

IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES E FORMAÇÕES TUMORAIS COM PRODUÇÃO ALTERADA DE MUCINA, POR MEIO DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR.

Bruno Bueno Pimenta (PIBIC/Uem), Raíssa Coracini Varago, Edilson Noboioshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Raissa Bocchi Pedroso, Paola da Costa Souza Jorge Silva (Co-Orientador), Tânia Cristina Alexandrino Becker (Orientador), e-mail: tcabecker@uem.br.
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

4.00.00.00-1 – Ciências da saúde

4.06.03.00-8 – Medicina Preventiva

Palavras-chave: Focos de Criptas aberrantes, 1,2-dimetilhidrazina (DMH), Células produtoras de mucinas.

Resumo: Focos de Criptas aberrantes (FCA) formados por criptas aberrantes (CA) são identificadas como lesões pré-neoplásicas, devido à presença de displasias teciduais e anormalidades da secreção e de distribuição das mucinas no epitélio intestinal do cólon. Objetivamos avaliar o desenvolvimento de CA e FCA por indução de carcinogênese colorretal, em ensaios de curto prazo (15 semanas - Grupo P₂-pré) e médio prazo (24 semanas - Grupo P₂) e analisar as alterações da produção de mucina ácidas, por meio da coloração de *Alcian Blue* (AB). Os resultados da classificação dos FCA observados demonstraram predomínio de focos com 01 e 02 a 03 CA/foco e redução na produção de mucinas na região distal em relação a proximal, no grupo P₂-pré. No grupo P₂, observamos predomínio de focos com 04 a 09 CA/foco, além de 02 adenomas hiperplásicos/displásicos de grau baixo grau displásico. Além disto, quando comparamos os protocolos (P₂P e P₂), observamos diferença estatística entre os grupos quanto ao número de células produtoras de mucinas. Assim, a presença de FCA e a quantificação de células produtoras de mucina podem ser considerados marcadores morfológicos precoces de tumores na carcinogênese colônica.

Introdução

O câncer colorretal é um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental. A alta incidência e mortalidade da doença devem-se ao diagnóstico tardio, afirmando a necessidade de melhores ferramentas para o diagnóstico precoce. Na mucosa do cólon, as criptas são constituídas por vários tipos de células, dentre elas, as caliciformes, produtoras de muco. Estas aumentam progressivamente em número à medida que se dirige aos segmentos caudais do intestino grosso. Essas diferenças na população de células caliciformes ao longo do cólon, refletem no padrão e intensidade de expressão das mucinas quando se comparam segmentos cólicos distintos (1). As mucinas são classificadas como neutras e ácidas. O corante Alcian-blue identifica as ácidas, especialmente as sialomucinas. Anormalidades na secreção, composição, padrão de distribuição das mucinas no epitélio intestinal vêm sendo demonstradas em diversas patologias do cólon, como pólipos adenomatosos e o câncer colorretal (CCR) (2). Bird (1997) descreveu

as criptas intestinais normais e, as criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA). Estas últimas (CA e FCA) são consideradas como supostas lesões pré-neoplásicas no cólon. O CCR normalmente se desenvolve a partir de um pólipó benigno, podendo transformar-se em adenoma displásico e evoluir para carcinoma com potencial metastático. Os adenomas são caracterizados por hiperplasticidade com núcleos hiperplásticos, diferentes graus de estratificação nuclear e diminuição da produção de mucina. Os tumores que penetram da mucosa para a submucosa, podendo atingir a camada muscular, são classificados como adenocarcinomas (4). O 1,2 dimetilhidrazina (DMH) é frequentemente utilizado para indução da carcinogênese experimental colorretal. Este composto é usado como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção, e possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (3). Com o advento de programas de análise de imagem assistida por computador, estudos demonstraram a possibilidade de se determinar parâmetros histológicos e a quantificação da produção de mucinas na mucosa colônica (2). Desta maneira, este estudo teve por objetivo avaliar a produção de mucinas ácidas pelas células colônicas, a fim de correlacionar, a presença de FCA com a produção de mucina entre dois ensaios (curto prazo - 15 semanas; médio prazo -24 semanas), no modelo de carcinogênese induzida por DMH em ratos.

