

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR, POR MEIO DA MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA, PARA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCINAS

Murilo Arthur Gauer (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Raissa Bocchi Pedroso, 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: Focos de Criptas Aberrantes, Sialomucinas, Processamento de imagem assistida por computador.

Resumo:

O desenvolvimento de tumores na região colorretal é marcado por diferentes estágios. As criptas aberrantes (CA) e focos de criptas aberrantes (FCA) são consideradas lesões pré-neoplásicas, variando de hiperplasia a diferentes graus de displasia no cólon. Estas lesões geralmente apresentam alterações na produção de mucinas, permitindo um maior entendimento do processo de carcinogênese do cólon. Neste estudo, objetivamos quantificar os níveis teciduais de mucinas ácidas no cólon e correlacionar as alterações histopatológicas nos FCA e a produção de mucina nos grupos tratados com óleo essencial (OE) de *Zingiber officinale* na região colorretal de ratos Wistar. O material biológico utilizado foi proveniente de um experimento realizado anteriormente em nosso laboratório, com os seguintes grupos experimentais: GI (controle negativo); GII (controle de indução positivo); GIII (DMH + óleo essencial); GIV (DMH + 5-Fluorouracil) e GV (óleo essencial). As técnicas histológicas utilizadas foram hematoxilina-eosina (HE) e Alcian Blue (AB). A quantificação das mucinas coradas com AB foi realizada pelo Cálculo da Porcentagem total de pixels (px), como segue: $((\text{Média de px selecionados})/(\text{Área total da imagem em px})) \times 100\%$ onde observamos diferença estatística em ambas regiões, entre os GIII e GIV. Na coloração de HE, observamos FCA hiperplásico e displásico apenas nos grupos GII, GIII e GIV, em ambas as porções do cólon analisadas (proximal e distal). Desta maneira, a avaliação de FCA e a quantificação de mucinas podem ser consideradas marcadores morfológicos precoces de tumores na região colorretal.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que se desenvolve no intestino grosso e, segundo o INCA (2018), está entre os mais importantes problemas de saúde global, sendo um dos tumores mais frequentes em homens e mulheres. Na mucosa do intestino grosso, as células caliciformes produtoras de mucina aumentam progressivamente em número em direção

aos segmentos distais e o reto. As sialomucinas, grupo de mucinas ácidas; podem ser identificadas com padrões de expressão quando utilizado corantes, em especial o Alcian-blue. Anormalidades na distribuição no epitélio intestinal vêm sendo demonstradas em diversas afecções que acometem o cólon. Assim, é possível determinar, de forma objetiva, parâmetros histológicos para quantificar a produção de mucinas na mucosa colônica, com emprego da morfometria computadorizada (FARIA JR *et al.*, 2007). BIRD (1987) descreveu o processo de carcinogênese colorretal em modelos animais induzidos com carcinógenos químicos. Os Focos de Criptas Aberrantes (FCA) sugerem serem 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. O óleo essencial de gengibre (OEG), extraído dos rizomas do gengibre, é constituído principalmente de hidrocarbonetos, tendo suas propriedades atribuídas a diferentes mecanismos, dentre eles, neutralizar espécies reativas de oxigênio, minimizando danos oxidativos ao DNA e inibição da proliferação celular (TOGAR *et al.*, 2014). Neste sentido, esse trabalho objetivou quantificação os níveis teciduais de mucinas ácidas, por morfometria computadorizada, para avaliar a possível atividade quimiopreventiva e/ou antitumoral do OEG.

Materiais e métodos

Este projeto consiste na análise de amostras do cólon de ratos Wistar, disponíveis em nossos laboratórios, induzidos com DMH (1,2-dimetilhidrazina) e tratados com a droga comercial Fauldfluor® (LIBBS) e com o OEG (*Zingiber officinale*). Os animais foram divididos em 05 grupos experimentais, nomeados: **Grupo I - Controle negativo** = animais sem indução e sem tratamento; **Grupo II – Controle positivo indução** = animais com indução de DMH; **Grupo III – Grupo tratamento experimental** = indução com DMH + tratamento com o OEG; **Grupo IV – Grupo tratamento padrão** = indução com DMH +5-FU; **Grupo V – Controle tratamento experimental** = animais tratados somente OEG

Processamento histológico: Coloração de HE e AB:

As lâminas foram desparafinadas em banhos sucessivos de xilol, alcoolizadas em banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. A seguir, incubadas em hematoxilina de Harris e em eosina. Ou Alcian Blue (AB). Posteriormente, os cortes foram desidratados em banhos sucessivos de álcool absoluto, diafanizadas em xilol, e montadas com resina e lamínula. Foram analisados em média 20 campos/corte sob ampliação de 200 vezes e, os FCA, foram classificados histologicamente em hiperplásicos e displásicos. A expressão das mucinas ácidas foi quantificada com ampliação de 400x, por meio de processamento de imagens em um campo focal com pelo menos quatro criptas colônicas completas e contíguas. Realizaremos a captura das imagens ao longo de todo corte histológico, em um total de 15 fotos por corte histológico, com uma câmera acoplada a um microscópio óptico (Opticam microscopy technology – Lopt 14003) e procedemos à análise de imagem com auxílio do software Image-

Pro Plus. Por meio de histogramas coloridos no sistema software RGB determinou a intensidade da cor em número de pixels em cada campo selecionado pelo Cálculo da Porcentagem total de pixels (px), como segue: $((\text{Média de px selecionados})/(\text{Área total da imagem em px})) * 100 \%$.

