AVALIAÇÃO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS AO HUC/D E 3-NT NO PLEXO SUBMUCOSO DO JEJUNO DE RATOS INDUZIDOS À CARCINOGÊNESE COLORRETAL

Maysa Pacheco Alvarez da Silva (PIBIC/CNPq), Fabiana Galvão da Motta Lima, Lucas Casagrande (Coorientador), Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (Orientadora) e-mail: maysa.alvarez@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR

Morfologia - Histologia
Palavras-chave: sistema nervoso entérico, probiótico, quercetina

Resumo:
O objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação de neurônios imunorreativos ao HuC/D (HuC/D-IR) e 3-NT (3-NT-IR) no plexo submucoso do jejuno de ratos induzidos à carcinogênese colorretal administrados com quercetina microencapsulada, probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis e a junção dos dois. Foram utilizados 25 ratos divididos em 5 grupos (N=5): controle (C), carcinogênese colorretal (CR), carcinogênese colorretal administrado com probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC (CP), carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg (CQ), e carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg e probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC (CQP). Após a eutanásia dos animais, processamento do material e realização das técnicas imunohistoquímicas para HuC/D e 3-NT, foi realizada a quantificação de neurônios HuC/D-IR e 3-NT-IR em 32 imagens por animal, realizando em seguida análise estatística. Houve redução significativa na quantidade de neurônios totais (HuC/D-IR) do grupo CR em comparação com o grupo C e aumento significativo na quantidade de neurônios HuC/D-IR no grupo CQ em comparação com o grupo CR, indicando possível ação neuroprotetora da quercetina. Apesar de observar aumento na expressão de 3-NT em doenças como diabetes mellitus, não houve significância estatística entre os grupos C e CR, assim como entre CR e as diferentes administrações testadas (CP, CQ e CQP).

Introdução

Câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum e é a quarta maior causa de mortes relacionadas ao câncer. No CCR é possível observar a influência de fatores como a desregulação na microbiota intestinal (disbiose) e aumento no estresse oxidativo, que podem facilitar o desenvolvimento do câncer. O estresse oxidativo é causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas em um metabolismo energético normal. O aumento de ERO pode ser causado por condições como estresse e inflamação resultantes de doenças metabólicas e disbiose. O estresse oxidativo pode causar danos ao DNA que geram mutações e instabilidade nos cromossomos que podem levar à formação de câncer (CARINI et al., 2017).

A quercetina é um flavonoide presente em diversos alimentos que tem sido amplamente estudado por apresentar efeitos antioxidantes, removendo ERO. Além disso, a substância apresenta função antitumoral que, somada à sua capacidade antioxidante, torna a quercetina um agente terapêutico promissor no tratamento de CCR (DARBAND et al., 2018).

Bifidobacterium é um gênero de bactérias muito comum na microbiota humana e é frequentemente utilizado como probiótico por apresentar efeito imunomodulatório, metabólico, antiinflamatório e antioxidante. Ademais, *Bifidobacterium* atua na epigenética da formação de tumores (BOZKURT; QUIGLEY; KARA, 2019). Portanto, torna-se relevante avaliar os efeitos do probiótico *Bifidobacterium animalis* no CCR.

O sistema digestório, inclusive o intestino delgado, possui em sua parede uma complexa rede neural denominada de sistema nervoso entérico (SNE), conhecido também como “segundo cérebro”. Estudos apontam que doenças como a diabetes mellitus, artrite reumatoide e outras condições inflamatórias podem afetar o SNE (HERMES-ULIANA et al., 2018; PIOVEZANA BOSSOLANI et al., 2019). A proteína HuC/D é um marcador de população total de neurônios, enquanto a 3-nitrotirosina (3-NT) é um marcador de estresse oxidativo, por ser resultado da presença de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio produzido pela óxido nítrico sintase, sendo estes agentes de estresse oxidativo e consequente dano oxidativo (HERMES-ULIANA et al., 2018).

Este trabalho teve como objetivo realizar a quantificação da população total de neurônios (imunorreativos à proteína HuC/D) e imunorreativos a 3-NT no plexo submucoso do jejuno de ratos induzidos à carcinogênese colorretal administrados com quercetina microencapsulada, probiótico *Bifidobacterium animalis* e a junção dos dois.

Materiais e métodos

Os procedimentos com animais foram realizados com aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM (CEUA Nº 1126010419). Foram utilizados segmentos intestinais do jejuno de ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) inicialmente com 53 dias de idade, que passaram por período experimental de 112 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=5), sendo eles: controle (C), carcinogênese colorretal (CR), carcinogênese colorretal administrado com probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC (CP), carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg (CQ), e carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg e probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC (CQP). Os animais dos grupos induzidos ao CCR passaram por indução com injeção por via intraperitoneal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), 40mg/Kg duas vezes por semana por 2 semanas.

Aos 165 dias de idade, os animais foram eutanasiados, os segmentos intestinais foram coletados e fragmentos de 1cm² do jejuno passaram por microdissecção para obtenção da tela submucosa utilizada para realização das técnicas imuno-histoquímicas dos marcadores HuC/D e 3-NT.