Materiais e métodos

Neste projeto realizamos a análise de blocos parafinizados que foram obtidos de um protocolo experimental (4). Os intestinos (cólon) foram divididos em dois segmentos, referendados como cólon proximal (adjacente ao ceco) e cólon distal (adjacente ao reto). As colorações realizadas para análise dos tumores e de mucinas ácidas, foram HE e *Alcian Blue* (AB), respectivamente, segundo o critério da ausência ou redução da produção de mucinas. Os FCA foram analisados previamente ao embocamento, pelo corante azul de metileno, baseando-se na distorção da abertura do lúmen em comparação com criptas normais circundantes e a multiplicidade do número de criptas que formam cada foco. Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas sendo expressos como média \pm desvio padrão da média. Para comparação das médias foi utilizado o Teste t de Student com $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Os FCA foram morfológicamente diferenciados das criptas normais do cólon normal adjacente e as categorias histológicas incluíram CA isolada e FCA com 02 a 03, 04 a 09 ou mais de 10 CA/foco. A análise da superfície da mucosa intestinal demonstrou a presença de CA isolada e FCA ao longo de toda superfície intestinal investigada, apenas nos grupos expostos a DMH. A maioria dos FCA estavam presentes no cólon distal em ambos os tempos de experimento, demonstrando que os FCA não são lesões aleatórias do cólon de roedores tratados com agentes carcinogênicos do cólon (5). O número de CA isoladas no grupo P₂-pré foi superior ao grupo P₂. Por outro lado, quando observamos os FCA com 02-03 e 04-09 criptas/foco não observamos um aumento estatisticamente diferente em relação aos tempos de experimento, tanto no cólon distal quanto no proximal (Tabela 01). Este resultado

provavelmente está relacionado com a forma de indução da carcinogênese (indução fracionada em doses semanais ao longo de 10 semanas) e o intervalo de sacrifício dos animais ser de apenas 9 semanas. Porém, observamos no cólon distal (sigmóide), a presença de 02 adenomas de baixo grau displásico, que variaram entre 4 a 6 mm de tamanho, apenas no protocolo P₂ (Fig 02.) e, portanto, a formação de adenomas pode corresponder a fase de progressão da carcinogênese do cólon (1). Este resultado coincidiu com o encontrado quanto ao maior número de FCA ser maior no cólon distal, nos vários grupos de animais analisados. Além disto, a produção de mucinas, no grupo P₂-pré, não houve diferença estatística quanto ao número de células produtoras de mucinas entre os grupos controle e DMH, tanto para P₂P quanto para P₂, porém houve diferença estatística quanto ao número de células produtoras de mucinas entre os tempos de 15 e 24 semanas (tabela 02 e Fig. 01). Observamos também que os tumores observados no grupo P₂ apresentaram redução ou ausência de produção de mucinas (Fig. 02). Assim, podemos inferir que as regiões dos FCA são provavelmente os mesmos locais de desenvolvimento dos tumores, o que significa que eles podem ser eventos biológicos sequencialmente relacionados (4). Interessantemente, todos os tumores foram do grupo P₂ e apresentaram-se como adenomas displásicos bem diferenciados, apesar da redução/ausências de mucina. Estes resultados indicam que os FCA e a quantificação de mucinas podem ser considerados parâmetros morfológicos precoces na via de detecção de tumores na carcinogênese colônica (2).

Tabela 01. Número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (%) nos tempos experimentais (P₂P-15 semanas; P₂-24 semanas) dos ratos tratados com DMH.

Grupos	Total nº FCA		Nº de criptas/foco							
			01 cripta		02-03 criptas		04-09 criptas		≥10 criptas	
	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
DMH – P ₂ -pré (N=06)	145 (20)	576 (80)	72 (10)	172 (23,9)	55 (7,6)	251 (34,8)	18 (2,5)	153 (21,2)	-	
	T=721									
DMH – P ₂	155 (20,8)	502 (70,4)	81 (11,2)	129 (18,0)	47 (6,5)	168 (23,3)	27 (3,7)	192 (26,6)	-	13 (1,8)

DMH – dimethylhydrazine; P – cólon proximal; D – cólon distal.

