabolites may be reduced by increasing the proportion of healthier colonic micro flora, which competes with pathogenic bacteria to reduce the levels of toxin and carcinogenic-producing enzymes (Sokiić et al., 2009). It is known that inulin and modified inulin acetate microspheres have been used for water soluble model drugs transport (Poulain et al., 2003).

The effects of chemical compounds ingestion, as inulin oligofructose remains on the fermentation process after escape digestion in the upper gastrointestinal tract, reaching the large intestine virtually intact (Roberfroid, 2005). In addition, some dietary fibers are considered to exert beneficial physiological functions beyond the digestive system, such as improving lipid metabolism in the liver (Beylot, 2005) and reducing blood inflammation rates in diabetic patients (Qi et al., 2006).

Oxidative stress is associated with numerous systemic inflammatory diseases, and free radical production leads to formation of self-propagating lipid peroxidation (Halliwell, 1991). Numerous studies have examined the possibility of a connection between lipid peroxidation and cancer (Torun et al., 1995).

In this context, malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, is known to be present in human plasma and to possess biological properties that may be relevant to carcinogenesis. MDA is final decomposition product of lipid peroxidation (Gönenç et al., 2001) and, in the last few years, it has been considered the main indicator of lipoperoxidative processes (Gawe et al., 2004); thus justifying the studies concerning its role as an indicator of oxidative stress (Del Rio et al., 2005) and a precursor of endothelial disorder (Polidori et al., 2002).

The liver is an important metabolic organ in the body, and can be injured by various factors, which include viral infection, trauma, and chemical agents (Wang et al., 2013). Tests that detect injury to hepatocytes, such as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), are frequently utilized as specific indicators of hepatocellular necrosis (Thapa and Walia, 2007).

Once the fermentation products of soluble dietary fibers may be carried to the liver and the circulation system, inulin may modulate the redox status beyond the digestive system. Thus, the present study focused on elucidating the effect of inulin in a rat upon biochemical assays as ALT, AST and MDA.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Protocol

The experimental protocol was approved by the institutional Animal Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, CEEA No.87/08. All animals used in this study received proper care and handling in compliance with the referred Animal Ethics Committee.

This study was performed to examine the effects of the 100 mg/kg dose of inulin (Belga Orafti – Belgic) administered in rats (*Wistar*). The rats were treated with a single intraperitoneal (i.p.) injection of 100 mL/Kg body weight saline or 100 mg/Kg body weight of inulin were orally administered by gavage. The groups were maintained at controlled temperature (22 ± 2 °C), relative humidity (60 %) and 12 h light/dark cycle and fed *ad libitum*. They were allowed to acclimatize for one

week before the start of experiments. The safety and tolerability of this dosing regimen was tested previously.

Wistar rats (n=12), male, 8-weeks old, weighing around 160 g were obtained from Biological Science Center Biothery, State University of Londrina. They were divided into two groups of 6 rats, "Control" (without treatment) and "Inulin" (inulin treatment); three independent experiments were analyzed.

After 24-, 48- and 72-hour treatments animals were euthanized by cervical dislocation under. Blood samples were collected via cardiac puncture and serum samples were stored at -20°C until analysis. Immediately after, liver and kidneys were excised, they were divided into two sections for histological examination in 10% neutral-buffered formalin.

Biochemical Assay of ALT and AST

Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined at 24, 48 and 72 hours by Transaminases Colorimetric Method (LABORLAB, Guarulhos, SP). The serum samples were centrifuged at 2700xg for 10 minutes. The serum was collected and stored in a refrigerator for a maximum of 24h prior to use. These assays were carried out in a biochemical auto-analyzer Dade XL[®] (USA), using Dade Behring[®] kits (Dade Behring, Inc., Newark, NJ).

Determination of malondialdehyde (MDA) levels in serum samples by HPLC

The determination of the mean levels of MDA was performed in 2 groups of Wistar rats. Samples serum collected were kept frozen at -80°C until the determination of MDA made by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Pilz et al., 2000; Mateos et al., 2005; Bastos, et al., 2012). The methodology used was adapted from Bastos et al. (2012). Before the analysis, samples were centrifuged at 10000xg for five minutes, in order to separate the fibrin. An aliquot of plasma sample (125.0 µL) was introduced in a microtube with addition of 18.0 µL of 0.2 % BHT (butylated hydroxytoluene) and 6.25 µL of NaOH 10.0 mol L⁻¹, homogenized by vortex. Alkaline hydrolysis of the protein bonded to MDA was achieved by incubating the mixture for 30 min at 60°C in a water bath. In the

sequence, samples were placed under ice cubes for 10 minutes. Protein samples were precipitated with 750.0 μL of 7.2 % trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich, Germany) + 1% KI, centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The supernatant (500.0 μL) was transferred to screw-capped cryotube joining 250.0 μL of 0.6 % thiobarbituric acid (TBA) (Merck, Darmstadt, Germany), incubated for 45 min at 90°C in a water bath. An aliquot of 20.0 μL of this reaction mixture was injected into HPLC system. The liquid chromatographic system used was the Alliance e2695 consisting of: manager of solvents, degas module, quaternary pump, autosampler and column with controlled temperature, photodiode array detector (PDA model 2998) managed by Empower 2 software (Waters, Milford, MA, USA). For the analyses were used an isocratic mobile phase that consisted of 40% CH_3OH (J. T. Baker) and 60% potassium phosphate buffer (50.0 mmol L^{-1} , pH 7.0) filtered through a nylon membrane of 0.22 μm (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 0.7 mL min^{-1} . The PDA was set at 532 nm for detection of the adduct TBA–MDA obtained from the reaction. The guard column (4.6 x 12.5 mm, 5 μm) and the analytical column used were Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm I.D., 5 μm , Chrom Tech, Apple Valley, MN, USA). The retention time of MDA in these chromatographic conditions was 7 minutes. The solution of MDA (Acros Organics, Pittsburgh, PA, USA) used to construct the calibration curve, was prepared with 22.0 μL of 1,1,3,3-tetramethoxypropane in 10.0 mL of H_2SO_4 (1%). After 2 hours protected from light, 5.0 μL of this MDA stock solution were added to 1.5 mL of H_2SO_4 (1%). The concentration of the standard solution of MDA was determined by the reading of the absorbance at 245 nm in the spectrophotometer ($\epsilon_{245}=13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The calibration curves used for quantification were performed with a pool of plasma samples by adding the standard solution to reach the final concentrations of MDA (0.2; 0.5; 0.8; 1.6; 6.4; 12.8; 20.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$), following the same procedure of the samples. Chromatographic parameters of validation of the method were calculated based on 2 calibration curves. The method proved to be linear with $R^2>0.98$, repeatable (CV= 3.5% for average of six consecutive injections) and recovery within 98.0 and 101.1%. The limit of quantification was 0.46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the detection limit was 0.14 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Histopathology

Segments of rats liver and kidney were fixed in 10% buffered neutral formalin. Samples were embedded in paraffin, sectioned ($6\ \mu\text{m}$), and then stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological examination. Tissue slides were examined with an Olympus microscope (Olympus America). Images were captured using the FlashBus FBG software (Integral Technologies) and processed in Adobe Photoshop Elements 2.0 (Adobe Systems). The different tissue segments were graded with a compounded histological score, including the extent of damage and regeneration; metaplasia/hyperplasia and presence of inflammatory infiltrates.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software, USA). Results are expressed as mean \pm SEM and were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of Inulin on Transaminase serum levels (ALT and AST)

Verifying the effects of inulin on transaminase serum levels, there were no significant differences in activity of AST in serum of control and treated animals groups (Figure 1). Activity of ALT in serum of inulin treated rats rapidly and significantly increased after 48h ($p < 0.001$) and 72h ($p < 0.001$).

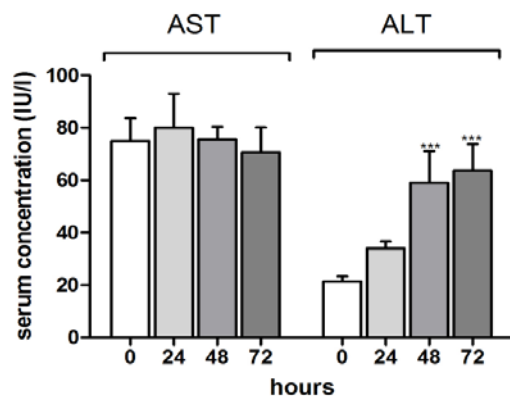


Figure 1. Transaminase Serum Levels. Serum concentration (IU/L) of AST and ALT was analyzed by Colorimetric Method for 0, 24, 48 and 72 hours. Two-way ANOVA test followed by Bonferroni post test. Values are expressed as mean \pm SEM.

Effect of Inulin treatment on MDA serum level

To evaluate the effects of inulin through mechamins cell injury as MDA, no statistically significant difference occurred between MDA concentration in peripheral blood from treated or without inulin (Figure 2) for all time assayed.

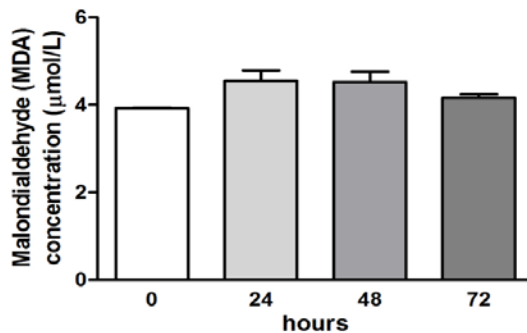


Figure 2. MDA levels in plasma. MDA was analyzed by HPLC from serum samples of rats for 0, 24, 48 and 72 hours. Average values are shown as mean \pm SEM, one way ANOVA, $p=0.1061$.

