

## **AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR PARA ESTUDO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) E TUMORES INTESTINAIS ADENOMATOSOS INDUZIDOS COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA (DMH), E TRATADOS COM QUERCETINA**

César Agostinho Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lucas Casagrande, Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Paola da Costa Souza Jorge Silva, Tânia Cristina Alexandrino Becker (Orientador),  
e-mail: tcabecker@uem.br

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

**Área do CNPq: 40600009 – Saúde Coletiva**

**Subárea do CNPq: 40603008 – Medicina Preventiva**

**Palavras-chave:** Lesões pré-neoplásicas, 1,2-Dimetilhidrazina (DMH), Quercetina

### **Resumo:**

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer com maior incidência no mundo. As criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA) são consideradas lesões pré-neoplásicas. A quercetina é um antioxidante utilizado para minimizar danos em nível celular gerados por Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). O objetivo desse estudo foi caracterizar o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na mucosa colônica, por meio de métodos histopatológicos (colorações de azul de metileno (AZ) e HE), e analisar o tratamento com quercetina microencapsulada. Foram induzidos 24 ratos com 1,2 – dimetilhidrazina (DMH), distribuído em 3 grupos experimentais (GI – grupo controle; GII – grupo induzido com DMH; GIII – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina). Os resultados com AZ mostraram que, no grupo GI não houve desenvolvimento de CA e FCA em nenhuma amostra tecidual. No GII e GIII, valores elevados na região proximal e distal de CA e FCA, foram observados em todos os animais. Na avaliação histopatológica com HE, observamos criptas hiperplásicas em ambas as regiões (proximal e distal) nos três grupos experimentais. Lesões displásicas foram observadas em todas as amostras de tecido dos GII e III. Estatisticamente não observamos efeito significativo da quercetina no controle da proliferação de CA por FCA, em ambas as regiões analisadas, não mostrando efeito quimioprotetor na dose utilizada. Além disto, no GIII observamos uma formação polipoide caracterizando uma displasia grave. Em contrapartida, a avaliação dos FCA, por serem regiões com elevada atividade proliferativa, confirmaram-se como ótimos biomarcadores para bioensaios de compostos com provável atividade antineoplásica.

### **Introdução**

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer com maior incidência e o quarto com os mais elevados índices de mortalidade no mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que em 2020 ocorram cerca de 41 mil novos casos de CCR, sendo 21 mil em homens e 20 mil em mulheres. Além disto, em 2018 a mortalidade masculina foi de 8,2% dos portadores, e em mulheres, a taxa foi de

9,3%. Bird (1987) descreveu o processo de carcinogênese colorretal em modelos animais induzidos com carcinógenos químicos. Os Focos de Criptas Aberrantes (FCA) sugerem ser as primeiras lesões intestinais no processo neoplásico, com formações hiperplásicas a displásicas. O 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é utilizado em modelos experimentais com animais, como droga indutora indireta, que promove hipermetilação do DNA as células epiteliais colorretais. A quercetina apresenta um grande potencial antioxidante, tendo suas propriedades atribuídas a diferentes mecanismos, dentre eles, neutralizar espécies reativas de oxigênio, permitindo o equilíbrio redox fisiológico, minimizando danos oxidativos ao DNA e inibição da proliferação celular (Araújo *et al.*, 2016). Neste sentido, esse trabalho objetivou avaliar histopatologicamente o cólon de ratos Wistar, induzidos com 1,2-dimetilhidrazina e tratados com quercetina, na avaliação dos FCA e tumores adenomatosos.

## Materiais e métodos

A amostra era composta de 24 ratos adultos machos, da linhagem Wistar, durante um período experimental de 112 dias, distribuídos em 3 grupos experimentais (GI – grupo controle; GII – grupo induzido com DMH; GIII – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina). Os animais do grupo GI receberam apenas diluente do DMH (PBS). Os animais dos grupos GII e GIII foram inoculados via intraperitoneal com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 40mg/Kg duas vezes por semana, durante as 2 semanas iniciais. A quercetina microencapsulada foi administrada somente no grupo GIII na dosagem de 10mg/Kg por gavagem em cada animal diariamente durante todo o tratamento experimental. Os animais sofreram eutanásia e foi coletado o cólon de todos os animais.

