

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE VARICOSIDADES IMUNORREATIVAS AO VIP NO PLEXO MIENTÉRICO DO JEJUNO DE RATOS COM TUMOR DE WALKER 256 ADMINISTRADOS COM GLUTATIONA

Lídia Rodrigues Cicero¹ (PIBIC/FA), Ana Paula de Oliveira², Jacqueline Nelisis Zanoni², Marcílio Hubner de Miranda Neto² (orientador)
(email:mhmneto@uem.br)

¹Acadêmica de Ciências biológicas – UEM. ² Laboratório de Plasticidade Neural Entérica UEM / Maringá, PR. Centro de Ciências Biológicas / UEM / Maringá, PR.

Morfologia/Histologia

Palavras-chave: Câncer, estresse oxidativo, glutaciona.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a morfometria das varicosidades imunorreativas ao polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), no plexo mientérico do jejuno de ratos com tumor de Walker 256, administrados com glutaciona 1%. Foram utilizados ratos Wistar machos, distribuídos em quatro grupos: Controle (C); Controle tratado com L-glutaciona a 1% (CGT); portadores de Tumor de Walker-256 (TW); portadores de Tumor de Walker-256 tratados com L-glutaciona a 1% (TWGT). Ao final de 14 dias, os ratos foram eutanasiados e o jejuno coletado para a realização das técnicas imunohistoquímicas. Foi realizada uma análise morfométrica das varicosidades VIPérgicas. Os resultados foram submetidos ao teste One-way (ANOVA), seguida de teste de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise morfométrica revelou uma diminuição na área das varicosidades no grupo TW ($p < 0,0001$). Já nos animais TWGT houve um aumento neste parâmetro ($p < 0,05$), enquanto que no grupo CGT não apresentou alteração significativa ($p > 0,05$). Conclui-se que, o tratamento com L-Glutaciona 1% apresentou efeito neurotrófico através do aumento da expressão VIPérgica no plexo mientérico de ratos portadores de tumor de Walker-256. Porém será necessária uma análise quantitativa para confirmar tais resultados.

Introdução

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento anormal de células resultando no tumor. Quando este apresenta características evasivas causa diversas alterações fisiológicas que compromete diversos órgãos e tecidos, inclusive os extras tumorais, como o Sistema Nervoso Entérico (SNE) (VICENTINI et al., 2016). Dentre as variações fisiopatológicas provocadas pelo câncer está o estresse oxidativo que se caracteriza pela produção excessiva de espécies reativas (ER). Neste contexto, a interação das ER com macromoléculas celulares leva a um processo de morte celular e dano

tecidual (CHENG et al., 2018). A glutathiona é um dos principais agentes antioxidante das células para combater o excesso de ER. O SNE é composto por uma rede de neurônios presente em dois plexos principais no trato gastrointestinal, o mioentérico e o submucoso. A subpopulação neural VIPérgica é uma das mais importantes redes intrínsecas entérica, que faz parte da classe de neurotransmissores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC). O polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), além de sua participação no relaxamento muscular atua também como neuroprotetor, no equilíbrio oxidativo, na inflamação e regeneração neuronal (HERMES-ULIANA et al., 2014). O objetivo deste estudo foi avaliar a morfometria das varicosidades imunorreativas ao VIP, no plexo mientérico do jejuno de ratos com tumor de Walker 256, administrados com L-glutathiona 1%.