Histopathologic Examination

The histopathological analysis demonstrated tissue architecture preserved in groups treated with inulin at 24h and 48h (data not shown). In the group treated with inulin for 72h was showing *foci* cellular swelling, reversible characteristic of pathological changes, such as hydropic degeneration. In this same experimental interval was observed the presence of vacuoles and cellular nuclear variation indicating some areas of anucleate cells, but with tissue preservation (Figure 3).

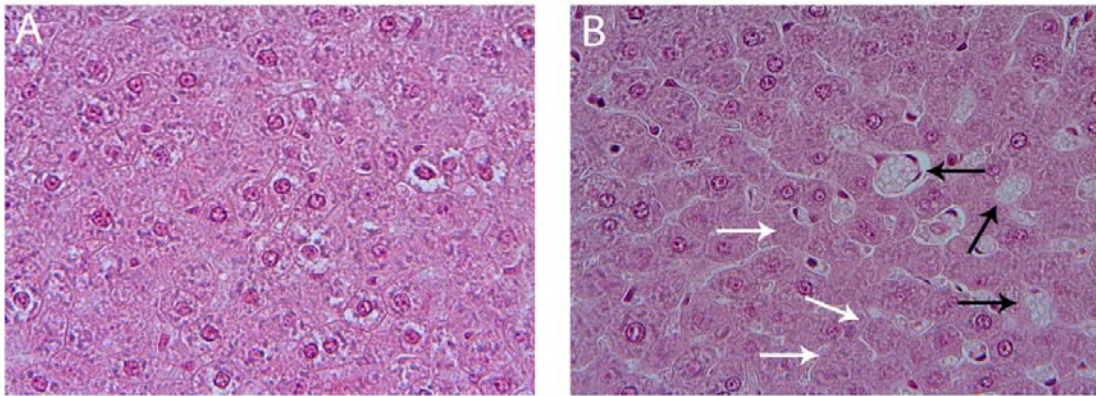


Figure 3. Histopathological Analysis of liver. A-Liver control. B-Liver treated with inulin (72h). **White arrows** - anucleate cells; **Black arrows** – vacuoles cells. Magnification 400X.

The analysis for the renal tissue showed mild swelling localized, with preservation of tissue architecture in 24h, 48h and 72h (Figure 4).

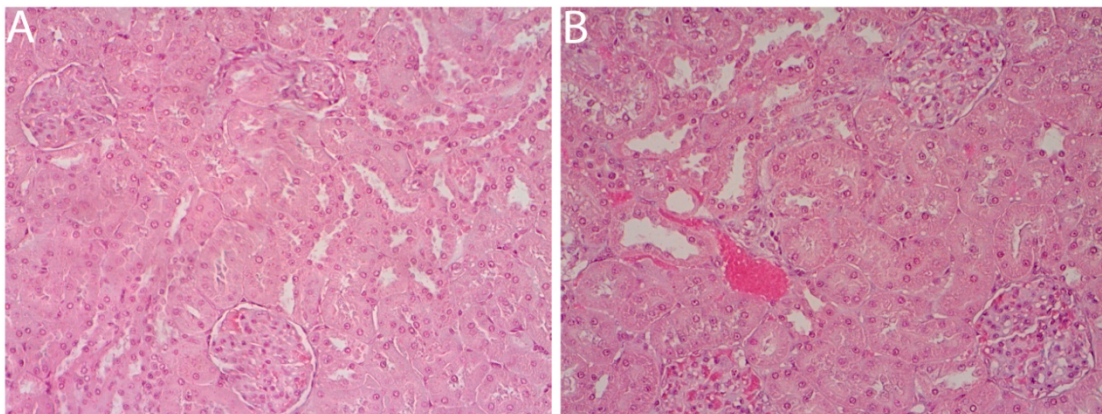


Figure 4. Histopathological Analysis of kidney. A-Kidney control. B-Kidney treated with inulin (72h). Magnification 400X.

DISCUSSION

Growing evidence suggests that populations with greater reliance on fruits, vegetables and spices in the diet experience a reduced risk for the major cancers. The nutraceuticals derived from nutritional sources are naturally multitargeting, and are less expensive, safer and immediately available (Gupta et al., 2011).

Serum transaminases are representative of liver function, their increased levels are indicators of liver damage (Sivaramakrishnan et al, 2008). ALT is primarily

localized to the liver but AST is present in a wide variety of tissues, including heart, skeletal muscle, kidney, brain and liver (Rosen and Keefe, 2000; Friedman et al., 2003). Their activity in serum at any moment reflects the relative rate at which they enter and leave circulation (Thapa and Walia, 2007).

Whereas AST is present in both the mitochondria and cytosol of hepatocytes, ALT is localized to the cytosol (Rosen and Keefe, 2000; Sherlock, 1997). The cytosolic and mitochondrial forms of AST are true isoenzymes and immunologically distinct (Green and Flamm, 2002). Between these aminotransferases, ALT is thought to be more specific for hepatic injury because it is present mainly in the cytosol of the liver and in low concentrations elsewhere (Giboney, 2005).

In this study, activity ALT in serum of inulin treated rats rapidly and significantly increased after 48h ($p < 0.001$) and 72h ($p < 0.001$).

Although many cases of aminotransferase elevations seem to be explained by common causes of liver disease such as alcohol and HCV infection, the majority of cases of aminotransferase elevations seem to be unexplained (Clark et al., 2003).

One third to one half of healthy individuals with an isolated elevation of ALT on repeated testing have been found to be normal (Katkov et al., 1991).

Several factors, other than liver disease, influence what is considered the normal value of ALT (Pacifico et al., 2013). In fact, necrosis of liver cells is not required for the release of the aminotransferases, as there is poor correlation between the degree of liver-cell damage and the level of aminotransferases (Pratt and Kaplan, 2000). Accordingly, their absolute elevations are of little prognostic value (Kaplan, 2002).

It is well established that inulin is an inert sugar that is completely filtered by the glomerulus and is neither secreted nor reabsorbed by the renal tubules (Filler et al., 2013). Thus, the determination of its clearance is considered the gold standard for the measurement of glomerular filtration rate (GFR) (Filler et al., 2012). In our study, microscopic observations showed mild to moderate degenerative changes concerning to the renal structure, and this is not believed to be caused by inulin ingestion.

It has been reported that polysaccharides are one of the major active ingredients of medicinal plants (Zhao et al., 2007), and those isolated from Chinese herbs possess important functions as stimulating the function of phagocytes, inhibiting the tumor development, protecting of liver function, etc. Furthermore, they

exert an important role as radical scavenger for the prevention of oxidative damage to the living systems (He et al., 2012; Tan and Vanitha, 2004).

MDA is most frequently determined by spectrophotometry, using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Determining MDA values is an important contribution to the assessment of oxidative stress. A sensitive and reproducible high-performance isocratic liquid chromatography (HPLC) method for determining of plasma MDA in the assessment of lipid peroxidation is reported here. The present study was conducted to evaluate the MDA concentration in serum from rats to different times. MDA levels obtained for total animals were no significantly for statistical analysis. MDA levels, an indicator of lipid peroxidation, did not differ between control group and inulin group ($p=0.1061$), corroborating to the fact that inulin does not promote liver injury.

In conclusion, our results indicated that, serum parameters, except for the ALT activity, were not significantly influenced by inulin. As an extension of this previous investigation, long-term studies should be developed in the hope of investigating elevated ALT serum levels in animals treated with inulin.

REFERENCES

- A. Ceriello, F. Mezza, S. Cozzolino, G. Pettinato, A. Mancini, W. Santaniello *et al.* (1994). Role of immunosuppression in recurrence after liver transplantation for diethylnitrosamine-induced tumors in rats. *Transpl Int*, 1, pp. S204–S207.
- Alliny Souza Bastos, Ana Paula de Melo Loureiro, Tiago Franco de Oliveira, Sâmia Cruz Tfaile Corbi, Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, Carlos Rossa Júnior, Silvana R.P. Orrico. (2012). Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* 423, p. 141–146
- Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Al-Yahya AA, et al. (2009). Progression of diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis in carnitine-depleted rats. *World J Gastroenterol* 15: 1373-1380.
- Beylot, M. (2005). Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models *Br. J. Nutr.* 93, 163–168.
- B.R. Thapa and Anuj Walia. (2007). Liver Function Tests and their Interpretation. *Ind J Ped.* July 74: 663-671.