Análise Estatística

Os experimentos foram descritos em média \pm desvio padrão do número de criptas e focos de criptas aberrantes por animal de cada grupo e analisados por variância *Oneway* ANOVA, seguida de Teste de *Tukey* para comparação das médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

No presente estudo, observamos nos GII, GIII e GIV uma grande quantidade de criptas hiperplásicas e displásicas tanto na porção proximal quanto na região distal. O grupo II apresentou valores significativamente maiores de FCA hiperplásicos e displásicos em relação aos grupos de tratamento padrão e experimentais (Figura 01). Estes resultados sugerem que o óleo essencial de gengibre teve eficácia no controle da expansão clonal de CA nos FCA. Existe evidência de que os FCA, especialmente os FCA displásicos representam uma mudança morfológica inicial na mucosa colorretal, dentro do processo de carcinogênese, e foi amplamente aceita como lesão precursora do câncer do cólon do ponto de vista morfológico, histológico, biológico e genético (CHENG & LAI, 2003).

Com relação à quantificação da produção de mucinas, nossos resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas na distribuição de mucinas ácidas entre as regiões proximais e distais e entre os GII e III. Por outro lado, em ambas as regiões houve diferença estatística entre os GII e IV e entre os GIII e IV (Tabela 01). A redução na secreção de mucinas está associada a áreas com displasia, indicando que as alterações observadas no padrão de mucinas pode ser um indicativo de um estado hiperproliferativo relacionado à progressão tumoral (MA *et al.*, 2002).

Tabela 01. Quantificação da produção de mucinas ácidas, coradas com Alcian Blue, nas regiões proximais e distais do cólon, nos grupos controles, experimentais induzidos com 1,2 – dimetilhidrazina (DMH) e com tratamento com óleo essencial de gengibre.

	Proximal (%)	Distal (%)
Grupo I	2.903 \pm 1.61	3.382 \pm 3.210
Grupo II^a	3.068 \pm 2.792 ^b	2.955 \pm 1.805 ^b
Grupo III	2.742 \pm 1.603 ^b	3.136 \pm 1.580 ^b
Grupo IV^b	4.450 \pm 4.509 ^a	4.241 \pm 2.274 ^a
Grupo V^c	2.397 \pm 1.185	2.512 \pm 1.382

% - porcentagem de Pixels marcados por mucinas ácidas. Resultados expressos como média das quantidades observadas nos animais do mesmo grupo \pm desvio padrão. ^{a,b,c} Significância por teste de Trukey $p < 0,05$.

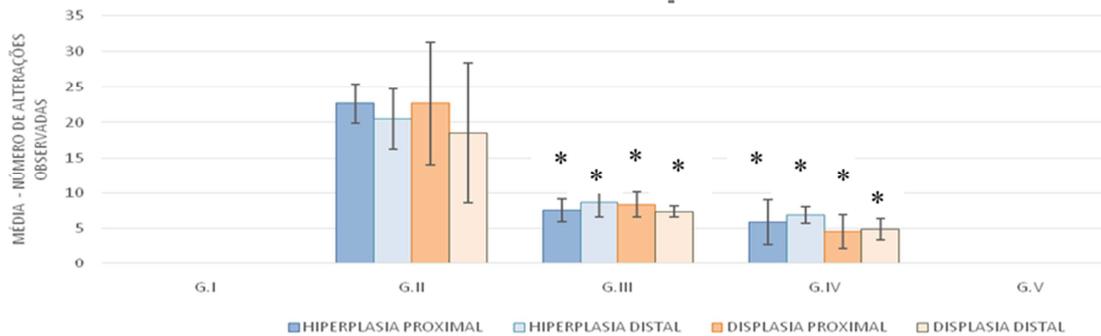


Figura 1. Quantificação de hiperplasias e displasias observadas pela técnica de HE, nas porções proximais e distais dos animais de cada grupo. A média e desvio padrão foram calculados com base no número de animais de cada grupo. Resultados expressos como média das quantidades observadas nos animais do mesmo grupo \pm desvio padrão. * Significância por teste de Turkey $p<0,05$.

Conclusões

O OEG têm bom potencial antioxidante, podendo modificar a carcinogênese do cólon em ratos, neste bioensaio de avaliação histopatológica semiquantitativo. Além disto, o OEG teve eficácia significativa inibindo a expansão clonal de células que compõe os FCA, reduzindo a formação de FCA displásicos, exercendo assim ação quimioprotetora na mucosa colônica submetida à indução por carcinógenos. Em relação à quantificação de mucinas, concluímos que este parâmetro morfológico é útil na via de detecção precoce de tumores na carcinogênese colônica.

Agradecimentos

Agradecemos a Deus, por proporcionar esta experiência e auxiliar nessa conquista. Às instituições, Universidade Estadual de Maringá, CNPq e à Fundação Araucária pela oportunidade de participar desse projeto e aporte financeiro disponibilizado.

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.
- CHENG, L.; LAI, M.D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J Gastroenterol** v. 9, p. 2642-2649, 2003.
- FARIA, J.R.; ANDREOLLO, N.A.; TREVISAN, M.A.S.; LOPES, L.R. A interrelação das sialomucinas com o adenocarcinoma no esôfago de Barret. **Rev. da Associação Médica Bras.**, v. 53(4), p. 360-364, 2007.
- MA, O.Y.; WILLIAMSON, K.E.; ROWLANDS, B.J. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. **World Journal of gastroenterology**, v. 8, p. 847-852, 2002.
- TOGAR, B.; TÜRKEZ, H.; STEFANO, A.; TATAR, A.; CETIN, D. Zingiberene attenuates hydrogen peroxide-induced toxicity in neuronal cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, p. 135–144, 2014.