Materiais e métodos

Foi utilizado neste estudo o jejuno de ratos machos com 55 dias de idade, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá sob o nº 7434160316 (CEUA). O período experimental teve duração de 14 dias. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle (C); Controle tratado com L-glutathiona a 1% (CGT); portadores de Tumor de Walker-256 (TW); portadores de Tumor de Walker-256 tratados com L-glutathiona a 1% (TWGT). Os animais portadores de Tumor de Walker 256 (grupos TW e TWGT) foram obtidos por inoculação de uma suspensão de células tumorais (Walker-256) injetadas no flanco direito traseiro dos ratos. Os animais C e TW receberam ração padrão, enquanto os animais sujeitos ao tratamento (grupos CGT e TWGT) receberam ração incorporada com 1% de L-glutathiona (Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda, Limeira, SP, Brasil) na proporção 1g/100g de ração (HERMES-ULIANA et al., 2014). Ao final do período experimental todos os animais foram submetidos à pesagem e eutanasiados com uma sobredosagem de tiopental (150 mg/kg). O Jejuno foi coletado e o preparado total do plexo mientérico foi submetido à técnica de imunohistoquímica utilizando o anticorpo primário rabbit anti-VIP (1:300). A seguir, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 568 Donkey anti-rabbit (1:500). Após a captura das imagens em um microscópio de fluorescência, a área de 300 varicosidades foi mensurada para cada animal (μm^2). Os resultados foram submetidos à análise estatística, expressos como média \pm erro padrão. Foi realizada análise de variância One-way (ANOVA), seguida de teste de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

A área das varicosidades VIP-IR apresentaram uma diminuição de 7,3% nos ratos portadores de TW-256 (TW vs C; $p < 0,0001$; Figura 1.a). No grupo TWGT houve um aumento na área do corpo das varicosidades de aproximadamente 28% (TWGT vs TW; $p < 0,0001$; Figura 1.a). No grupo

CGT não houve um aumento significativo no do corpo das varicosidades VIPérgicas (CGT vs C; $p = 0.767251$; Figura 1.a).

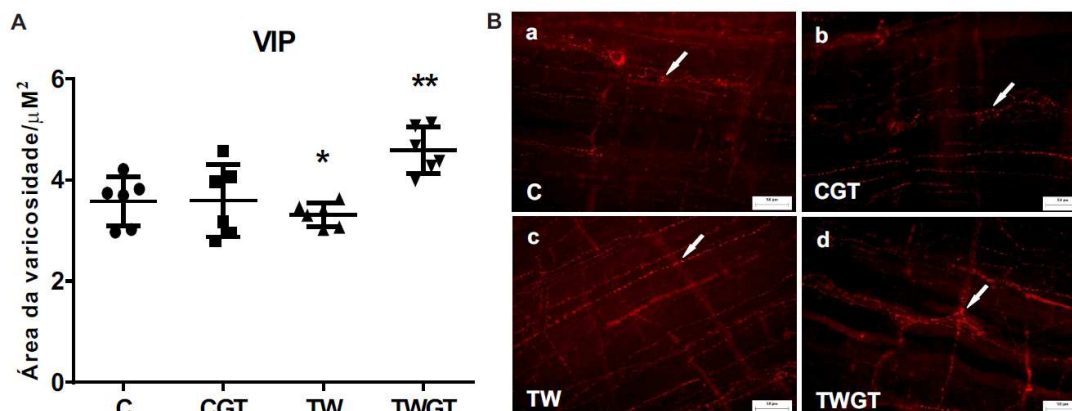


Figura 1. Análise morfométrica de varicosidades VIP-IR no plexo Mientérico do jejuno. (A) Área da varicosidade VIP-IR (μm^2); * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo C; ** $p < 0,05$ quando comparado com o grupo TW. (B) Fotomicrografias do plexo mientérico de Jejunos, setas estão evidenciando varicosidades VIP-IR. Grupos experimentais: C; CGT; TW; TWGT. $n = 6$ animais por grupo. Barra de escala com $50 \mu\text{m}$.