- De Bruyn A, Alvarez AP, Sandra P, DeLeenheer L. (1992). Isolation and identification of O- α -D-fructosuranosyl-(231)-D-fructose: a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Chicorium intybus*. *Carbohydrate Res.*; 235:303–8.
- Del Rio D, Stewart JA. (2005). A review of recent studies on MDA as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15(4):316-328.
- Clark, JM; Brancati, FL and Diehl, AM. (2003). The Prevalence and Etiology of Elevated Aminotransferase Levels in the United States. *Am J Gastroenterology* 98(5): 960-967.
- Córdoba, J; O'Riordan, K; Dupuis, J; Borensztajn, J; Blei, AT. (1998). Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology*, 28: 1724–1725.
- Dong-Hui Wang, Yi-Nan Wang, Jing-Yan Ge, Hai-Yan Liu, Hong-Jun Zhang, Yan Qi, Zhong-Hui Liu, and Xue-Ling Cui. (2013). Role of activin A in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. *World J Gastroenterol.* June 28; 19(24): 3802–3809.
- Dufour, DR. (2009). Alanine aminotransferase: is it healthy to be “normal”? *Hepatology*, 50: 1699–1701.
- Dufour, DR. (1998). Effects of habitual exercise on routine laboratory tests. *Clin Chem*, 44 (6): A136.
- Dufour, DR; Lott, JA; Nolte, FS; Gretch, DR, Koff, RS; Seeff, LB. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests *Clin Chem*, 46, 2027–2049.
- Emília H, Viktória S, Jana S, Gabriela H. (2013). Chemopreventive and metabolic effects of inulin in colon cancer development. *J Vet Sci.* Jun 30. [Epub ahead of print].
- Filler, G; Yasin, A; Medeiros, M. (2013). Methods of assessing renal function. *Pediatr Nephrol.* 17, 1-17.
- Filler G, Huang SH, Yasin A. (2012). The usefulness of cystatin C and related formulae in pediatrics. *Clin Chem Lab Med.* 50(12): 2081–2091.
- Friedman SF, Martin P, Munoz JS. (2003). Laboratory evaluation of the patient with liver disease. *Hepatology, a textbook of liver disease.* Philadelphia; Saunders publication. 1 : 661-709.
- Gawe S, Wardas M, Niedworok E. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek* 57(9-10):453-455.

- Giboney, PT. (2005). Mildly Elevated Liver Transaminase Levels in the Asymptomatic Patient. *Am Family Phys* 71(6): 1105-1110.
- Gönenç A, Ozkan Y, Torun M. (2001). Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 26(2):141-144.
- Green RM, Flamm S. (2002). AGA technical review of evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*. 123: 1367-1384.
- Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91:14-22.
- He X, Niu X, Li J, Xu S, Lu A. (2012). Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 2, 15–27.
- Jürgen Pilz, Ingolf Meineke, Christoph H. Gleiter. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B*, 742. (2000). 315–325.
- Kaplan MM. (2002). Alanine aminotransferase levels: what's normal? *Ann. Intern. Med.* 137:49–51.
- Katkov WN, Friedman LS, Cody H et al. (1991). Elevated serum alanine aminotransferases levels in blood donors; the contribution of hepatitis C virus. *Ann Intern Med.* 115: 882-887.
- Lin, YC; Lee, WT; Huang, SF; Young, C; Wang, PJ, Shen, YZ. (1999). Persistent hypertransaminasemia as the presenting findings of muscular dystrophy in childhood. *Acta Paediatr Taiwan*, 40: 424–429.
- Malik S, Bhatnagar S, Chaudhary N, Katare DP, Jain SK. (2012). DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma*. Mar 29. [Epub ahead of print]
- Marcel B. Roberfroid. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition / Volume 93 / Supplement S1/ April*, pp. S13 - S25.
- Pratt DS, Kaplan MM. (2000). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N. Engl. J. Med.* 342:1266–71.
- Pacifico, L; Ferraro, F; Bonci, E; Anania C; Romaggioli, S; Chiesa, C. (2013). Upper limit of normal for alanine aminotransferase: Quo vadis? *Clin Chim Acta.* 422, 29–39.

- Polidori MC, Savino K, Alunni G et al. (2002). Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radic Biol Med* 32(2):148-152.
- Poulain N., *et al.* (2003). Microspheres Based on Inulin for the Controlled Release of Serine Protease Inhibitors: Preparation, Characterization and in Vitro Release. *Journal of Controlled Release*, 92:27-38.
- Qi, L.; van Dam, R. M.; Liu, S.; Franz, M.; Mantzoros, S.; Hu, F. B. (2006). Whole-grain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women *Diabetes Care*. 29, 207– 211.
- Raquel Mateos, Elena Lecumberri, Sonia Ramos, Luis Goya, Laura Bravo. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, 827, 76–82.
- Rosen HR, Keefe EB. (2000). Evaluation of abnormal liver enzymes, use of liver tests and the serology of viral hepatitis: Liver disease, diagnosis and management. 1st ed. New York; Churchill livingstone publishers. 24-35.
- Scola, RH; Werneck, LC; Prevedello, DM; Toderke, EL; Iwamoto, FM. (2000). Diagnosis of dermatomyositis and polymyositis: a study of 102 cases. *Arq Neuropsiquiatr*, 58, 789–799.
- S.C. Gupta, J.H. Kim, R. Kanappan, S. Reuter, P.M. Dougherty, B.B. Aggarwal. (2011). Role of nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents, *Exp. Biol. Med.* 236, 658–671.
- Sherlock S. (1997). Assessment of liver function *Disease of liver and biliary system: Sheila Sherlock*, 10ed, London; Blackwell Science Ltd. 17-32.
- Sivaramakrishnan V, Shilpa PN, Praveen Kumar VR, Niranjali Devaraj S. (2008). Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. *Chem Biol Interact.*; Jan 10;171(1):79-88. Epub 2007 Sep 14.
- Sokić ZB, Knezević J, Vrvic MM. (2009). Inulin--potential prebiotic. *Med Pregl*. Mar-Apr; 62(3-4):153-6.
- Tan BKH, Vanitha J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1423–1430.

- Torun M, Yardım S, Gönenç A et al. (1995). Serum b-carotene, vitamin E, vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. *J of Clin Pharm and Ther* 20:259-263.
- Verna L, Whysner J and Williams GM. (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.*, 71: 57-81.
- W. Hai, C. Kim, S. Song, C. Kang (2001). Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat; development of hepatotumorigenesis, *J. Vet. Sci.* 2: 53–58.
- X. Li, X.P. Zhou, Y.S. Guan, Y.X. Wang. (2005). Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in Sprague–Dawley rats *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 4, pp. 427–432.
- Zhao Y, Son YO, Kim SS, Jang YS, Lee JC. (2007). Antioxidant and antihyperglycemic activity of polysaccharide isolated from *Dendrobium chrysotoxum* LINDL. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 670–677.

Apêndice C - Artigo 03

Effect of inulin on human peripheral blood mononuclear cells: increase of gene expression for transcription factor *FOXP3*.

Effect of inulin on human peripheral blood mononuclear cells: increase of gene expression for transcription factor *FOXP3*

ABSTRACT

Diet is known to modulate immunological functions in multiple ways and to affect host resistance to infections. Besides the essential nutrients, non-essential food compounds such as non-digestible carbohydrates may also have impact on the immunological system, especially gut-associated lymphoid tissue. Inulin oligosaccharides are considered as prebiotic for their non-digestible carbohydrate properties often found in many vegetables, fruits and cereals. Although the literature indicates inulin as an effective and promising functional food, further studies are still

needed to elucidate its potential in modulating systemic immunity and its prevention role in chronic diseases such as colon cancer. During recent years, has become evident that a subpopulation of T cells, named T regulatory cells (Tregs), play a major role in sustaining tolerance to self-antigens. Transcription factor, the Forkhead box P3 (FOXP3) expressing Tregs are key mediators of peripheral tolerance and suppress undesirable immune responses. These Tregs could be induced by cytokine named transforming growth factor beta (TGF- β). The *TGFB* family comprises a group of highly conserved dimeric proteins which are ubiquitously expressed in eukaryotes. In this context, this study investigated the effect of inulin on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro*. Culture of PBMC was performed in presence or absence of inulin. Although was verified no difference of TGF- β detection between treated and not supernatant of culture cell, by PCR quantitative was possible detect increase of expression of *FOXP3* and a trend for *TGFB* in inulin treated PBMC. This study was an attempt to understand inulin effects *in vitro* in PBMC. *In vitro* approaches reveal an aspect of the scientific investigation, opening perspectives for further investigation in this research field.

Keywords: inulin, *FOXP3*, *TGFB*, PBMC.

INTRODUCTION

α -D-glucopyranosyl-[β -D-fructofuranosyl](n-1)-D-fructofuranoside (known as inulin) is a natural renewable polysaccharide with a significant number of diverse pharmaceutical and food applications (Ronkart et al. 2007; Dan et al. 2009; Ronkart et al. 2010). Inulin has interesting biological effects, being a potent complement pathway activator when in a particulate form and having anti-cancer (Korbelik and Cooper, 2007; Cooper and Carter, 1986) and immune-modulatory properties (Silva et al 2004; Cooper et al. 1991).

Inulin is produced industrially from chicory root (*Cichorium intybus*) and it is widely used in functional foods as ingredient. Clinical research has led to discussion about inulin-type prebiotics, including effects in infant nutrition, gastrointestinal health, bone mineralization, fatty liver disease, obesity, blood sugar and lipid metabolism, colon cancer prevention and immunity (Kelly 2009).

Vos et al. (2006) has related that the use of a mixture containing galacto- and fructooligosaccharides in dietary compounds might provide an opportunity to stimulate the adaptive immunological response toward Th1 pattern, inhibiting infections subsequently, and to module Th2-related immunological disorders in humans as for instance allergies.

Most transcriptional factors are modular proteins composed of DNA binding domains and/or motifs that interact with other transcriptional regulators and modifying enzymes. Many of these interacting proteins do not bind to DNA directly, but modulate DNA binding by conferring transcriptional activating or repressing activity to the DNA binding pattern. This activity is often related to either compaction or relaxation of chromatin, thus restricting or permitting access of other transcriptional regulatory proteins (Li et al. 2004). The forkhead box protein 3 (*FOXP3*) is a member of the forkhead winged helix transcription-factor family and is expressed primarily in a subset of CD4⁺ T-cells expressing CD25 (IL-2 receptor α -chain), known as regulatory T cells (Tregs), where it plays a critical role in the differentiation, development, maintenance and function of this important subset of cells (Campbell, Ziegler 2007; Sahin, Sahin, Koksoy 2013).

