

## **ANÁLISE QUANTITATIVA DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS A SEROTONINA NA MUCOSA DO JEJUNO DE RATOS COM TUMOR DE WALKER-256 SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA**

Erika Xavier dos Santos(PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (CCB/DCM), Sara Raquel Garcia de Souza (CCB/PGB)Jacqueline NelisisZanoni(Orientador), e-mail: zanonijn@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

### **Morfologia/ Histologia**

**Palavras-chave:** L-glutamina, serotonina, tumor de Walker-256.

### **Resumo:**

O objetivo deste estudo foi avaliar as células imunorreativas a serotonina (5-HT-IR) na mucosa do jejuno de ratos, com Tumor de Walker-256, suplementados com L-glutamina através da ração. Foram tratados 20 ratos por 14 dias, distribuídos em: C (animais controle), CG (animais controle suplementados com L-glutamina a 2%), T (animais portadores de tumor de Walker-256) e TG (animais portadores de tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina a 2%). Após 14 dias de período experimental os jejunos foram coletados e processados para realização de técnica imunohistoquímica para evidencição de células imunoreativas a 5-HT na mucosa intestinal. As imagens foram analisadas através do programa Image Pro Plus a qual foram contadas 50 unidades cripto/vilo e após submetidos a análise estatística pelo programa GraphPadPrism 6, nível de significância adotado foi de 5%. Foi evidenciado um aumento no número de células 5-HT-IR de 38,9% no grupo G em relação ao grupo C ( $p < 0,001$ ). No entanto, houve uma redução de 31,7% no número de células serotoninérgicas no grupo T em comparação com o grupo C ( $p < 0,001$ ). No grupo TG, o número de células 5-HT-IR foi preservado em 35,1% em relação ao grupo T ( $p < 0,001$ ). Os resultados mostraram que a suplementação com L-glutamina 2% acarretou no desenvolvimento de efeito tóxico em animais saudáveis visto através do aumento de células 5-HT-IR no grupo G. Ademais, o tumor Walker-256 apresentou efeitos negativos na expressão de 5-HT no jejuno. Contudo, a suplementação com L-glutamina exibiu um efeito neuroprotetivo através da preservação da perda de células 5-HT-IR.

### **Introdução**

Sabe-se que aproximadamente 90% da quantidade de 5-HT do organismo encontram-se nas células enterocromafins, onde exerce a função de propulsão da musculatura lisa intestinal. As células enterocromafins estão localizadas junto às células da mucosa, principalmente no intestino delgado (DELUCIA et al., 2007). O câncer é uma patologia que tem feito milhares de vítimas fatais por todo o mundo. Uma das formas mais drásticas de sua

manifestação é a caquexia. Alterações na motilidade intestinal podem ser consequência do fenômeno da caquexia associado ao estresse oxidativo intenso presente nesta condição. Como modelo experimental para induzir caquexia em ratos utilizou-se o tumor Walker-256, devido ao seu desenvolvimento rápido, uniforme e com características tumorais bem definidas (ANGELO et al, 2009). Doenças inflamatórias, diabetes, câncer, envelhecimento e exercícios extenuantes podem deprestar a glutatona endógena, o principal antioxidante do organismo, levando ao estresse oxidativo. Neste sentido, a suplementação com L-glutamina, se mostra capaz de atuar na redução de radicais livres em diversas situações, influenciando assim, na integridade da barreira intestinal e a plasticidade neural entérica (OLIVEIRA et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar as células imunorreativas a serotonina (5-HT-IR) na mucosa do jejuno de ratos com Tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina.

### **Materiais e métodos**

Foram utilizados 20 ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 55 dias de idade. Os animais foram aclimatados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 5 animais cada, sendo estes: C (animais controle), CG (animais controle suplementados com L-glutamina a 2%), T (animais portadores de tumor de Walker-256) e TG (animais portadores de tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina a 2%). O período experimental foi de 14 dias. Os animais com tumor Walker-256 (T e TG) foram inoculados uma suspensão de células tumorais (Walker-256) contendo  $8,0 \times 10^7$  células tumorais viáveis em 0,5 ml em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 16,5 mM, pH 7,5 por animal, no flanco direito. Nos animais do grupo controle foram inoculados PBS 16,5 mM, pH 7,5 no mesmo local. Os animais não suplementados (grupos C e T) receberam ração padrão balanceada para roedores Nuvilab®, enquanto os animais suplementados (G e TG) receberam L-glutamina incorporada na ração padrão à proporção de 2 g / 100g de ração. Após o período experimental, os animais foram eutanaziados e os segmentos intestinais foram abertos ao longo da borda mesentérica e inseridos em peças de isopor com a ajuda de espinhos com a superfície mucosa voltada para cima. Em seguida, eles foram lavados e fixados por 18h em Zamboni, submetidos a crioproteção e congelamento. Posteriormente, realizou-se cortes semi-seriados de  $8\mu\text{m}$  em criostato para realização de técnica de imunohistoquímica utilizando os anticorpos RB anti-SHT (1:600) e Donkey anti-RB (1:500). As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co., Shanghai, China) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX40 (Olympus Co., Japão). Em seguida, o programa Image-Pro Plus foi utilizado para analisar as imagens, que se baseava na quantificação de células 5-HT-IR em 50 unidades

vilosidades/criptas e lâmina própria da mucosa jejunal. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Foi aplicado One-way ANOVA, seguido de pós teste Fisher's. O nível de significância utilizado foi de 5%.

