

AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCINAS NO CÓLON DE RATOS WISTAR, POR MEIO DA MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA

Felipe Alexandre Alves Uechi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Raíssa Bocchi Pedroso, Priscilla de Laet Sant'Ana, Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Tania Cristino Alexandrino Becker (Orientadora), e-mail: tcabecker@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento:

40600009 – Saúde Coletiva

40603008 – Medicina Preventiva

Palavras-chave: Sialomucinas ácidas, DMBA e *Annona muricata*, processamento de imagem assistida por computador.

Resumo:

Anormalidades na produção de mucinas estão relacionadas com neoplasias colorretais. A indução experimental da carcinogênese colorretal em modelos animais pode ser realizada com o composto 7, 12 dimetilbezantraceno (DMBA). As criptas aberrantes (CA) e os Focos de Criptas aberrantes (FCA) são considerados lesões pré-neoplásicas, e apresentam alterações na secreção de mucinas. O extrato de folhas de *A. muricata* possui efeito antiproliferativo e antineoplásico em células de câncer de cólon. Objetivamos quantificar os níveis teciduais de mucinas ácidas no cólon e correlacionar a presença FCA e a produção de mucina nos grupos tratados com *A. muricata*. Observamos aumento no número de CA e FCA nos grupos tratados com o extrato, em ambas as concentrações, em relação ao grupo G2 e evidenciamos a presença de FCA hiperplásico e displásico, infiltrados inflamatórios e necrose. Também observamos diferença estatística entre a região proximal e distal em todos os grupos de tratamento, exceto em G1 quanto à produção de mucinas. Além disto, na região distal, há diferença estatística entre os grupos G3/G4 e G4/G1. Desta maneira, a presença de FCA e a quantificação de mucinas podem ser consideradas marcadores morfológicos precoces de tumores na colorretais, porém, devido à toxicidade do extrato, não foi possível avaliar o potencial quimiopreventivo das folhas da *A. muricata*.

Introdução

O câncer colorretal é um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental e sua incidência vem aumentando em países em desenvolvimento (Haggard & Boushey, 2009). Na mucosa do intestino grosso, as criptas são constituídas por vários tipos de células, dentre elas as caliciformes, distribuídas entre os enterócitos e são produtoras de muco, sendo seu principal componente, as mucinas, classificadas como neutras e ácidas. O corante Alcian-blue é utilizado para identificar as mucinas ácidas, especialmente as sialomucinas. Anormalidades na secreção, composição e

padrão de distribuição das mucinas no epitélio intestinal vêm sendo demonstradas em diversas afecções que acometem o cólon, dentre elas, o câncer colorretal (CCR) (Ullman & Itzkowitz, 2011). O 7, 12 – dimetilbezantraceno (DMBA) é um hidrocarboneto aromático policíclico utilizado como carcinógeno químico para o estabelecimento de modelos de estudo para indução de neoplasias. Após ser biotransformado no fígado, é absorvido no trato intestinal, podendo alterar a diferenciação celular das criptas intestinais, levando à formação de focos de criptas aberrantes (FCA) (Macejová & Brtko, 2001). Estudos relatam que o extrato de folhas de *Annona muricata*, é capaz de induzir a apoptose em células de câncer de cólon por ser rico em acetogeninas anonáceas, por apresentarem propriedades antineoplásicas. Este efeito antiproliferativo está associado à parada do ciclo celular na fase G1. Além disso, a migração e invasão de células cancerígenas do cólon são significativamente inibidas pelo extrato (Abdullah *et al.*, 2017). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi quantificar, por morfometria computadorizada, níveis teciduais de mucinas ácidas, a fim de avaliar a possível atividade quimiopreventiva do extrato das folhas de *Annona muricata* e estabelecer uma possível correlação entre as alterações da produção de mucina e a presença de lesões pré-neoplásicas (displasias).

Materiais e métodos

Amostra: utilizamos amostras de intestinos de ratos Wistar, disponíveis em nossos laboratórios, obtidos de projetos anteriores para indução de câncer de mama com DMBA. As amostras pertenciam a 07 grupos experimentais: G1= induzido apenas com DMBA; G2= tratado com 200 mg/kg do extrato e depois induzido com DMBA; G3= induzido com DMBA e depois tratado com 200 mg/kg do extrato; G4= tratado com 500 mg/kg do extrato e depois induzido com DMBA; G5= induzido com DMBA e depois tratado com 50 mg/kg do extrato; G6= tratados apenas com 200mg/kg do extrato; G7= indução com DMBA e posterior tratamento com a ciclofosfamida.