Tregs are a unique CD4⁺ T cell lineage that plays an indispensable role in maintaining immunological unresponsiveness to self-antigens and in suppressing excessive immune responses deleterious to the host. However, they also limit beneficial responses by suppressing sterilizing immunity and limiting antitumour immunity (Sakaguchi et al. 2008; Toker Huehn 2011; Vignali, Collison, Workman 2008).

The *FOXP3* gene was identified in 2001 as the disease-causative gene in Scurfy mice, which spontaneously develop severe autoimmunity/inflammation as a result of a single gene mutation on the X chromosome (Brunkow et al. 2001). The human full-length *FOXP3* gene is 1296 bp in size and has been reported to consist of 11 different exons. This gene is located in the small arm of the X-chromosome (Xp11.23), that is subject to X-chromosomal inactivation, and encodes a 431 amino-acid protein (Gambineri et al. 2003; Fontenot et al. 2005; Ban et al. 2007; Torgerson, Ochs, 2007).

The FOXP3 protein has three discernible functional domains: a single C₂H₂ zinc-finger motif (amino acids 200–223), a leucine-zipper-like motif (amino acids 240–261) and a carboxy-terminal forkhead domain (amino acids 338–421) (Campbell and Ziegler, 2007). The C-terminal forkhead domain, where the largest number of IPEX missense mutations cluster, is required for DNA binding and nuclear import. The leucine zipper of FOXP3 in the central part of the molecule is required for homo- and possibly hetero-dimerization of the protein. A repression domain in the N-terminal

proline-rich region is required for FOXP3 to suppress transcription (Lopes et al. 2006).

Genome-wide analysis has shown that FOXP3 binds to the promoter region of 700–1100 genes, many of those genes being associated with TCR signaling. A large number of FOXP3-bound genes were up- or down-regulated in FOXP3+ T cells, indicating that FOXP3 may act as both a transcriptional activator and repressor (Marson et al. 2007; Zheng et al. 2007).

The transforming growth factor beta (TGF- β) and Interleukin 10 (IL-10) are two immunoregulatory cytokines identified and produced within the tumor microenvironment. TGF- β plays an indispensable, yet complex role in carcinogenesis and the progression of tumors (Massague 2008; Massague et al. 2000). With regard to immune cells, it is recognized that TGF- β is largely an immunosuppressive cytokine, generally inhibiting immune responses including anti-cancer immunity. In addition, TGF- β plays a central role in the generation and function of CD4+ CD25+ Tregs (Chen et al. 2003), but the ultimate effect of TGF- β on immune cells is heavily dependent on the microenvironment and the presence of other cytokines and factors (Chen et al. 2006).

The TGFB family of polypeptides comprises a group of highly conserved dimeric proteins with a molecular weight of approximately 25 kDa (Roberts, Sporn 1993). Beta-type subfamily growth factors are homodimeric or heterodimeric polypeptides with multiple regulatory properties depending on cell type, growth conditions and presence of other polypeptide growth factors. Since their expression is also controlled by distinct promoters, their secretion is temporal and tissue specific (Ohta et al. 1987).

Three isoforms of TGFB are known (TGF- β 1, - β 2, - β 3) that are secreted as inactive latent precursors that require activation prior to binding to the TGF- β receptors (Klass et al. 2009). The three isoforms share 60-80% homology and are encoded by different genes. However, the isoforms are believed to activate the same intracellular signalling pathways and appear, *in vitro*, to have overlapping biological functions, though with differing *in vivo* expression (Roberts, Sporn 1992). All three isoforms are believed to bind and signal through the two TGF- β receptors (T β RI and T β RII) (Klass et al. 2009). T β RII is constitutively phosphorylated and on binding of the ligand, phosphorylates T β RI. Phosphorylation of the receptor complex activates the SMAD intracellular signalling pathway through the receptor Smads (Smad-2 and

Smad-3) and co-Smad 4. The receptor SMADs and Smad-4 cross over the nuclear membrane where they regulate a number of genes (Klass et al. 2009; Kim et al. 2003). TGF- β can also activate a number of non Smad signalling pathways whose function in TGF- β remains to be elucidated (Klass et al. 2009). They are ubiquitously expressed in eukaryotes and typically secreted into the extracellular milieu in an inactive form, where they become locally activated in response to the appropriate stimuli (Annes et al. 2003).

TGF- β signaling plays a key role in maintaining vascular integrity (Maharaj et al. 2008). This process probably involves a basal level of “endogenous” TGF- β signaling, which protects against the development of early neoplastic lesions. It is known that in self-renewing epithelia, which are the most common sites of origin of cancer, TGF- β appears to exert two major functions: tissue homeostasis and the response to tissue injury (Tan et al. 2009). T regulatory cells (Tregs) plays a major role in sustaining tolerance to self-antigens. FOXP3 expressing Tregs are key mediators of peripheral tolerance and suppress undesirable immune responses. These Tregs could be induced by TGF- β . This cytokine family of polypeptides comprises a group of highly conserved dimeric proteins which are ubiquitously expressed in eukaryotes.

METHODOLOGY

Mononuclear cells from human peripheral blood (PBMC)

Following approval from the Human Ethics Committee of the State University of Londrina, peripheral blood was collected from normal healthy blood donors. A Term of Free Informed Consent was signed by all sample donors prior to blood collection.

Human PBMCs were obtained from peripheral blood of healthy volunteers (n=6), separated by Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) and maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, San Francisco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, USA) and penicillin-streptomycin (100U/ml, Sigma-Aldrich). PBMCs (1×10^6 cells/ml) were incubated in the absence or presence of inulin (in triplicate) at 10 μ g/mL for 24 h at 37°C and 5% CO₂.

Quantitative determination of lactic dehydrogenase activity (LDH)

Damaged cells was determined via measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol (Flex[®]LDH reagent cartridge). LDH oxidizes the substrate in the presence of NAD⁺ to yield pyruvate and NADH which absorbs at 340 nm, thus, LDH concentration was determined utilizing Dimension XL[®] spectrophotometer.

TGF- β 1 detection in culture supernatants

TGF- β 1 secretion was performed using ELISA kit BD OptEIA Set Human TGF- β 1 (BD Biosciences, San Diego, USA). The supernatant of control and inulin treatment groups were subjected to ELISA determination of TGF- β 1 level following the manufactures instructions. Briefly, supernatant from each group was collected, added into the pre-coated plate with anti-human TGF- β 1 monoclonal antibody and incubated for 2 hours at room temperature. After, samples were washed and biotinilated secondary antibody-HRP+Sav conjugated were added. After wash, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate were immediately added, followed by 1 M phosphoric acid stop solution. The ELISA plate was read at absorbance OD of 450 nm wavelength using ELX-300 Reader (BioTek Instruments Inc., VT, USA). The results were expressed in pg/mL. Each experimental and control sample was assayed in two biological replicates. Data processing were performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek) and were expressed as pg/mL.

Quantitative real time PCR (qPCR)

Total RNA from cell culture was extracted by Trizol[®] (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and quantified using NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Total RNA (500 ng) were reverse-transcribed with Oligo(dT)15 Primer (Invitrogen), M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor

(Invitrogen) and $MgCl_2$. qPCR was performed using Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) and *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, USA). The thermal cycling conditions were 10 minutes at 95°C, and 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C, followed by melting curve consisted of one cycle of 15 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C and growing increase up to 95°C (0,3 °C/second) with detection of fluorescence at each temperature increase to confirm the specific amplification. The primers used were: B2M (β -2-microglobulin) sense 5'-CACCCCCACTGAAAAAGA-3'; antisense 5'-AAAAAGCAAGCAAGCAGAA-3', FOXP3 sense 5'-CTGCCCCTAGTCATGGTGG-3'; antisense 5'-CTGGAGGAGTGCCTGTAAGTG-3' and TGF- β sense 5'-GGAGCGGGAGGAGGGAC-3'; antisense 5'-AGCGGCAACGGAAAAGTCT-3'. The $2^{-\Delta CT}$ method was applied to determine the effect of the experimental treatment on the expression of internal control gene (B2M); the relative expression levels of genes FOXP3 and TGF- β were calculated using the $2^{-\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

Statistical analysis

Statistically significant differences were evaluated using the GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software, USA). Results are expressed as mean \pm SD and were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Inulin effect in cell viability

To assess inulin effect in cell viability, LDH assay was performed. LDH activity (μ mol/L) in cultured PBMC supernatant after 24 hours of inulin treatment (10 mg/mL) is presented in Figure 1. No differences were observed in LDH activity between control (11.5 ± 2.777) and inulin treatment (14.0 ± 2.619), indicating that inulin treatment, at this time exposure and concentration, does not present toxicity and lytic activity in PBMC.