Os cólons foram medidos e incluídos em solução fixadora de formalina tamponada a 10% por 12hs e armazenadas em etanol 70° até o processamento histológico. A superfície mucosa foi corada com azul de metileno 1,0% dissolvido em PBS e analisada ao microscópio de luz, com aumento de 40x, para quantificação das CA e dos FCA. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a banhos com graduação alcoólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo semi-automático em fragmentos de 4- 5 µm de espessura, aderidos às lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para classificação das CA em hiperplásicas ou displásicas.

Os experimentos com os animais foram descritos em média  $\pm$  desvio padrão do n de animais por grupo. Os dados obtidos do experimento foram analisados no programa estatístico RStudio versão 1.3.959 por teste de normalidade Shapiro-Wilk, Teste-t de Welch para duas amostras independentes e variância ANOVA de uma via (One Way), seguida de Teste de Tukey para comparação das médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados e Discussão

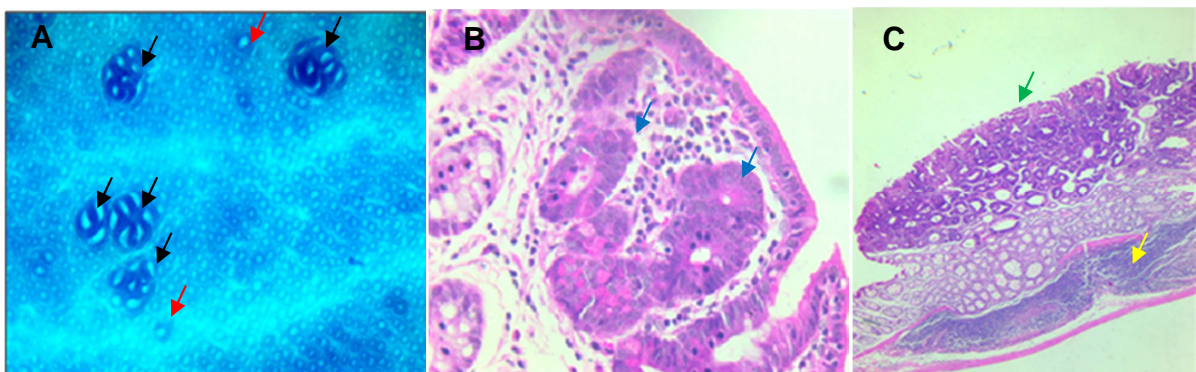
As análises histológicas realizadas por meio da coloração com azul de metileno estão expressas na Tabela 01, pela média  $\pm$  desvio padrão. Nos grupos GII e GIII, valores elevados na região proximal e distal de CA e FCA foram observados em todos os animais (Figura 1). A quantidade de CA na região proximal do grupo GIII foi bastante elevada, porém não apresentou diferença significativa em relação ao grupo

II. Além disto, não foram encontrados FCA  $\geq 10$  CA na região proximal em quantidade significativa nesses grupos. Em contrapartida, FCA de 4-9 criptas se mostraram altamente prevalentes em toda a porção distal do cólon, além da observação de focos com mais de 15 criptas nessa região. Os FCA com número elevado de criptas/foco, como observados nesse estudo, são supostamente uma das primeiras manifestações teciduais a ocorrer no desenvolvimento do CCR sugerindo que os FCA estão no caminho que leva ao CCR, sendo um importante biomarcador pré-tumoral (Wargovich *et al.*, 2010).

