

AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCINAS NO CÓLON DE RATOS WISTAR TRATADOS COM QUERCETINA E *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS*, POR MEIO DA MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA

César Agostinho Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lucas Casagrande, Murilo Arthur Gauer, Brenda Barroso Pelegrini, 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 da Saúde/Maringá,
PR.

Saúde/Medicina

Palavras-chave: Lesões pré-neoplásicas, Morfometria Computadorizada, Quantificação de mucinas

Resumo:

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer com maior incidência no mundo. A redução da produção de mucinas ácidas intestinais é consideradabiomarcadores para experimentos de compostos com possível atividade antineoplásica. A quercetina é um antioxidante utilizado para minimizar danos gerados por Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). O *Bifidobacterium animalis* modula a microbiota intestinal exercendo função anti-inflamatória e anticarcinogênica. O objetivo desse estudo foi avaliar por morfometria computadorizada a produção de mucinas ácidas em animais tratados com quercetina e *B. animalis* utilizando a coloração de Alcian Blue (AB). 32 cólons de ratos divididos em 4 grupos experimentais: GI – grupo controle; GII – grupo induzido com DMH; GIII – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina; GIV – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina e *B. animalis*. Os resultados com AB mostraram que no GI a produção de mucina foi menor, nas regiões proximais e distais, em relação ao GII. Os grupos GIII e GIV apresentaram maior produção de mucina, em relação ao GII, em ambas as regiões. Na região proximal, o GIII apresentou menor produção de mucina em relação ao GIV, mas na região distal, apresentou maior produção. Porém, não foram observados efeitos estatisticamente significativos do tratamento de quercetina e do *B. animalis* na produção de mucina pela mucosa colônica, em ambas as regiões analisadas, sugerindo que, na dosagem utilizada destes antioxidantes, não observamos efeito quimioprotetor. Além disso, no GIII observou-se uma formação polipoide com completa ausência de produção de mucina.

Introdução:

O câncer colorretal (CCR) tem se apresentado como um enorme problema de saúde pública por vitimizar milhares de indivíduos ao redor do mundo. O epitélio do cólon e do reto é protegido e recoberto por uma camada de muco

constituído por glicoproteínas, cuja maioria são as mucinas, proteínas de alto peso molecular rica em carboidratos secretadas pelas células caliciformes contidas nas criptas intestinais. Grupo de especial interesse, as mucinas ácidas mostraram relação entre sua redução na expressão tecidual e o aumento do risco de desenvolvimento de CCR (VIEIRA-FREZ et al., 2020). A coloração com Alcian-Blue (AB) identifica um subgrupo específico demucinas, as sialomucinas, determinando um padrão histológico que possibilita a quantificação da produção desse grupo na mucosa colônica, com auxílio da morfometria computadorizada. Tradicionalmente, estudos utilizam-se do 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) para a indução colorretal de neoplasias. Essa substância é um indutor indireto por promover a hipermetilação do DNA das células epiteliais colorretais. A quercetina apresenta um grande potencial antioxidante, tendo suas propriedades atribuídas a neutralização do oxigênio reativo, afastando danos oxidativos ao DNA e inibindo a proliferação celular (ARAÚJO et al., 2016). O *Bifidobacterium animalis* relaciona-se à modulação da composição da microbiota, do aprimoramento da barreira epitelial intestinal, além do aumento no número de metabólitos anticarcinogênicos e antioxidantes (MOLSKA; REGUŁA, 2019). Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar e quantificar a produção de mucinas no cólon de ratos Wistar, por meio da morfometria computadorizada, a fim de avaliar a atividade quimiopreventiva e/ou antitumoral da quercetina e do *B. animalis*.

Materiais e métodos

A amostra era composta por 32 cólons de ratos Wistar machos, proveniente de um experimento prévio, onde os animais foram divididos em 4 grupos: GI – grupo controle (n = 8); GII – grupo induzido com DMH (40 mg/Kg via IP) (n=8); GIII – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina (10 mg/Kg por gavagem) (n=8); GIV – grupo induzido com DMH e tratado com quercetina e *B. animalis* (10 mg/Kg por gavagem) (n=8). 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 μ m de espessura, aderidos às lâminas e corados com AB. Com auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio óptico (*Opticam microscopy technology – Lopt 14003*), foram realizadas a captura de 10 imagens por corte histológico, em uma ampliação de 200x, as quais foram analisadas utilizando o *software ImagePro-Plus*. Este software determinou a intensidade da cor em número de *pixels* em cada campo selecionado através do Cálculo da Porcentagem total de *pixels*, definido pela razão entre a média de *pixels* selecionados e a área total da imagem em *pixels*. Os dados obtidos do experimento, expressos como média \pm desvio padrão do n^o de animais por grupo, foram analisados no programa estatístico BioEstat 5.0 por 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

