

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

Murilo Arthur Gauer (PIBIC/CNPq/FA/Uem), César Agostinho Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Brenda Barroso Pelegrini, 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.

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

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

**Palavras-chave:** Sialomucinas, Probiótico, morfometria computadorizada

### **Resumo:**

A evolução do câncer colorretal (CCR) apresenta diversas etapas entre o estado fisiológico e a organização tumoral. Focos de criptas aberrantes (FCA) estão presentes no processo de carcinogênese do cólon em diferentes graus de displasia, podendo levar a uma alteração da função das células da mucosa e, conseqüentemente, afetar a expressão de mucinas do tecido. Os probióticos exercem funções protetivas contra inflamações da mucosa gastrointestinal por meio de uma relação de equilíbrio com a flora, evitando danos oxidativos que poderiam desencadear o processo patogênico. O objetivo desse estudo foi avaliar por morfometria computadorizada a produção de mucinas ácidas em animais tratados com *Bifidobacterium animalis* utilizando a coloração de Alcian Blue (AB). Cólores de ratos divididos em 3 grupos experimentais: GI – grupo controle; GII – induzido com 1,2-dimetilhidrazina (DMH); GIII – induzido com DMH e tratado com *B. animalis*. Na região proximal houve diferenças estatísticas significantes entre todos os grupos em relação ao grupo controle, bem como entre os GII e III na porção distal. Os resultados mostraram diferenças relevantes entre GII e III em ambas as porções proximais e distais. Assim, foi possível avaliar a ação do probiótico no seu mecanismo para prevenir danos a mucosa que poderiam dar início ao processo carcinogênico e um possível controle na evolução para CCR, além de ser observado a eficiência do método de quantificação de mucinas por morfometria para identificação de lesões precursoras de tumor no cólon.

### **Introdução:**

O câncer colorretal é um problema de saúde evidente no mundo ocidental, estimado como 3ª câncer com maior incidência junto a altas taxas de mortalidade (Moati *et al.*, 2018). A região do cólon apresenta criptas

constituídas por vários tipos de células, dentre elas, células caliciformes produtoras de muco que atuam fisiologicamente com um padrão de intensidade variado ao longo dos segmentos colônicos, podendo ser utilizado o corante Alcian-blue para identificação de subgrupos específico destas mucinas, em especial as sialomucinas (Mohania, D; Kansal, V.K; Kruzliak, P. 2014). Anormalidades nesse padrão de distribuição das mucinas estão presentes em diversas patologias que acometem o cólon, entre elas doenças de carácter inflamatório e o câncer colorretal (Martinez *et al.*, 2009). 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 o agente carcinogênico de escolha para a indução etapas iniciais da carcinogênese colorretal. Durante este processo o estresse oxidativo estimula a proliferação e sobrevivência de células cancerígenas promovendo fenótipos oncogênicos através da ativação de vários fatores de transcrição nucleares. A atividade antioxidante de probióticos tem sido demonstrada quando administrados em quantidades adequadas, com possíveis efeitos benéficos na redução da resposta inflamatória e antioxidante sistêmico em terapia para o CCR. (Anderson, S.W; Bazzell, A.F; Dains, J.E, 2018). Nesse sentido, este trabalho procurou quantificar os níveis teciduais de mucinas ácidas através da morfometria computadorizada para avaliar a ação protetora da terapia com probióticos em lesões oxidativas e sua ação quimiopreventiva para o CCR.

### **Materiais e métodos:**

Este projeto consiste na análise de amostras de tecido de intestino de ratos Wistar, disponíveis em nosso laboratório, induzidos com DMH tratados com o probiótico *Bifidobacterium animalis*. Os animais foram organizados em grupos experimentais conforme: 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 *B. animalis* (10 mg/Kg por gavagem) (n=8). As lâminas foram desparafinadas em banhos sucessivos de xilol, alcoolizadas em banhos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. A seguir, incubadas em corante Alcian Blue (AB). Posteriormente, os cortes foram desidratados em banhos sucessivos de álcool absoluto, diafanizadas em xilol, e montadas com resina e lamínula. A expressão das mucinas ácidas foi quantificada com a captura de imagens ao longo de todo corte histológico, em um total de 10 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)*. 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%.