As imagens para análise foram capturadas utilizando câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 acoplada ao microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX40 e transferidas para o computador com o programa Motic Images Plus® 2.0ML. Foi feita a quantificação de toda a população de neurônios do plexo submucoso HuC/D-IR e 3-NT-IR de 32 imagens por animal utilizando o *software* Image Pro Plus 4 ®, com resultados expressos em cm². Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software Statistica 8.0 sendo expressos como média ± erro padrão. Foi realizada a análise de delineamento em blocos, seguido de Teste de Fisher. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

Resultados e Discussão

Na figura 1A é apresentado o gráfico com o resultado da quantificação de neurônios HuC/D-IR e, na figura 1B, o gráfico com resultados de proporção de neurônios 3-NT-IR para neurônios HuC/D-IR.

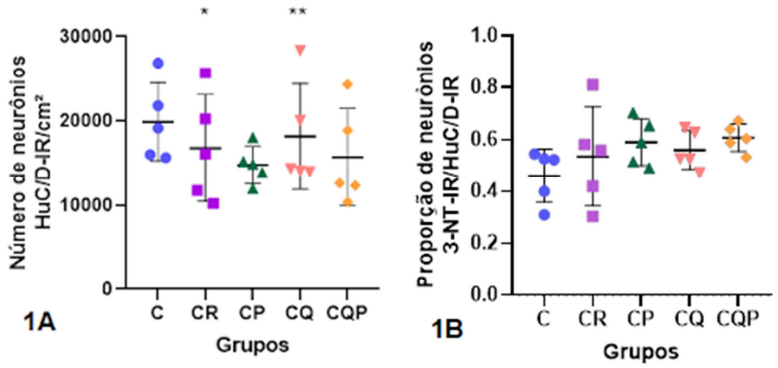

Figura 1: Em 1A, o gráfico demonstra a quantificação de neurônios HuC/D-IR de acordo com os grupos experimentais (n=5): C= controle; CR= carcinogênese colorretal; CP=carcinogênese colorretal administrado com probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC; CQ= carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg; CQP= carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada 10mg/Kg e probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis $5x10^7$UFC. Em 1B, o gráfico demonstra a proporção de neurônios 3-NT-IR para neurônios HuC/D-IR de acordo com os grupos experimentais. * = $p<0,05$ em relação ao grupo C; ** = $p<0,05$ em relação ao grupo CR.

A respeito da quantificação de neurônios totais (HuC/D-IR), presente na figura 1A, observa-se diminuição de 17,79% na quantidade de neurônios HuC/D-IR no grupo CR em comparação com o grupo C. Enquanto que o grupo CQ apresentou aumento de 19,23% na média da quantidade de neurônios HuC/D-IR em comparação com o grupo CR, o que indicou menor redução na quantidade total de neurônios em relação ao grupo C. Os grupos CP e CQP não apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo CR.

Um estudo com modelo experimental de artrite reumatoide administrado com quercetina microencapsulada observou redução na população total de neurônios HuC/D-IR no plexo submucoso do jejuno de ratos doentes em comparação com o grupo controle e aumento de neurônios HuC/D-IR em ratos doentes administrados com quercetina

microencapsulada 10mg/Kg, demonstrando efeito neuroprotetor da quercetina quanto à perda neuronal (PIOVEZANA BOSSOLANI et al., 2019). Os resultados encontrados em nosso estudo a respeito da redução da população neuronal HuC/D-IR em animais doentes (grupo CR) em comparação com o grupo C e aumento na população de neurônios do grupo CQ em comparação com o grupo CR está em conformação com a literatura, demonstrando possível efeito neuroprotetor da quercetina em modelo experimental de carcinogênese colorretal.

Na figura 1B, apesar do aumento de 15,94% na proporção de neurônios HuC/D-3-NT-IR no grupo CR em relação ao grupo C, não houve diferença estatística entre os grupos, assim como não houve diferença estatística entre o grupo CR e os demais grupos.

Não foram encontrados, na literatura, estudos a respeito da expressão de 3-NT em ratos induzidos à carcinogênese colorretal. Estudos anteriores do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica mostraram que a expressão de 3-NT está aumentada nos neurônios entéricos de ratos diabéticos (HERMES-ULIANA et al., 2018) diferentemente do presente estudo.

Conclusões

Conclui-se que o CCR não causou alterações em neurônios 3-NT-IR, entretanto afetou a população geral de neurônios HuC/D-IR. Dentre os tratamentos testados, apenas a quercetina administrada isoladamente apresentou papel neuroprotetor ao prevenir a redução de neurônios HuC/D-IR.

Agradecimentos

Ao CNPq, por ter financiado esta pesquisa. À Profª Drª Juliana Vanessa Colombo Martins Perles e ao doutorando Lucas Casagrande, pela excelente orientação e ensinamentos. À equipe do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica pelo auxílio ao longo da pesquisa.

Referências

BOZKURT, H. S.; QUIGLEY, E. M.; KARA, B. **Bifidobacterium animalis subspecies lactis engineered to produce mycosporin-like amino acids in colorectal cancer prevention**. SAGE Open Medicine, v. 7, p. 205031211982578, 22 jan. 2019.

CARINI, F. et al. **Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants**. Anticancer Research, v. 37, n. 9, p. 4759–4766, 6 set. 2017.

DARBAND, S. G. et al. **Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer**. Journal of Cellular Physiology, v. 233, n. 9, p.6544–6560, 1 set. 2018.

HERMES-ULIANA, C. et al. **Supplementation with L-glutathione improves oxidative status and reduces protein nitration in myenteric neurons in the jejunum in diabetic *Rattus norvegicus***. Experimental and Molecular Pathology, v. 104, n. 3, p. 227–234, 1 jun. 2018.

PIOVEZANA BOSSOLANI, G. D. et al. **Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin**

promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. Life Sciences, v. 238, p. 116956, dez 2019.