

## **AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR PARA ESTUDO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) E TUMORES INTESTINAIS ADENOMATOSOS INDUZIDOS COM 7, 12 DIMETILBEZANTRACENO (DMBA), POR MEIO DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.**

Brenda Barroso Pelegrini (PIC/Uem), Priscilla de Laet Sant'Ana, Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Tânia Cristina Alexandrino Becker (Orientador), e-mail: tcabecker@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

### **Área e subárea do conhecimento:**

**40600009 – Saúde Coletiva**

**40603008 – Medicina Preventiva**

**Palavras-chave:** Focos de Criptas Aberrantes, DMBA, Extrato de folhas de *A. muricata*

### **Resumo:**

FCA é um evento precoce da carcinogênese colorretal. Utilizamos o modelo experimental de indução da carcionogênese com o 7, 12 dimetilbezantraceno (DMBA) com o objetivo de investigar a presença de FCA no cólon, por meio da coloração de HE e azul de metileno e, avaliar a atividade quimiopreventiva do extrato de folhas de *A. muricata*. A superfície da mucosa intestinal demonstrou a presença de CA e FCA no cólon proximal e distal, exceto nos controles G6 e G7, pois a mucosa estava destruída. Observamos aumento no número de CA e FCA nos grupos tratados com o extrato, em ambas as concentrações, em relação ao grupo G2 e, na análise histológica, evidenciamos a presença de FCA hiperplásicos e displásicos, infiltrados inflamatórios e necrose. Concluímos que a indução com DMBA permitiu monitorar o desenvolvimento de FCA, porém, devido à toxicidade do extrato, não foi possível avaliar o potencial quimiopreventivo de folhas de *A. muricata* no CCR.

### **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 (Haggar; Boushey, 2009). Segundo Bird (1987) as criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA) são supostas lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores tratados com carcinógeno, que constituem um grupo heterogêneo de lesões que vão desde modificações hiperplásicas até modificações displásicas. Algumas substâncias são utilizadas como carcinógenos químicos em modelos experimentais com animais, como o 7, 12 – dimetilbezantraceno (DMBA), um hidrocarboneto aromático policíclico, proveniente da combustão incompleta de materiais orgânicos (Macejová, & Brtko, 2001).

A investigação fitoquímica das folhas de *A. muricata* demonstrou a presença de acetogeninas (Chang *et al.*, 2003) que demonstraram ser seletivamente tóxicas contra vários tipos de células cancerosas sem prejudicar células saudáveis. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi utilizar um modelo experimental de indução de lesões pré-neoplásicas na região colorretal a fim de avaliar a possível atividade quimiopreventiva do extrato de *A. muricata* bem como a obtenção de informações sobre a patogenia do desenvolvimento de tumores na região colorretal.

## 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 armazenados em etanol 70% foram corados com de azul de metileno 1,0% dissolvido em PBS (DIAS *et al.*, 2010) e analisadas para identificação das CA e dos FCA. O número de criptas aberrantes e FCA foi determinado por microscopia óptica com aumento de 40x. 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 HE para classificação das CA em hiperplásicas ou displásicas.

## Resultados e Discussão

As CAs foram morfológicamente diferenciadas das criptas normais do cólon adjacente e as categorias histológicas incluíram CA isolada e FCA com 02 a 03, 04 a 09 ou mais de 10 CA/foco (tabela 01) (Fig 1). Apenas os grupos controles (G6=sem DMBA+200mg de extrato e G7=DMBA+ciclosfosfamida), não apresentaram CA e FCA em decorrência de a mucosa apresentar-se totalmente destruída, impossibilitando a leitura pela coloração com azul de metileno (Fig. 2A). O número de CA isoladas na região distal nos grupos G2 e G3 foram superiores à região proximal, mostrando um pequeno aumento no grupo G3 em relação ao G2. Porém, em relação ao grupo controle (G1), os resultados foram similares, não demonstrando um efeito protetor do extrato na concentração de 200mg, em ambos os esquemas de tratamento (pré/pós indução com DMBA). Por outro lado, quando observamos os FCA com 02-03 e 04-09 criptas/foco verificamos um aumento progressivo em relação ao grupo controle, onde os grupos tratados com o extrato na concentração de 200mg, demonstraram um aumento no número de FCA tanto na região distal quanto na proximal em relação ao grupo G1 (Tabela 01). Em relação aos grupos G4 e G5, observamos uma redução significativa no número de CA na região proximal e distal em relação ao grupo G1. Porém, a presença de FCA em ambas as porções do

cólon (proximal e distal) foi semelhante aos grupos G2 e G3, fato que, de maneira semelhante a dose de 200mg, não apresentou efeito protetivo ou regenerativo do extrato nesta concentração (50mg – pré e pós DMBA). Todas as amostras de cólon foram processadas e coradas com a coloração de HE. As análises histopatológicas 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 (Fig. 2B,C), 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, os grupos G04 e G05, com dose menor de extrato, foram observados uma redução de criptas hiperplásicas e displásicas. Nestes grupos, houve presença marcante de infiltrados inflamatórios (Fig. 2C), e pontos de necrose na mucosa. Em todos os animais expostos ao DMBA, não foram observados tumores, evento provavelmente relacionado à duração insuficiente do experimento para o desenvolvimento de lesões mais avançadas.

**Tabela 1.** Número de criptas aberrantes (CA) e focos de criptas aberrantes (FCA), nas regiões proximal e distal do cólon, nos grupos experimentais de indução com 7, 12 – dimetilbezantraceno e tratamento com doses de 50 e 200mg do extrato de *Annonamuricata*, antes e após a indução com DMBA.