Processamento Histológico: As amostras foram analisadas com o corante azul de metileno, para identificação das CA e dos FCA. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo semi-automático em fragmentos de 4- 5 μm de espessura, os quais aderidos às lâminas foram corados com hematoxilina e eosina para classificação das CA em hiperplásicas ou displásicas e, com o azul de Alcian (AB) para quantificação das mucinas ácidas.

Análise histológica: Realizamos a captura de 10 imagens selecionadas ao longo do corte histológico, por meio de uma câmera acoplada a um microscópio óptico (Opticam microscopy technology – Lopt 14003). As imagens foram analisadas com auxílio do software Image-Pro Plus. Por meio de histogramas coloridos no sistema software RGB se determinou a intensidade da cor em número de pixels em cada campo selecionado e os dados finais foram transformados e expressos em porcentagem por campos analisados. O valor final obtido para cada campo medido nos segmentos foi a média dos valores encontrados.

Análise Estatística - foi realizada tomando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) sendo que os dados foram expressos como o valor médio com o respectivo erro, usando o software de análise estatística BIOSTAT 5.3 - ANOVA 1 critério seguido de teste TUKEY.

Resultados e Discussão

As análises histopatológicas realizadas com a coloração de HE indicaram a presença marcada de reorganização das criptas intestinais em todos os grupos experimentais. Nos grupos G2 e G3 foram observados aumento significativo de criptas hipertrofiadas e displásicas, semelhante ao grupo controle G1, com aumento de enterócitos com citoplasma e núcleos alongados e, marcada redução de células caliciformes em toda extensão da cripta. Por outro lado, nos grupos G4 e G5, com dose menor de extrato (50mg), foram observados uma redução de criptas hiperplásicas e displásicas. Nestes grupos, houve presença marcante de infiltrados inflamatórios e pontos de necrose na mucosa. Os FCAs displásicos são compostos principalmente de células absortivas que exibem uma aumentada atividade proliferativa. O número de células caliciformes geralmente está diminuído e apresenta depleção na produção de mucina (Ullman & Itzkowitz, 2011). Os resultados demonstraram que o tratamento com o extrato da *A. muricata*, com o objetivo quimioprotetor, não foi alcançado, visto que não observamos redução no número de CA e de FCA, bem como evidenciamos a presença de criptas hiperplásicas e displásicas, infiltrados inflamatórios e pontos necróticos, semelhante ao grupo controle G1, em ambos os esquemas de tratamento (antes e após indução com o carcinógeno) e regiões do cólon (proximal e distal). Sugere-se que estes eventos estejam relacionados à toxicidade do extrato em relação à mucosa intestinal, induzindo a ocorrência de processo inflamatório. Com relação à quantificação da produção de mucinas, observamos diferença estatística entre a região proximal e distal em todos os grupos de tratamento, exceto em G1. Porém, quando comparamos a produção de mucinas entre os grupos, observamos que na região proximal não houve diferença estatística entre todos os grupos de tratamento com extrato em relação ao controle positivo. Além disto, na região distal, quando comparamos os grupos entre si para a produção de mucinas, observamos diferença estatística entre os grupos G3/G4 e G4/G1 (Figura 1). Estes dados mostraram que a produção de mucina foi alterada independente do esquema de tratamento adotado e que a região distal foi a mais afetada. Nossos resultados corroboram com as observações de Ullman & Itzkowitz (2011), onde também encontramos uma maior suscetibilidade da mucosa colônica distal ao DMBA e ao extrato em ambas as concentrações utilizadas, induzindo na mucosa distal níveis inflamatórios elevados. A depleção de mucina foi uma característica comum em áreas de displasia, concluindo que as alterações observadas no padrão de mucinas pode ser um indicativo das etapas de um estado hiperproliferativo, caracterizando a progressão tumoral.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a quantificação de mucinas pode ser considerada um parâmetro morfológico útil na via de detecção precoce de tumores na carcinogênese colônica.