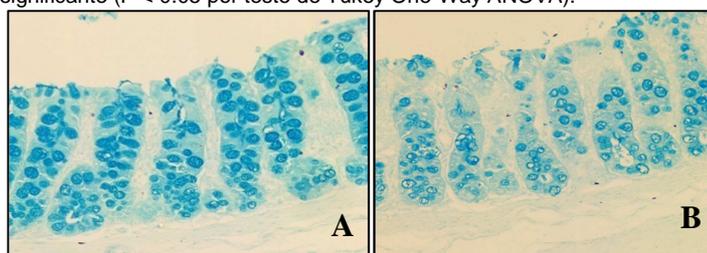
## Resultados e Discussão

No presente estudo foram comparadas as porções proximais e distais entre **GI**, **GII** e **GIII**. Na região proximal houve diferenças estatísticas significantes entre todos os grupos em relação ao grupo controle (GI), bem como entre os GII e III na porção distal (Tabela 01). Segundo Mohania *et al.*, (2014) a produção de mucinas ácidas é afetada progressivamente quanto ao tempo de indução por DMH, enquanto que a ação terapêutica de probióticos benéficos reduzem a ocorrência de lesões pré-neoplásicas induzidas de maneira eficaz. Em nosso estudo observamos que o GII apresentou elevado percentual de mucinas em ambas às porções do cólon, porém, não observamos o efeito protetor do probiótico *B. animalis* na dose utilizada. Além disso, a literatura informa que, regiões do cólon com escassez de produção de mucina, podem ser possíveis locais precursores para o CCR, de forma que lesões mais avançadas teriam essa depleção de mucina mais evidente (Martinez *et al.*, 2009). Da mesma forma o grupo terapêutico **GIII** apresentou redução estatisticamente diferente em relação ao GII. No presente estudo não foram observadas mudanças que poderiam indicar um efeito quimioprotetor, nas doses utilizadas de *B. animalis*, em relação a prevenção das lesões pré-neoplásicas para o CCR. Porém, a análise da produção de mucina se mostrou uma importante ferramenta biomarcadora tumoral (Martinez *et al.*, 2009).

**Tabela 01.** Quantificação da produção de mucinas ácidas, nos grupos experimentais induzidos com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) tratados com *Bifidobacterium Animalis*.

	Proximal (%)	Distal (%)
<b>GI</b>	1.823 ± 0.918 <sup>a</sup>	1.902 ± 1.073
<b>GII</b>	2.577 ± 1.552 <sup>a</sup>	2.135 ± 1.220 <sup>b</sup>
<b>GIII</b>	2.161 ± 1.138 <sup>a</sup>	1.834 ± 0.961 <sup>b</sup>

% - porcentagens de Pixels marcados por Mucina. <sup>a</sup>GI= grupo controle; <sup>b</sup>GII= grupo experimental com DMH; GIII= grupo experimental com DMH + *Bifidobacterium animalis*. Resultados expressos como média ± desvio padrão.<sup>ab</sup> Diferença estatística significativa (P < 0.05 por teste de Tukey One-Way ANOVA).



**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).

## Conclusões:

O uso de probióticos atua de medida preventiva para os danos oxidativos na mucosa colônica que podem progredir para o CCR, como descrito em estudos controlados similares. Neste estudo, não encontramos uma ação semelhante de prevenção às lesões pré-neoplásicas. Acreditamos que provavelmente outros mecanismos afetem o equilíbrio da flora gastrointestinal e sua relação com a mucosa colônica. Quanto a quantificação de mucinas por morfometria computadorizada, concluímos que é possível avaliar de forma objetiva o grau de produção de mucinas ácidas ao longo do cólon e que essa metodologia é útil para a identificação de pontos precoces da 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:**

ANDERSON, S.W; BAZZELL, A.F; DAINS, J.E. **An Integrative Review on the Effect of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics on Infection After Colorectal Cancer Surgery.** AORN J. Feb;107(2):237–48. 2018.

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.

MARTINEZ, C.A.R *et al.* **Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos.** Rev bras Coloproct. (Suppl 1):47-8. 2009.

MOATI, E. *et al.* **Role of circulating tumor DNA in the management of patients with colorectal cancer.** Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, v. 42, p. 396-402, 2018.

MOHANIA, D; KANSAL, V.K; KRUZLIAK, P. **Probiotic Dahi containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum modulates the formation of aberrant crypt foci, mucin depleted foci and cell proliferation on 1, 2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats.** Rejuvenation Research, 2014