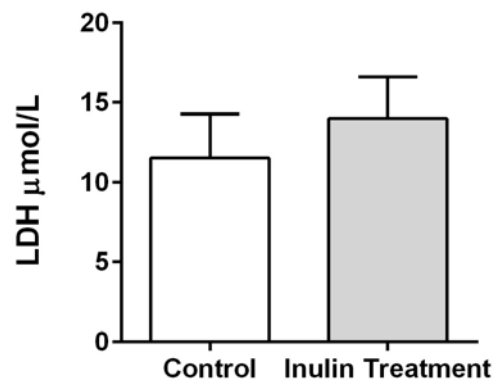


Figure 1. Evaluation of cytotoxic effect of inulin. Quantitative determination of lactic dehydrogenase activity ($\mu\text{mol/L}$) in supernatant of cultured cells in presence and absence of inulin stimuli. PBMCs cells were treated with 10 mg/mL of inulin and supernatant was removed after 24 hours of exposure to measure LDH activity. Each experimental and control sample in the biological replicates, and for each sample, duplicates. Data presented as mean \pm standard error of mean, t test $p=0.1250$, $n=6$.

Inulin effect in secretion of cytokine TGF- β

To evaluate effects of inulin (10 mg/mL) on the modulation of cytokine TGF- β 1, we performed ELISA supernatant analyses from PBMCs untreated and treated with inulin. ELISA experiments revealed that TGF- β 1 secretion was not altered in inulin treated PBMC cells (Figure 2).

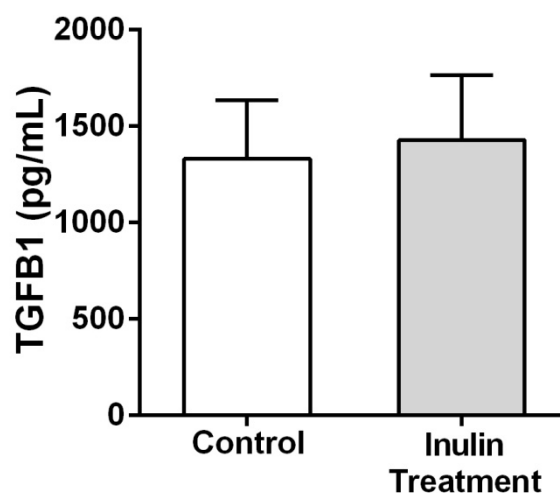


Figure 2. Detection of cytokine TGF- β in the culture of PBMC. Quantitative determination of TGF β 1 (pg/mL) in supernatant of cultured cells in presence and absence of inulin stimuli. Each experimental and control sample was assayed in two biological replicates. Data processing were performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek) and were expressed as pg/MI. Data presented as mean \pm standard error of mean.

Inulin modulates the expression of FOXP3 in human PBMC

To verify if the gene β -2-microglobulin (B2M) could be used as a internal control, we perform a qPCR with gene-specific primers and the fold change in gene expression was calculated using $2^{-\Delta CT}$ method, where ΔCT (CT, treated - CT, untreated). As demonstrated in Figure 3, there was no difference in β -2-microglobulin expression between PBMCs untreated and treated with inulin, indicating this gene as a good internal control for this experiment.

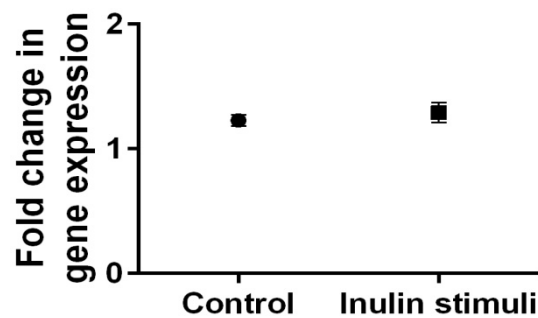


Figure 3: Inulin does not affect expression of β -2-microglobulin. Application of $2^{-\Delta CT}$ method to validate the effect of treatment on the expression of internal control gene. mRNA from PBMCs treated or not with inulin was extracted and converted to cDNA and subjected to real-time quantitative PCR using gene-specific primers for b2-microglobulin. The fold change in gene expression was calculated using $2^{-\Delta CT}$ method where ΔCT (CT, treated - CT, untreated). Data presented as mean \pm standard error of mean.

Different from data observed in ELISA experiment, qPCR analyses demonstrated a trend toward an up-regulation of TGFB1 in PBMCs (9.13 fold) treated with inulin compared to cells untreated ($p = 0.055$; Figure 4). In relation to the transcription factor FOXP3, 24 hours of inulin treatment was able to increase its expression 7.6 times when compared to untreated cells.

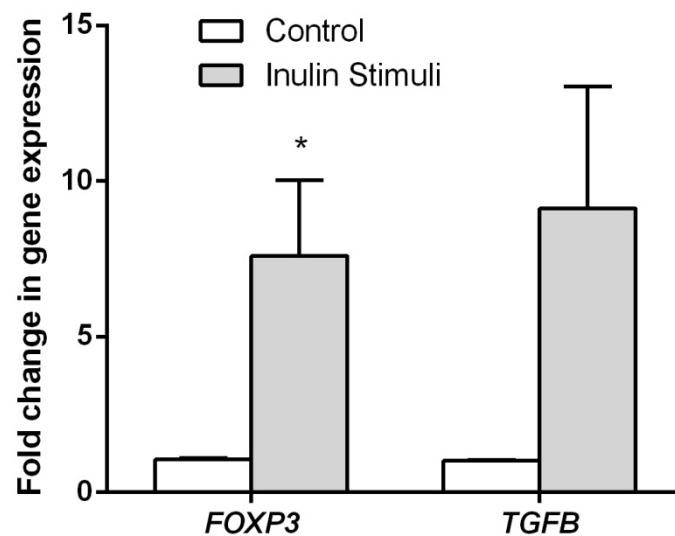


Figure 4: Evaluate of expression of *FOXP3* and *TGFB* by quantitative real-time PCR. Quantitative real-time PCR analysis of gene expression in PBMCs treated and untreated with inulin 10 mg/mL. Relative expression distribution (X axis) is represented as fold change (ratio) of PBMC treated (grays bars) versus PBMC untreated (white bars), normalized against β -2-microglobulin reference gene, * $p < 0,05$ for *FOXP3* gene and $p = 0,055$ for *TGF β* . Data presented as mean \pm standard error of mean.

DISCUSSION

Natural products have been the major sources for drug discovery and the development of novel treatment agents. Inulin, inulin acetate and modified inulin acetate microspheres have been used for the transport of water soluble model drugs (Poulain et al., 2003).

Inulin's solubility is closely related to the chain length of the polymer, and thus shorter oligomers are much more soluble than long chain polymers (Blecker et al, 2001; Roberfroid, 2005). Soluble inulin is largely biochemically inert and non-toxic (Stevens et al. 2001). Parts of the molecular structure, specifically the hydroxyl groups, are more able to interact with water than other parts. This provides inulin with some surfactant character and it is able to form stable gels with water at concentrations of 13-50% (Blecker et al. 2001; Franck et al. 2002; Castelli et al. 2008; Kim et al. 2001). Insoluble inulin particles (γ and δ -inulin isoforms), but not soluble inulin (α - and β -inulin isoforms), activate complement via the alternative pathway (APC) (Silva et al. 2004; Cooper 1995; Cooper, Petrovsky, 2006).

Cooper and Petrovsky (2011) reported a novel isoform of β -D-[2 \rightarrow 1] poly (fructofuranosyl) α -D-glucose termed delta inulin (DI), comparing it with previously

described alpha (AI), beta (BI) and gamma (GI) isoforms. They reported that delta inulin, reflects the formation of a distinct polymer aggregate packing structure via reversible noncovalent bonding. DI forms the basis for a potent new human vaccine adjuvant and further swells the growing family of carbohydrate structures with immunological activity.

It is known that the variation in molecular conformation, affects solubility and short chain oligomers of inulin are relatively soluble in aqueous solution being soluble at up to 80% concentration. Longer chain inulin polymers are much less soluble and will precipitate in the crystalline forms discussed in the previous section. Due to a degree of surfactant character inulin can also gelate aqueous solutions from >25% inulin in water for shorter chains, and from >13% for longer chains by cooling a hot dissolved solution or by shearing inulin suspensions (Blecker et al., 2001; Kim et al., 2001).

In this study, inulin does not presented toxicity and lytic activity in PBMCs incubated in the presence of inulin, as assessed by LDH assay. The LDH method measures of L-lactate pyruvate oxidation with simultaneous reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). The change in absorbance at 340nm due to the appearance of reduced NAD (NADH) is directly proportional to the LDH activity, since other reactants are present in non-rate limiting quantities.

A major advantage of them using of carbohydrate compounds as immunomodulators is that most are nontoxic and well-tolerated *in vivo*. Considerable data have been published on the immune action of glucans, including β -glucan, mannan and lentinan (Cooper, Petrovsky, 2011).

Bodera (2008) reviewed the research done on the immunity-enhancing effects of prebiotics and noted that there is enough evidence showing prebiotics such as inulin modulating immunological functions to suggest that the consumption of prebiotics can modulate immunological parameters in gut-associated lymphoid tissues, secondary lymphoid tissues and peripheral circulation.

The review from Barclay et al. (2010) has largely focused on the potential of new pharmaceutical applications of inulin. Inulin is a natural polysaccharide with unique physicochemical properties that give it a range of uses in the food and pharmaceutical industry. A broad range of analytical tools has been applied to inulin's characterization. An increased understanding of the chemistry and behaviour of inulin

polymers has led to important new uses as a drug delivery vehicle, immunostimulator and vaccine adjuvant.