Tabela 02. Valores da quantificação de mucina ácidas nos protocolos experimentais P₂P e P₂ dos ratos tratados com DMH.

	P ₂ P	P ₂
Controle	202,80 ± 4,95	168,82 ± 27,48
DMH	231,85 ± 50,57	150,10 ± 37,58

DMH – dimethylhydrazine; P₂P: Protocolo exp. 15 semanas; P₂: tempo exp. 24 semanas; * Teste t de Student com diferença estatística para p ≤ 0,05

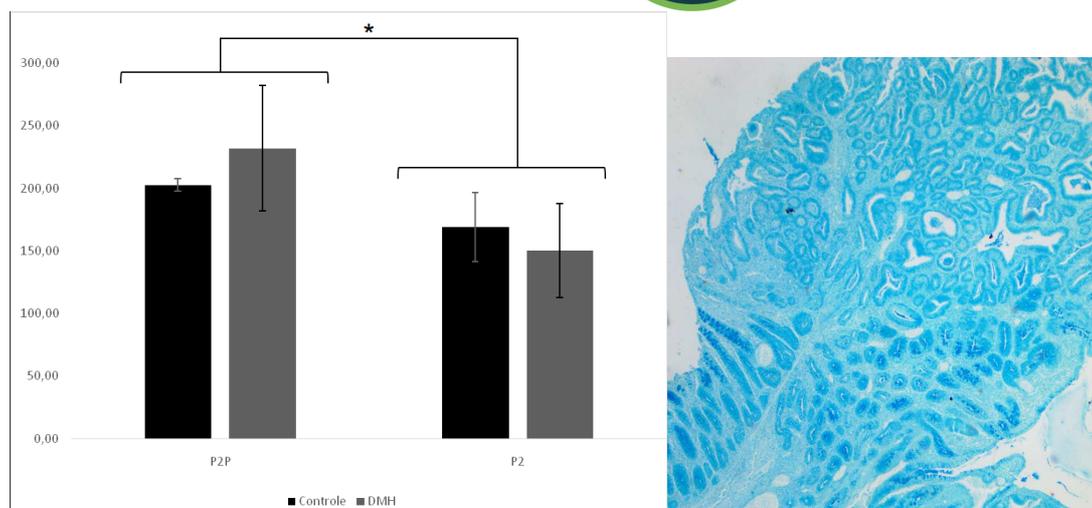


Figura 01. Quantificação de mucina ácidas nos protocolos experimentais P₂P e P₂ dos ratos tratados com DMH. * p<0,05

Figura 02.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a indução de FCA por DMH e a quantificação de mucinas, teve correlação com o desenvolvimento dos adenomas. Estes resultados suportam a hipótese que os FCA são lesões precursoras de tumores no cólon e podem ser usadas em experimentos de curta duração como substituto para avaliar a carcinogênese e atividade anti-câncer em modelos de indução química em estudos da carcinogênese colônica.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelos recursos financeiros no pagamento de bolsa de Iniciação Científica concedida ao discente deste projeto de pesquisa.

Referências

1. KLERSZENBAUM AL. Histologia e Biologia celular: **Uma introdução a patologia**. Tradução Nádia Vieira Rangel, Rodrigo Alves Azevedo. RJ, Elsevier, cap 16. 2004.
2. MARTINEZ CAR, NONOSE R, MARGARIDO NF, SPADARI APP, PEREIRA JA, PRIOLLI DG, MÁXIMO FR. **Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal**. Estudo experimental em ratos. Rev bras Coloproct. (Supl 1):47-8. 2008.
3. BIRD, R.P. **Observation and qualification of aberrant crypt in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings**. Cancer Lett., v.37, p.147-51, 1987.
4. FUKUI, M. et al. **The tumor-preventing effect of a mixture of several lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice**. Oncology reports, Athens, v. 8, p. 1073-1078, 2001.
5. MA, OY; WILLIAMSON, KE; ROWLANDS, BJ. **Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis**. World Journal of gastroenterology, v. 8, p. 847-852. 2002.