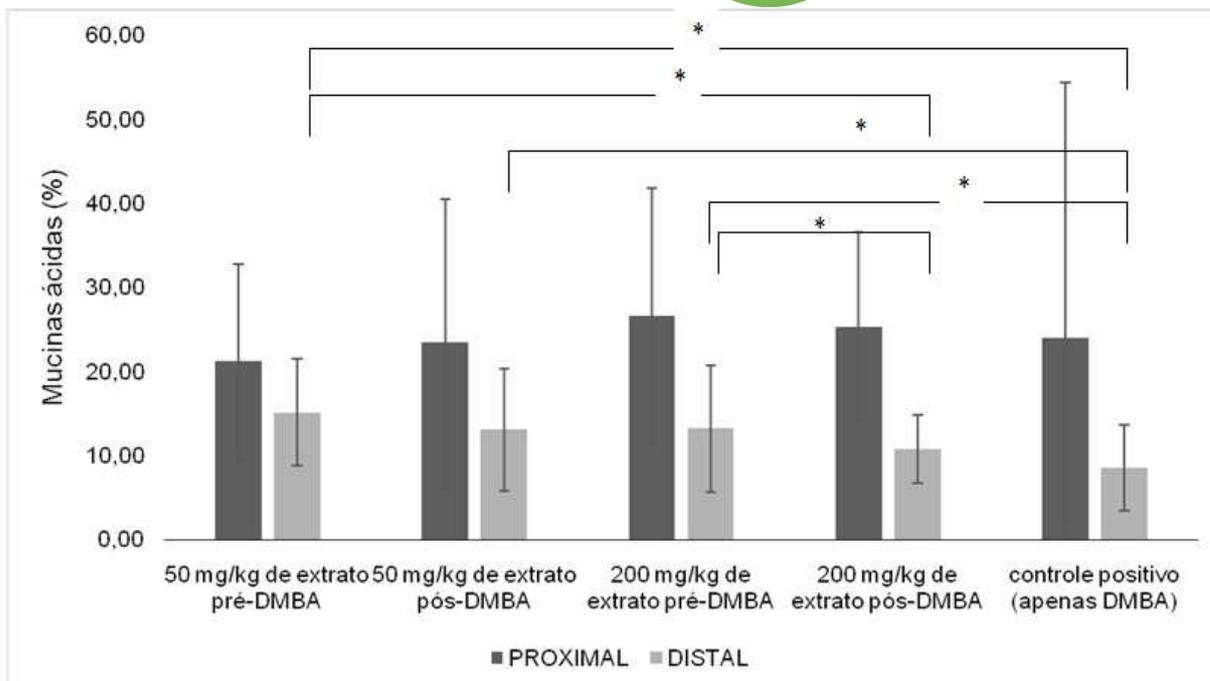


Figura 1. Valores da quantificação de mucina ácidas nos grupos experimentais dos animais induzido com DMBA. DMBA – 7, 12 – dimetilbenzantraceno. * = nível de significância de 5% ($p < 0,05$) Biostat versão 5.3.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio, à orientadora e professora Tania Cristina Alexandrino Becker pela compreensão, competência e ensinamentos e a Fundação Araucária pela bolsa e incentivo à pesquisa científica.

Referências

- ABDULLAH M, SYAM AF, MEILANY S, LAKSONO B, PRABU OG, BEKTI HS, INDRAWATI L, MAKMUN D. The value of caspase-3 after the application of Annona muricata leaf extract in colo-205 colorectal cancer cell line. **Gastroenterology Research and Practice**. p.1-5, 2017.
- DIAS, M.F.; SOUSA, E.; CABRITA, S.; PATRÍCIO, J.; OLIVEIRA, C.F. Chemoprevention of DMBA-Induced Mammary Tumors in Rats by a Combined Regimen of Alpha-Tocopherol, Selenium, and Ascorbic Acid. **Breast J.** 6(1):14-19, 2000.
- HAGGAR, FATIMA A.; BOUSHEY, ROBIN P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics in colon and rectal surgery**, v. 22, n. 04, p. 191-197, 2009.
- MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Chemically induced carcinogenesis: A comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). **Endocrine Regulations**. 35:53-59, 2001.
- ULLMAN TA, ITZKOWITZ SH. Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**. 140:1807–1816. 2011.