Regiões com ausência ou escassez da produção de mucina foram observadas em ambas as regiões, proximal e distal (Tabela 1). Em relação à região proximal, o GII apresentou maior produção de mucina, em relação ao GI, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Os grupos GIII e GIV apresentaram uma menor produção de mucina, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao GII. Em comparação entre GIII e GIV, o grupo que recebeu tratamento com quercetina apresentou menor produção de mucina ($p < 0,05$). Tem se estabelecido que focos de criptas com ausência ou escassez da produção de mucina, como observados nesse estudo (figura 1), são supostamente uma das primeiras manifestações teciduais de transformação neoplásica, que culminaria no CCR. Na região colônica distal, GII apresentou maior produção de mucina, em relação ao GI ($p > 0,05$). GIII e GIV apresentaram uma produção reduzida de mucina, em relação ao GII ($p < 0,05$). Quando se comparou GIII e GIV entre si, o grupo tratado com quercetina e *B. animalis* apresentou a menor produção de mucinatecidual ($p < 0,05$). Em uma amostra do GIII foi observado uma formação polipoide adenomatosa com áreas de displasia grave, desarranjo arquitetônico, morfologia nuclear atípica e completa depleção de sialomucinas (figura 1). A quercetina tem-se mostrado como inibidora da formação de tumores colônicos e da proliferação de células do tumor, além de promover reações anti-inflamatórias que ajudariam na prevenção do CCR (ARAÚJO et al., 2016). Entretanto, efeitos deletérios dose-dependente já foram observados em doses que se tornaram tóxicas à mucosa intestinal de ratos saudáveis, indicando uma atividade pró-oxidante (VIEIRA-FREZ et al., 2020). O *B. animalis* já se apresentou como potencial probiótico no tratamento da prevenção e tratamento do CCR, a depender da cepa bacteriana originária e, portanto, das propriedades que ela exhibe (MOLSKA; REGUŁA, 2019). No presente estudo não foram observadas mudanças significativas que poderiam indicar um efeito quimioprotetor, nas doses utilizadas de quercetina e de *B. animalis*, em relação a prevenção das lesões pré-neoplásicas para o CCR. Portanto, a análise da produção de mucina se mostrou uma importante ferramenta biomarcadora tumoral (FEMIA et al., 2004).

Tabela 1. Quantificação da produção de mucinas ácidas, coradas com AB, nas regiões proximais e distais do cólon, nos grupos controles, experimentais induzidos com DMH e com tratamento de quercetina e *Bifidobacterium animalis*.

	Proximal (%)	Distal (%)
GI	1,934 ± 0,829	2,017 ± 0,7695
GII	2,579 ± 1,503 ^a	2,035 ± 1,225 ^a
GIII	1,776 ± 1,518 ^a	1,457 ± 0,929 ^a
GIV	1,945 ± 1,239 ^a	1,287 ± 1,067 ^a

% - porcentagens de Pixels marcados por mucina. GI= grupo controle; ^a GII= grupo experimental com indução por DMH; GIII= grupo experimental com indução por DMH + Quercetina; GIV= grupo experimental com indução por DMH + Quercetina + *Bifidobacterium animalis*. Resultados expressos como média das quantidades observadas nos animais do mesmo grupo ± desvio padrão.

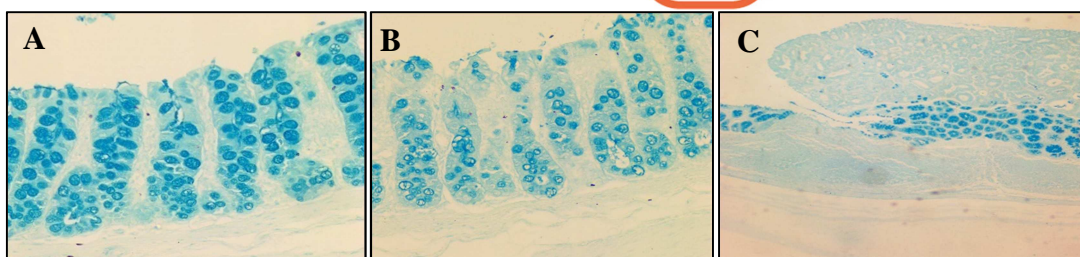


Figura 1. Mucosa colônica corada com AB representando uma vista topográfica. A. Padrão normal da expressão de mucinas ácidas (objetiva 20x). B. Padrão reduzido da expressão de mucinas ácidas (objetiva 20x). C. Formação polipoide (objetiva 4x).

Conclusões

Não foram observadas alterações significativas que poderiam indicar um efeito quimioprotetor da quercetina e do *B. animalis*, nas doses utilizadas, em relação ao câncer colorretal, quando consideramos a produção de mucina tecidual na mucosa colônica submetida a indução por carcinógenos. Porém, a avaliação da produção tecidual de mucinas constitui-se como ótimos biomarcadores em bioensaios para avaliação quimiopreventiva de compostos com provável atividade antineoplásica.

Agradecimentos

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

Referências

- ARAÚJO, L. R. L. et al.. Antioxidantes na Prevenção do Câncer em Idosos. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 1, p. 18–26, 2016.
- MOLSKA, M.; REGUŁA, J. Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.
- FEMIA, A.P.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 277–281, 2004.
- VIEIRA-FREZ, F. C. et al. Anti and pro-oxidant effects of quercetin stabilized by microencapsulation on interstitial cells of Cajal, nitrenergic neurons and M2-like macrophages in the jejunum of diabetic rats. **NeuroToxicology**, v. 77, n. January, p. 193–204, 2020.