É sabido dizer, que no SNE na presença de doenças crônicas degenerativas, há uma maior expressão do neuropeptídeo VIP para proteger os neurônios entéricos em resposta a fatores lesivos do processo inflamatório e do estresse oxidativo (HERMES-ULIANA et al., 2014; VICENTINI et al., 2016). Especula-se que um dos mecanismos pelo qual o VIP executa seus efeitos neuroprotetores, está ligado a sua capacidade de modular resposta imunológica, pois a secreção VIP aumentada pode atenuar a resposta inflamatória (CHENG et al., 2018). Além disso, esse neuropeptídeo está envolvido em atividades antioxidantes e fatores de crescimento que auxiliam na regeneração de neurônios danificados (HERMES-ULIANA et al., 2014). No entanto, no presente estudo, curiosamente o grupo TW apresentou uma diminuição na área das varicosidades quando comparado ao grupo controle. Contudo, neste trabalho foi analisado o tamanho da área das varicosidades e não foram quantificadas as mesmas. Neste caso, possivelmente a expressão do VIP pode estar sendo representada na quantidade e não no tamanho das varicosidades. Assim sendo, há a necessidade de futuros estudos para analisar a densidade dessas varicosidades para apresentar se houve ou não uma menor expressão VIPérgica no grupo TW. Haja vista, que em outro estudo com o mesmo modelo experimental, houve um aumento na área das varicosidades VIP-IR no plexo mientérico do segmento jejunal (VICENTINI et al., 2016). Além disso, há estudos com alterações VIPérgicas que resultaram em diminuição ou aumento da expressão desse neuropeptídeo relacionado a doenças inflamatórias intestinais. Tais achados podem estar relacionados à atividade clínica da doença, que não reflete necessariamente na presença ou ausência de lesões significativas (SOUFFLET et al., 2018).

Por outro lado, a morfometria das varicosidades VIP-IR no grupo TWGT apresentou um aumento significativo no presente estudo, podendo ser resultado de uma maior expressão desse neuropeptídeo, a fim de, preservar a integridade dos neurônios entéricos com sua atividade neuroprotetora na presença de possíveis alterações fisiológicas decorrentes do tumor de Walker-256 (VICENTINI et al., 2016).

Conclusões

Em suma, o tratamento com L-Glutationa 1% apresentou efeito neurotrófico através do aumento da expressão VIPérgica no plexo mientérico de ratos portadores de tumor de Walker-256. Em relação a grupo controle tratado com L-glutathione a 1%, não houve variação significativa na área da varicosidade VIPérgica no presente estudo. Porém será necessária uma análise quantitativa para confirmar tais resultados.

Agradecimentos

Ao programa FA/PIBIC UEM

Referências

CHENG, X. SVENSSON M.; YANG Y.; EKBLAD E.; VOSS U. Focal, but not global, cerebral ischaemia causes loss of myenteric neurons and upregulation of vasoactive intestinal peptide in mouse ileum. **International journal of experimental pathology**, Sölvegatan v. 99, n. 1, p. 38-45, 2018.

HERMES-ULIANA, C.; PANIZZON C. P. N.; TREVISAN A. R.; SEHABER C C.; RAMALHO F. V.; MARTINS H. A.; ZANONI J. N. L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy?. **Digestive diseases and sciences**, Nova Iorque v. 59, n. 5, p. 937-948, 2014.

SOUFFLET, F.; BIRAUD M.; DERKINDEREN M.; LAURDEX B.; TRANG C.; CORON C.; VARANNES S. B.; BOUREILLE A.; NEUNLIST N. Modulation of VIPergic phenotype of enteric neurons by colonic biopsy supernatants from patients with inflammatory bowel diseases: Involvement of IL-6 in Crohn's disease. **Neurogastroenterology & Motility**, Nantes v. 30, n. 2, p. e13198, 2018.

VICENTINI, G. E. FRACARO L.; DE SOUZA S. R.; MARTINS H. A.; GUARNIER F. A.; ZANONI J. N. Experimental cancer cachexia changes neuron numbers and peptide levels in the intestine: Partial protective effects after dietary supplementation with L-glutamine. **PLOS one**, Califórnia v. 11, n. 9, p. e0162998, 2016.