The transforming growth factor beta (TGF- β) family of polypeptides comprises a group of highly conserved dimeric proteins with a molecular weight of approximately 25 kDa (Roberts et al., 1993). They are ubiquitously expressed in eukaryotes and typically secreted into the extracellular milieu in an inactive form, where they become locally activated in response to the appropriate stimuli (Annes et al., 2003).

In this study we evaluated the expression of TGFB in the supernatant of culture of PBMC. There was no difference in TGFB quantification between PBMC cultures treated and untreated with inulin. When gene expression was evaluated, it was verified that although TGFB mRNA, there was not statistically significant ($p=0,055$).

Bassaganya-Riera et al. (2011) reported their study which was to compare the potential antiinflammatory efficacy of 6 dietary fibers and 2 fiber combinations and to investigate their mechanisms of immune modulation by using an IL-10^{-/-} mouse model of experimental Inflammatory Bowel Disease (IBD). They verified that inulin decreased IFN γ production by effector CD4⁺ T cells from Peyer's patches. They suggested that soluble fibers as inulin influence Treg cells. It is known that FOXP3 transcription factor is considered a major marker of Tregs. In this context, the study verified increased of *FOXP3* mRNA in PBMC treated with inulin. It may be that in the present study, delta inulin beyond considered a potent humoral adjuvant but equally capable of inducing antigen-specific CD4 and CD8 T-cell responses (Cooper, Petrovsky, 2011), is acting in FOXP3 induction for some signaling pathway we have not know yet.

It has been proposed that early administration of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling (Foye et al., 2012).

Like plant lectins such as phytohemagglutinin that could be used as mitogen to induce immune activation, which has been long known and, natural polysaccharide as inulin are now also recognized to play a critical role in immune system function and regulation. Our data indicated that inulin could modulates PBMC *in vitro*, affecting *FOXP3* and *TGFB*, expression the last one (although not statistically significant).

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest related to this study.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Londrina State University Coordination for Postgraduation (PROPPG-UEL). The authors wish to express their gratitude to Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundo Estadual para a Infância e Adolescência (FIA/PR) e Secretaria da Família e Desenvolvimento Social (Seds) for supplying laboratory equipment.

REFERENCES

- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116(Pt 2):217–224.
- Blecker C. *et al.* (2001). Inulin: Its Physicochemical Properties and Technological Functionality. *Recent Res Devel Agricultural & Food Chem*, 5: 125-131.
- Bodera P. (2008). Influence of prebiotics on the human immune system (GALT). *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 2(2):149-53.
- Castelli F. *et al.* (2008). Differential Scanning Calorimetry Study on Drug Release from an Inulin-Based Hydrogel and Its Interaction with a Biomembrane Model: pH and Loading Effect. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35: 76-85.
- Chen C-J, Yang H-I, Su J, Jen C-L, You S-L, Lu S-N, Huang G-T, Iloeje UH, for the R-HBVSG. (2006). Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *JAMA*; 295:65-73.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.*; 198(12):1875-86.

- Cooper P.D. (1995). Vaccine Adjuvants Based on Gamma Inulin, in Powell M.F. and Newman M.J. (eds), *Vaccine Design: The Subunit Approach*. Plenum Publishing, New York, pp 559-580.
- Cooper P.D. and Petrovsky N. (2006). New Polymorphic Form of Inulin and Uses Thereof, Organization W.I.P. WO 2006/024100 A1.
- Cooper P.D. and Carter M. (1986). The Anti-Melanoma Activity of Inulin in Mice. *Molecular Immunology*, 23: 903-908.
- Cooper P.D., McComb C. and Steele E.J. (1991). The Adjuvanticity of Algammulin, a New Vaccine Adjuvant. *Vaccine*, 9: 408-415.
- Foye OT, Huang IF, Chiou CC, Walker WA, Shi HN. (2012). Early administration of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, Aug;65(3):467-80. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00978.x.
- Franck A. and De Leenheer L. (2002). Inulin, in Steinbuchel A., et al. (eds), *Biopolymers, Poly sac cha rid e s II: Polysaccharides from Eukaryotes*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Berlin, pp 439-479.
- Josep Bassaganya-Riera, Margaret DiGuardo, Monica Viladomiu, Anibal de Horna, Sandra Sanchez, Alexandra W. C. Einerhand, Lisa Sanders and *Raquel Hontecillas*. (2011). Soluble Fibers and Resistant Starch Ameliorate Disease Activity in Interleukin-10–Deficient Mice with Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr.* 141 (7): 1318-1325 doi: 10.3945/jn.111.139022.
- Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. (2009). Transforming growth factor beta 1 signalling, wound healing and epiair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgrad Med J*; 85: 9-14.
- Kelly, G. (2009). Inulin-type prebiotics: a review. (Part 2). *Alternative Medicine Review*, 4(1), 36-55.
- Kim BC, Kim HT, Park SH, Cha JS, Yufit T, Kim SJ, Falanga V. (2003). Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β signalling and decreased TGF- β Type II receptor expression. *J Cell Physiol.*; 195: 331-336.
- Kim Y., Faqih M.N. and Wang S.S. (2001). Factors Affecting Gel Formation of Inulin. *Carbohydrate Polymers*, 46: 135-145.
- Korbelik M. and Cooper P.D. (2007). Potentiation of Photodynamic Therapy of Cancer by Complement: The Effect of Gamma-Inulin. *British Journal Of Cancer*, 96: 67-72.

- Li MO, Flavell RA. (2008). TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134(3):392–404. doi:10.1016/j.cell.2008.07.025.
- Li, S., Weidenfeld J. and Morrissey E. E. (2004). Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol*, 24, 2, 809-22.
- Livak, K. J. e Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method." *Methods.*, 25(4): 402-408.
- Maharaj AS, Walshe TE, Saint-Geniez M, Venkatesha S, Maldonado AE, Himes NC, Matharu KS, Karumanchi SA, D'Amore PA. (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med* 205(2):491–501. doi:10.1084/jem.20072041.
- Massague J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell.*; 134(2):215-30.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.*; 103(2):295-309.
- Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J: Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor.
- Peter Cooper and Nikolai Petrovsky. (2011). Delta inulin: a novel, immunologically active, stable packing structure comprising β -D-[2→1] poly(fructo-furanosyl) α -D-glucose polymers. *Glycobiology* vol. 21(5): 595–606. doi:10.1093/glycob/cwq201.
- Poulain N., *et al.* (2003). Microspheres Based on Inulin for the Controlled Release of Serine Protease Inhibitors: Preparation, Characterization and in Vitro Release. *Journal of Controlled Release*, 92:27-38.
- Roberfroid M.B. (2005). *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. CRC Press, Boca Raton.
- Roberts AB, Sporn MB. (1992). Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev.*, 32: 91-98.
- Roberts AB, Sporn MB. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8(1):1–9.
- Ronkart S.N., *et al.* (2007). Isolation and Identification of Inulooligosaccharides Resulting from Inulin Hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604: 81-87.

- Ronkart S.N., et al. (2010). Impact of the Crystallisation Pathway of Inulin on Its Mono-Hydrate to Hemi-Hydrate Thermal Transition. *Food Chemistry*, 119:317-322.
- Silva D.G., Cooper P.D. and Petrovsky N. (2004). Inulin-Derived Adjuvants Efficiently Promote Both Th1 and Th2 Immune Responses. *Immunology and Cell Biology*, 82: 611-616.
- Stevens C.V., Meriggi A. and Booten K. (2001). Chemical Modification of Inulin, a Valuable Renewable Resource, and Its Industrial Applications. *Biomacromolecules*, 2: 1-16.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.*, 20:495–549.
- Tan AR, Alexe G, Reiss M. (2009). Transforming growth factor-beta signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 115(3):453–495. doi:10.1007/s10549-008-0184-1.
- Thomas Barclay, Milena Ginic-Markovic, Peter Cooper, Nikolai Petrovsky. (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *J. Excipients and Food Chem.*; 1 (3):27-50.
- Trushina EN, Martynova EA, Nikitiuk DB, Mustafina OK, Bařgarin EK. (2005). The influence of dietary inulin and oligofructose on the cell-mediated and humoral immunity in rats.; 74(3):22-7.
- Vos, A.P., Haarman, M., Budo, A., Govers, M., Knol, J., Garssen, J., Stahl, B., Boehm, G., M'Rabet, L. (2006). A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model. *International immunopharmacology*, 6(8), 1277-1286. doi:10.1016/j.intimp.2006.03.010.
- Xavier RJ, Podolsky DK. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448:427–34.

CONCLUSÃO

Frente às pesquisas e dados encontrados, o frutoligossacarídeo inulina não demonstrou influência e ação citotóxica diante dos resultados *in vivo*. Destacando quanto às análises que:

- Os níveis das transaminases, que refletem diretamente atividade tecidual e/ou na circulação, aspartato aminotransferase (AST) não demonstram alterações significativas. Sendo evidenciado, em 48 e 72 horas, elevação significativa junto aos níveis de alanino aminotransferase (ALT). Fato que pode estar associado à própria utilização de suplementos alimentares, como o tratamento por inulina e aumento da atividade física;
- A análise dos níveis de MDA, utilizado como marcador do estresse oxidativo, estabelecendo uma correlação crescente no estudo da lipoperoxidação, não evidenciou alterações significativas;
- Os parâmetros histopatológicos analisados refletem a não influência da inulina no comprometimento funcional dos órgãos (fígado e rins) analisados. As observações renais e hepáticas preservaram a arquitetura tecidual, corroborando com os resultados avaliados nas transaminases.