Grupos (G)	CA		FCA					
	P	D	P			D		
			02-03	04-09	≥10	02-03	04-09	≥10
G1	11	12	-	-	-	05	06	-
G2	08	11	12	07	-	15	14	02
G3	09	14	07	08	-	06	07	-
G4	01	-	04	01	-	04	03	01
G5	03	-	06	02	-	06	10	-

DMBA - 7, 12 – dimetilbezantraceno. G = grupo experimental; P = cólon proximal; D = cólon distal

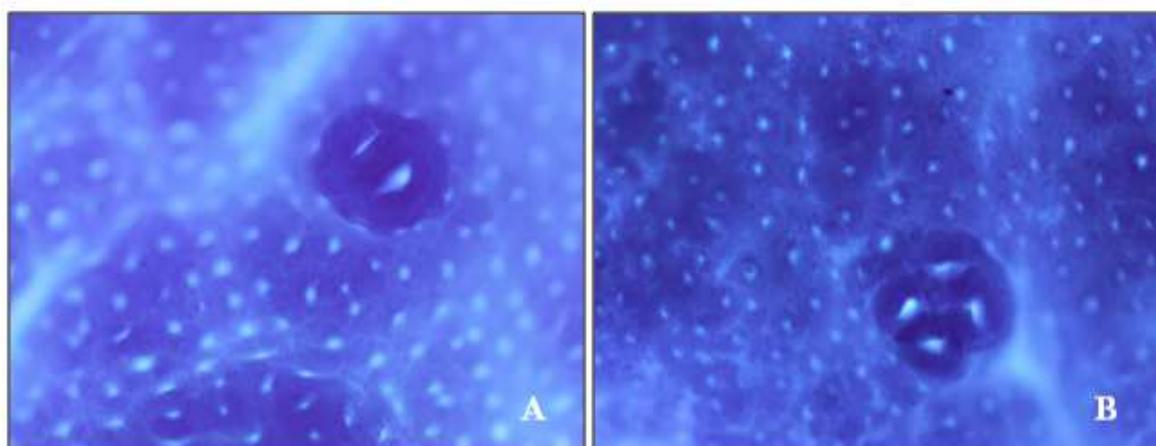


Fig.1. Mucosa colônica com azul de metileno representando uma vista topográfica de um FCA com 02 CA (A) e 04 CA (B). Criptas aberrantes com abertura luminal irregular e revestimento epitelial mais espesso em relação às criptas adjacentes normais (microscopia de luz – objetiva 10x).

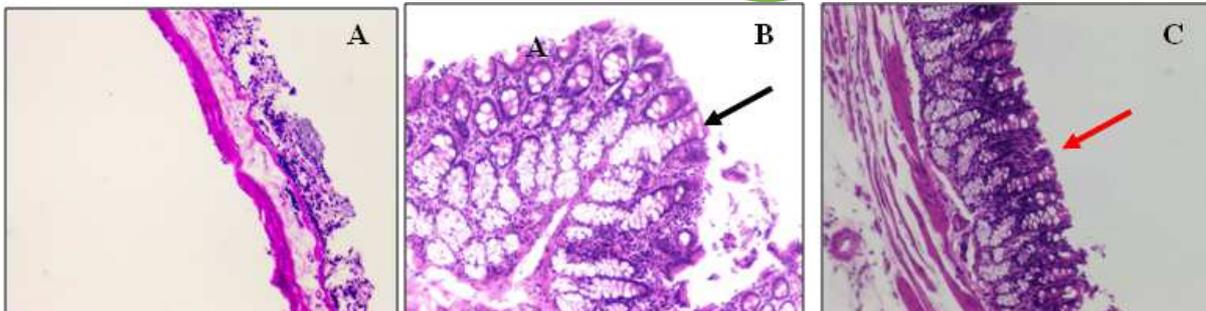


Fig.2. A. Morfologia da mucosa colônica mostrando a ausência de vilosidade e células epiteliais, infiltrados inflamatórios, caracterizando a necrose. A camada muscular estava preservada. B. O FCA hiperplásico é composto por criptas alongadas com epitélio ligeiramente elevado e núcleos na base da célula. C. O FCA displásico é composto por células epiteliais estratificadas, núcleos hipercromáticos, com perda de polaridade celular e secreção de mucina (seta vermelha) (microscopia de luz – objetiva 10x).

## Conclusões

Estudos utilizando o modelo de indução com DMBA permitiram monitorar o desenvolvimento de CA e FCA, nas condições experimentais estabelecidas, produzindo informações importantes sobre lesões pré-neoplásicas no cólon. Porém, em nosso experimento, o DMBA mostrou não ser um bom indutor carcinogênico para o cólon, quando comparado a outros carcinógenos. De acordo com os resultados deste trabalho, é necessário a realização de estudos de toxicidade do extrato de *Annona muricata*, a fim de que as propriedades antioxidantes possam ser avaliadas na mucosa colônica.

## Referências

- 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.
- CHANG FR, LIAW CC, LIN CY, CHOU CJ, CHIU HF, WU YC: New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Med.** 2003, 69:241–246.
- HAGGAR, F.A.; BOUSHEY, R.P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinics in colon rectal surgery**, NY, v. 22, p.191-197, 2009.
- MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Chemically induced carcinogenesis: A comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethyl benzantracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). **Endocrine Regulations** 35:53-59, 2001
- DIAS, M.C. et al. Effects of lycopene, symbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 48, p. 772-780, 2010.