Na avaliação histopatológica pela coloração de HE, foram observadas criptas hiperplásicas em ambas as regiões (proximal e distal) nos três grupos experimentais, sendo considerado o padrão de normalidade. Lesões displásicas foram observadas em todas as amostras de tecido dos grupos II e III. Além disso, foram observadas placas de Peyer em cortes de intestinos distais, em alguns casos proliferativos, difusos e invasores, juntamente com infiltrados linfocitários e congestão. Em uma amostra do GIII foi observado uma formação polipoide adenomatosa mostrando áreas com displasia grave, com desarranjo arquitetônico e morfologia nuclear atípica (Figura 1). O consumo da quercetina se dá em razão de que estudos apontam efeitos contra o câncer devido suas propriedades quimioprotetoras (Russo *et al.*, 2017). No presente estudo, entretanto, não foram observadas mudanças significativas que poderiam indicar um efeito quimioprotetor, nas doses utilizadas, em relação ao câncer colorretal.

**Tabela 1.** Quantificação das Criptas aberrantes (CA) e Focos de Criptas Aberrantes (FCA), nas regiões proximal e distal do cólon, nos grupos experimentais de indução com DMH (1,2 dimetilhidrazina) e tratamento com quercetina.

Grupos	CA		FCA					
	Proximal	Distal	Proximal			Distal		
			2-3	4-9	$\geq 10$	2-3	4-9	$\geq 10$
I	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00	00 $\pm$ 00
II	31,625 $\pm$ 18,73	13,625 $\pm$ 14,34	49,125 $\pm$ 40,08	19,125 $\pm$ 18,3	0,125 $\pm$ 0,35	42,375 $\pm$ 21,2	62,75 $\pm$ 30,1	8,25 $\pm$ 9,0
III	20,00 $\pm$ 14,1	16,00 $\pm$ 9,8	32,875 $\pm$ 28,1	13,875 $\pm$ 15,2	00 $\pm$ 00	45,375 $\pm$ 16,1	70,5 $\pm$ 20,5	8,375 $\pm$ 5,8



**Figura 1.** A: Mucosa colônica em vista topográfica de FCA (setas pretas) e CA isolada (seta vermelha). Os FCA apresentam abertura luminal irregular e mais espessa em relação às criptas adjacentes normais, aumento de 40x. B: CA displásicas (seta azul), células com basofilia citoplasmática acentuada e elevada relação núcleo/citoplasma com perda de polaridade celular em vários graus, estratificação nuclear e redução na produção de mucinas, aumento de 200x. C: Formação polipoide (seta verde) e Placas de Peyer hiperproliferativa, difusa e invasora (seta amarela), aumento de 40x.

## Conclusões

Não foram observadas alterações significativas que poderiam indicar um efeito quimioprotetor da quercetina, nas doses utilizadas, em relação ao câncer colorretal, quando consideramos sua capacidade de controlar a multiplicidade de criptas/foco, reduzindo a formação de FCA displásicos na mucosa colônica submetida a indução por carcinógenos. Porém, a avaliação dos FCA, por serem regiões com elevada atividade proliferativa, constituem-se como ótimos biomarcadores em bioensaios para avaliação quimiopreventiva de compostos com provável atividade antineoplásica, a fim de controlar a multiplicidade de criptas/foco, exercendo assim ação quimioprotetora.

## Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, à minha orientadora Tania Cristina Alexandrino Becker e à Maristela Gabriel, técnica do laboratório de Patologia da UEM, pelo apoio em todos os momentos durante a pesquisa.

## Referências

- ARAÚJO, L. R. L.; VIANA, F. C. V.; CASIMIRO, V. C.; NOGUEIRA, T. B. S. S.; SOUSA, M. N. A. Antioxidantes na Prevenção do Câncer em Idosos. *Journal of Medicine and Health Promotion*, v. 1, p. 18–26, 2016.
- BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Letters*, v. 37, p. 147–151, 1987.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DASILVA (INCA). Estimativa2020 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- RUSSO, M.; MILITO, A.; SPAGNUOLO, C.; CARBONE, V.; ROSÉN, A.; MINASI, P.; LAURIA, F.; RUSSO, G. L. CK2 and PI3K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget*, v. 8, p. 42571–42587, 2017.
- WARGOVICH, M. J.; BROWN, V. R.; MORRIS, J. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. *Cancers*, v. 2, p. 1705–1716, 2010.