Os testes *in vitro* demonstraram:

- O não efeito da inulina na viabilidade celular, já que os níveis de lactato desidrogenase (LDH), em PBMC's tratadas não demonstram elevação significativa quando comparado ao grupo controle;
- Os experimentos por ELISA revelaram que a secreção de TGF- β 1 não foi alterada nas células PBMC's tratadas e controle;
- Diferentemente do que foi observado por ELISA, as análises de PCR-RT, demonstraram uma tendência ao aumento de TGF- β 1, em células tratadas quando comparadas ao grupo controle, no entanto, não foram estatisticamente significativas;
- Em relação ao fator de transcrição FOXP3, 24hs de tratamento com inulina foi capaz de aumentar a sua expressão em 7.6 vezes mais que o grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 529 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RDC nº18, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas

para análise e Comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 20 fev. 2011.

ALISSA, E.M.; FERNS, G.A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. **J Nutr Metab.** New York, 2012.

AMARAL, V.M.G. **A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde.** 2006. 86f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica/ Gestão da Qualidade Total) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ANDERSON, J.W.; HANNA T.J. Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. **J Nutr.**, 129(7):14575-665, 1999.

ANGELIS, R.C. Novos conceitos em nutrição: Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arq Gastroenterol.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 269-271, 2001.

ANJO, D.L.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Bras.**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANNES, J.P.; MUNGER, J.S.; RIFKIN, D.B. Making sense of latent TGF-beta activation. **J Cell Sci.**, 116(Pt2):217-224, 2003.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M.G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **J Allergy Clin Immunol.**, 120(2):227-35, quiz 36-7, 2007.

BADARÓ, A.C.L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V.; STRINGHETA, P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana parte 1. **Nutrir Gerais: R. D. de Nutrição Ipatinga:** Unileste-MG, v. 2 n. 3 Ago./Dez. 2008.

BAECHER-ALLAN, C.M; HAFLER, D.A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. **Clin Immunol.**, 117(2): 192, Discussion 193, 2005.

BALSANO, C.; ALISI, A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. **Curr Pharm Des.**, v.15, n.26, p.3063-3073, 2009.

BAN, Y.; TOZAKI T.; TOBE T.; JACOBSON, E.M.; CONCEPCION, E.S.; TOMER, Y. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. **J Autoimmun.**, v. 28, n. 4, p. 201-7, 2007.

BASSUNY, W.M.; IHARA, K.; SASAKI, Y.; KUROMARU, R.; KOHNO, H.; MATSUURA, N.; HARA, T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. **Immunogenetics.**, v. 55, n. 3, p. 149-56, 2003.

BELTRÁN-RAMÍREZ, O.; MARTÍNEZ, J.H.; SANTOYO, A.S.; TREVIÑO, S.V. **Mecanismo de Quimiopreención del Ester Fenílico del Ácido Caféico (Cape) en la iniciación de un Modelo de Hepatocarcinogénesis: Alteración de los CYP450.** Trabajo presentado no 2º Congreso Nacional de Química Médica. 2 al 8 Septiembre del 2006.

BENSON, J.R. Role of transforming growth factor h in breast carcinogenesis. **Lancet Oncol.**, 5: p. 229–39, 2004.

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

BOYTON, R.J.; ALTMANN, D.M. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? **Trends Immunol.**, 23, p. 526-529, 2002.

BRUNKOW, M.E.; JEFFERY, E.W.; HJERRILD, K.A.; PAEPER, B.; CLARK, L.B.; YASAYKO, S.A.; WILKINSON, J.E.; GALAS, D.; ZIEGLER, S.F.; RAMSDELL, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat Genet.**, v. 27, n. 1, p. 68-73, 2001.

CALABRESE, V.; BATES, T.E.; MANCUSO, C.; CORNELIUS, C.; VENTIMIGLIA, B.; CAMBRIA, M.T.; DI RENZO, L.; DE LORENZO, A.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. **Mol Nutr Food Res.**, Weinheim, v. 52, n. 9, p.1062-1073, 2008.

CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat Rev Immunol.**, v. 7(4):305-10, 2007.

CHAI, J.G.; XUE, S.A.; COE, D.; ADDEY, C.; BARTOK, I.; SCOTT, D. Regulatory T cells, derived from naive CD4⁺ CD25⁻ T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. **Transplantation**, v. 79(10):1310-6, 2005.

CHAUDHRY, A.; RUDRA, D.; TREUTING, P.; SAMNTEIN, R.M.; LIANG, Y.; KAS, A. CD4 regulatory T cells control Th17 responses in a Stat-3 dependent manner. **Science**, 326 (5955): 986-91, 2009.

CHEN, Z.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J.J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. **Semin Immunol.**, v. 19, p. 400-408, 2007.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. **Br J Nutr.**, v. 87, n. 2, maio 2002.

COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J.; KUO, T.T.; BOYD, K.; WANG, Y.; VIGNALI, K.M.; CROSS, R.; SEHY, D.; BLUMBERG, R.S.; VIGNALI, D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 566-569, 2007.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA, D.JR.; ARAUJO, J.A.P.; SALMAZI, K.C.; KALLAS, E.G.; ANDRADE, L.E.C. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. **Rev Bras Reumatol.**, v. 48, n. 6, p. 342-355, nov/dez, 2008.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat Res.**, v.591, p. 8-15, 2005.

DE ROSS, N.M.; KATAN, M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am J Clin Nutr.**, v.71, n.2, fev. 2000.

FEMIA, A.P. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofrutose in combination with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 23, p.1953-1960, 2002.

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

FONTENOT, J.D.; DOOLEY, J.L.; FARR, A.G.; RUDENSKY, A.Y. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. **J Exp Med.**, v. 202, n. 7, p. 901-906, 2005a.

FONTENOT, J.D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 329-41, 2005^b.

GAMARANO, L.; FRAIGE FILHO, F. Alimentos Funcionais no tratamento do Diabetes Mellitus. **Qualidade em Alimentação: Nutrição**. São Paulo: Ponto Crítico, n. 19, p. 20-21, jun./set. 2004.

GAMBINERI, E.; TORGERSON, T.R.; OCHS, H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 15, n. 4, p. 430-5, 2003.

GARCIA, A.P.M. Alimentos funcionais: contribuindo para a saúde e prevenindo doenças. **Qualidade em Alimentação: Nutrição**. São Paulo: Ponto Crítico, n. 19, jun./set. 2004.

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

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

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., eds. **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker, p.327-343, 2001.

- GRUPTA, S.; SHANG, W.; SUN, Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. **Arch Immunol Ther Exp**, 56(2):85-102, 2008.
- HAULY, M.C.; MOSCATTO, J.A. Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. **Semina: Ciên. Exatas e Tecnol.**, v. 23, p. 105-118, 2002.
- HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.
- HUGHES, R.; ROWLAND, I. R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. **Carcinogenesis**, v.22, n.1, 2001.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=469>, 2012.
- ITO, T.; HANABUCHI, S.; WANG, Y.H.; PARK, W.R.; ARIMA, K.; BOVER, L.; QIN, F.X.; GILLIET, M.; LIU, Y.J. Two functional subsets of Foxp3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 870-880, 2010.
- KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J Biosci.**, v. 27, n. 7, p. 703-714, dez./2002.
- KLASS, B.R.; GROBBELAAR, A.O.; ROLFE, K.J. Transforming growth factor beta 1 signalling, wound healing and epiair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. **Postgrad Med J.**, 85: 9-14, 2009.
- KIM, B.C.; KIM, H.T.; PARK, S.H.; CHA, J.S.; YUFIT, T.; KIM, S.J.; FALANGA, V. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β signalling and decreased TGF- β Type II receptor expression. **J Cell Physiol.**, 195: 331-336, 2003.
- KOCH, M.A.; TUCKER-HEARD, G.; PERDUE, N.R.; KILLEBREW, J.R.; URDAHL, K.B.; CAMPBELL, D.J. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nat Immunol.**, 10 (6): 595-602, 2009.
- KORHONEN, H. Technology options for new nutritional concepts. **J Dairy Technol.**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 79-88, 2002.
- LEE, KYOUNG-MU; SUE KYUNG PARK, NOBUYUKI HAMAJIMA, KAZUO TAJIMA, KEUN-YOUNG YOO, AESUN SHIN, DONG-YOUNG NOH, SEI-HYUN AHN, ARI HIRVONEN, DAEHEE KANG. Genetic polymorphisms of TGF-b1 & TNF-b and breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat.**, 90: 149–155, 2005.
- LATTIMER, J.M.; HAUB, M.D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. **Nutrients**, v. 2, p. 1266-1289, 2010.
- LEE, B.M.; PARK, K.K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutat Res.**, v. 523-524, p. 265-278, 2003.

LE MARCHAND, LOÏC; HAIMAN, CHRISTOPHER A.; VAN DEN BERG; LYNNE R., DAVID; KOLONEL, WILKENS LAURENCE; HENDERSON, BRIAN E. T29C Polymorphism in the Transforming Growth Factor B1 Gene and Postmenopausal Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, march:13(3), 2004.

LOPES, J.E.; TORGERSON, T.R.; SCHUBERT, L.A.; ANOVER, S.D.; OCHELTREE, E.L.; OCHS, H.D.; ZIEGLER, S.F. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. **J Immunol.**, v. 177, n. 5, p. 3133-42, 2006.

LOURENÇO, E.V.; LA CAVA A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 44, n. 1, p. 33-42, 2011.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Rev Brasil Ciên Avícolas**. vol. 3, n. 1, Campinas, Jan./Apr. 2001.