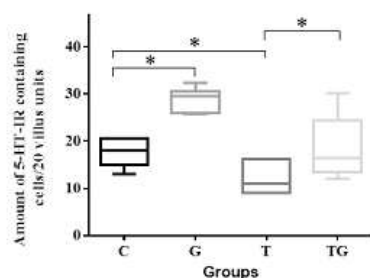
## Resultados e Discussão

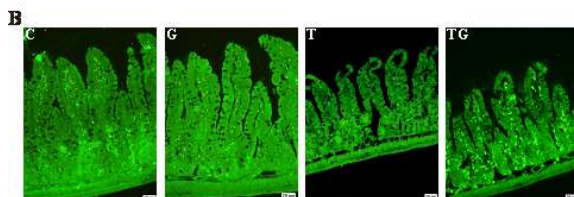
Foram observados parâmetros que confirmaram o modelo experimental, como o crescimento tumoral no flanco do animal, pêlos eriçados, testículos arroxeados, olhos opacos e perda de peso.

Observou-se um aumento no número de células 5-HT-IR de 38,9% no grupo G em relação ao grupo C ( $p < 0,001$ ; Figura 1). Em contraste, houve uma redução de 31,7% no número de células serotoninérgicas no grupo T em comparação com o grupo C ( $p < 0,001$ , Figura 1). No grupo TG, o número de células 5-HT-IR foi preservado em 35,1% em relação ao grupo T ( $p < 0,001$ , Figura 1).

Considerando a função serotoninérgica do jejuno, observou-se um aumento notável no número de células que sintetizam serotonina (5-HT) no grupo G. Isso pode ter ocorrido como um mecanismo compensatório contra a ação neurotóxica da L-glutamina para manter a função normal do sistema digestivo. Além disso, a diminuição significativa no número de células IR de serotonina no grupo T demonstra a função serotoninérgica reduzida com a presença do tumor. No entanto, a suplementação com L-glutamina, no grupo TG, levou a uma preservação do número destas células contendo 5-HT semelhantes às observadas no grupo C. Estes resultados observados neste estudo foram muito semelhantes aos resultados encontrados por (ROSA et al., 2015) que usou um modelo de diabetes tipo 1. Os distúrbios gastrointestinais que surgem de diabetes mellitus também podem estar relacionados a níveis baixos de serotonina, afetando assim a regulação peristáltica e a atividade neuronal entérica (ROSA et al., 2015; GRIDER et al., 1998).

A





**Fig. 1**-Imagens representativas da quantificação de células contendo 5-HT no jejuno. (A) Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os valores seguidos por \* ( $p < 0,05$ ) são significantes. N = 6 ratos por grupo. (B) Fotomicrografias de células contendo 5-HT por imuno-histoquímica no jejuno. Grupos experimentais: controle (C); Controle suplementado com 2% de L-glutamina (G); Tumor Walker-256 (T); Tumor Walker-256 suplementado com 2% de L-glutamina (TG). Barra de escala = 20 $\mu$ m

### Conclusões

Esta pesquisa mostrou que a suplementação com L-glutamina 2% acarretou no desenvolvimento de efeito tóxico em animais saudáveis visto através do aumento de células 5-HT-IR no grupo G. Além disso, o tumor Walker-256 apresentou efeitos negativos na expressão de 5-HT no jejuno. No entanto, a suplementação com L-glutamina exibiu um efeito neuroprotetivo através da preservação da perda de células 5-HT-IR.

### Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

### Referências

ANGELO, H. R. S; OLIVEIRA, G. G. Caquexia e alterações bioquímicas em ratos com tumor de Walker 256. **Terra e Cultura**, n.48 e 49 - Ano 25, 2009.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M.C.W., (Eds). **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 701p.

GRIDER, J. R.; FOXX-ORENSTEIN, A. E.; JIN, J. 5-Hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. **Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p.370-380, 1998.

OLIVEIRA, G. P.; DIAS, C. M.; PELOSI, P.; ROCCO, P. R. M. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 417-430, 2010.

ROSA, C. V. D. D., AZEVEDO, S. C. S. F., BAZOTTE, R. B., PERALTA, R. M., BUTTOW, N. C., PEDROSA, M. M. D., GODOI, V. A. F. D. AND NATALI, M. R. M. Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine Changes Biochemical Parameters and Jejunum Morphophysiology in Type 1 Diabetic Wistar Rats. **Plos One**, v. 10, n.12, p.e0143005, 2015.

26º Encontro Anual de Iniciação Científica  
6º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



16 e 17 de outubro de 2017