MAHARAJ, A.S.; WALSH, T.E.; SAINT-GENIEZ, M.; VENKATESHA, S.; MALDONADO, A.E.; HIMES, N.C.; MATHARU, K.S.; KARUMANCHI, S.A.; D'AMORE, P.A. VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. **J Exp Med.**, 205(2):491–501, 2008.

MAROLY, K.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 816-822, 2001.

MARSON, A.; KRETSCHMER, K.; FRAMPTON, G.M.; JACOBSEN, E.S.; POLANSKY, J.K.; MACISAAC, K.D.; LEVINE, S.S.; FRAENKEL, E.; VON BOEHMER, H.; YOUNG, R.A. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 931-5, 2007.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **Int Dairy J.**, Amsterdam, v.12, p. 173-182, 2002.

MAYNARD, LEIGH J.; FRANKLIN, SHARON T. Functional Foods as a Value-Added Strategy: The Commercial Potential of “Cancer-Fighting” Dairy Products. **Rev Agric Economics**, v. 25, n. 2, p. 316-332, Fall/Winter, 2003.

MELO, E.A. et al. Efeitos benéficos dos alimentos probióticos e prebióticos. **Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 174-179, 2004.

MELO, K.M.; CARVALHO, B.T.C. *T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases*. **Rev Bras Alerg Immunopatol.**, v. 32, nº 5, 2009.

MENNE, E.; GUGGENBUHL, N. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. **J Nutr.**, v. 130, n. 5, maio/2000.

- MILNER, J.A. Functional foods: the US perspective. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, p.1654-1659, 2000.
- MURAROLLI, V.D.A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev Eletr Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- NAIR, K.K.; KHARB, S.; THOMPSON, D.K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes – A review inulin dietary fiber with functional and health attributes. **Food Reviews International**, London, v. 26, n. 2, p. 189-203, 2010.
- NDHLOVU LC, LOO CP, SPOTTS G, NIXON DF, HECHT FM. FOXP3 expressing CD127^{lo} CD4⁺ T cells inversely correlate with CD38⁺ CD8⁺ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. **J Leukoc Biol.**, Feb;83(2):254-62, 2008.
- NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **J Nutr.**, v.129, n.7, p. 14025-14065, jul./1999.
- OHKURA, N.; SAKAGUCHI, S. Maturation of effector regulatory T cells. **Nat Immunol.**, v.12, n. 4, p. 283-284, 2011.
- OLIVEIRA, F.T. Benefícios Nutricionais da Inulina e sua Aplicação na Indústria de Alimentos. Londrina, 2006a. Anais de Pesquisa e Extensão do Centro Universitário Filadélfia.
- OLIVEIRA, R.J. 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**, v. 20, p. 1225-1233, 2006.
- PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos, **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.33, n.2, 385-390, 2003.
- PICCIRILLO, C.A. Regulatory T cells in health and disease. **Cytokine**, 43(3): 395-401, 2008.
- READ, S.; GREENWALD, R.; IZCUE, A.; ROBINSON, N.; MANDELROT, D.; FRANCISCO, L.; SHARPE, A.H.; POWRIE, F. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. **J Immunol.**, 177(7): 4376-83, 2006.
- RENHE, I.R.T.; VOLP, A.C.P.; BARBOSA, K.B.F.; STRINGHETA, P.C. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. **Rev Bras Nutr Clínica**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 119-126, 2008.

- ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of experimental neoplastic development: role of fat and fibre content and caloric intake. **Mutat Res.**, v. 259, p. 351-362, 1993.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v.73 (suppl.), p.406-409, 2001.
- ROBERFROID, M. B. Functional foods: concept and application to inulin and oligofructose. **Br J Nutr.**, v. 87, n. 2, maio/2002.
- ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type frutans. **Br J Nutr.**, v.93, n.1, abr. 2005.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: The concept revisited. **J Nutr.**, Bethesda, v. 137, n. 3, p. 830, 2007.
- ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factorbeta (TGF-beta). **Grow Factors**, 8(1):1-9, 1993.
- ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterization of na enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, Barking, v. 95, p. 77-82, 2006.
- RODRÍGUEZ, M.B.S.; MEGÍAS, S.M.; BAENA, B.M. Alimentos Funcionales y Nutrición óptima. **Rev Espanha Salud Públ.**, v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.
- ROLAND, N. *et al.* Modulation of the biogenical effects of glucosinalates by inulin and oat fibre in gnotobiotic rats inoculated with a whole human flora. **Food and Chem. Toxicology**, v. 34; p.671-677, 1996.
- ROY, M.; GIBSON, G.R. Probiotics and prebiotics microbial in menu. Capturado em 21 de novembro de 1999.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev Bras Ciên Farmac.**, v.42, n.1, janeiro/março 2006.
- SAHIN, M.; SAHIN, E.; KOKSOY, S. Regulatory T cells in cancer; an overview and perspectives on Cyclooxygenase-2 and Foxp3 DNA methylation. **Hum Immunol.**, 2013.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. **Nat Immunol.**, 6(4):345-52, 2005.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells. **Springer Semin Immunopathol.**, 28(1):1-2, 2006.
- SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-87, 2008.
- SANTOS, L.C.; CANÇADO, I.A.C. Probióticos e prebióticos: vale a pena incluí-los em nossa alimentação! **SynThesis Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, n.1, 2009.< www.fapam.edu.br/revista>.

SARDO, C.L. Nutrition and Cancer Chemoprevention Within an Integrative Health Promotion Model. In: (Ed.). **From Cancer Rehabilitation and Survivorship: Transdisciplinary Approaches to Personalized Care**. Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society: Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society, 2011. cap. 26.

SARKAR, S. Functional foods as self-care and complementary medicine. **Nutr Food Service**, v. 37, n. 3, p. 160-167, 2007.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. **Trends Food Sci Technol.**, Cambridge, v. 20, p. 376-387, 2009.

SHIN, AESUN; SHU, XIAO-OU; CAI, QIUYIN; GAO, YU-TANG; ZHENG, WEI. Genetic Polymorphisms of the Transforming Growth Factor-b1 Gene and Breast Cancer Risk: A Possible Dual Role at Different Cancer Stages. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 14(6), june/2005.

SOJKA DK, HUANG YH, FOWELL DJ. Mechanisms of regulatory Tcell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, 124(1):13-22, 2008.

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

TAAMS, L.S.; PALMER, D.B.; AKBAR, A.N.; ROBINSON, D.S.; BROWN, Z.; HAWRYLOWICZ, C.M. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. **Immunology**, 118 (1):1-9, 2006.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nat Immunol.**, 9(3):239-44, 2008.

TOKER, A.; HUEHN, J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. **Science signaling.**, 4(158):pe4, 2011.

TORGERSON, T.R.; OCHS, H.D. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**, 7(6):515-21, 2007.

VAN DER VLIET, H.J.; NIEUWENHUIS, E.E. IPEX as a result of mutations in FOXP3. **Clin Dev Immunol.**, 2007.

VERGHESE, M.; RAO, D.R.; CHAWAN, L.L.; SHACKELFORD, L.; SHACKELFORD, W. Dietary inulin suppresses azoxymethane- induced preneoplastic aberrant crypt foci mature fisher 344 rats. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2804-2808, 2002.

VICENTINI, A.P. **Avaliação dos efeitos de dieta enteral a base de glutamina na prevenção de danos clastogênicos que podem levar ao desenvolvimento de câncer**. Londrina, 2006. Simpósio de Iniciação Científica, Pesquisa e Extensão do Centro Universitário Filadélfia.

VIGNALI, D.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol.**, 8(7):523-32, 2008.

VON BOEHMER H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat Immunol.**, 6(4): 338-44, 2005.

WALZEM, R. L. Functional foods. **Trends Food Sci Technol.** v. 15, p. 518, 2004.

WANG, Y. Probiotics: present and future in food Science and technology. **Food Res Internat.**, Essex, v. 42, p. 8-12, 2009.

WILDIN, R.S.; SMYK-PEARSON, S.; FILIPOVICH, A.H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **J Med Genet.**, v. 39, n. 8, p. 537-545, 2002.

WILDIN, R.S.; FREITAS, A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. **J Autoimmun.**, v. 25, p. 56-62, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** Geneva, 2009. 149 p.

YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol.**, 16(11):1643-56, 2004.

YI, H.; ZHEN, Y.; JIANG, L.; ZHENG, J.; ZHAO, Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. **Cell Mol Immunol.**, v. 3, n.3, p. 189-195, 2006.

YNGVE, A. A historical perspective of the understanding of the link between diet and coronary heart disease. **Am J Lifestyle Med.** Thousand Oak, v.3, n.1, 355-385, 2009.

YOU, S.; LEFORBAN, B.; GARCIA, C.; BACH, J.F.; BLUESTONE, J.A.; CHATENOU, L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. **Proc Natl Acad Sci.**, U.S.A., 104 (15): 6335-40, 2007.

ZHENG, Y.; CHAUDHRY, A.; KAS, A.; DE ROSS, P.; KIM, J.M.; CHU, T.T. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. **Nature**, 458 (7236): 351-6, 2009.

ZHENG, Y.; JOSEFOWICZ, S.Z.; KAS, A.; CHU, T.T.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A. Y. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 936-40, 2007.

ZHOU, L.; IVANOV, I.I.; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D.E.; LEONARD, W.J.; LITTMAN, D.R. IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol.** 8, 967-974, 2007.