

ESTUDO DA AÇÃO QUIMIOPREVENTIVA DA PRÓPOLIS MARROM E DA ARTEPILLIN C NA REGIÃO COLORRETAL DE RATOS WISTAR INDUZIDOS COM 1,2-DIMETILHIADRAZINA

Paulo Hernandes Nabarro (PIC/ UEM), Brenda Barroso Pelegrini; Amanda Alexandrino Becker; Gregório Rossetto Machado, Sabrina Roledo Mazarin, Tânia Cristina Alexandrino Becker(Orientador), e-mail:tcabecker@uem.br

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

Área: 40600009 (Saúde Coletiva); Subárea: 40603008 (Medicina Preventiva).

Palavras-chave: Quimioprevenção, Própolis Marrom Brasileira e Artepilin C.

Resumo:

O 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é usado na indução de lesões na mucosa intestinal como Criptas Aberrantes (CA) e os Focos de Criptas Aberrantes (FCA). Atividades quimiopreventivas foram observadas na Própolis Marrom Brasileira (PMB) e Artepilin C (ARC) em modelos experimentais com roedores. Objetivo: Avaliar a atividade quimiopreventiva e/ou antitumoral da PMB e ARC na região colorretal de ratos Wistar. Método: Utilizamos 25 ratos Wistar machos, em oito grupos: controle, com e sem indução com DHM e tratados com PMB enriquecida (PMBE) e ARC, durante dezesseis semanas. A análise do cólon coloração foi feita com coloração azul de metileno para contagem e quantificação das CA e FCA. Resultados: a quantidade de FCA nos grupos experimentais diminuiu, em ambas as porções do cólon analisadas, enquanto que o número de CA isoladas aumentou. Além disso, o DMH foi eficaz na indução de FCA. Conclusão: a PMBE e ARC têm bom potencial antioxidante e impediram a expansão clonal das células das criptas.

Introdução

O câncer colorretal (CCR), um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental, é influenciado por vários fatores de risco, que contribuem para o aumento de neoplasias em geral, influenciando no estado oxidativo das células e desenvolvimento dessa enfermidade (Venkatachalam et al., 2020). A mucosa colônica apresenta um grande número de glândulas ou criptas de Lieberkuhn, caracterizadas por abundância de células caliciformes e um pequeno número de células enteroendócrinas. As criptas colônicas têm alta especificidade com o 1,2-dimetilhidrazina (DMH), considerado um potente carcinógeno utilizado para a indução do CCR, por causar estresse oxidativo nas células da mucosa intestinal, podendo levar à formação de Criptas Aberrantes (CA), consideradas lesões pré-neoplásicas. As criptas aberrantes são identificadas por seu formato elíptico e zona pericriptal elevada em relação às criptas normais e, o conjunto dessas, são conhecidos como Focos de Criptas Aberrantes (FCA). As criptas são facilmente

encontradas na mucosa colônica neoplásica corada por azul de metileno (Bird, 1987; Venkatachalam et al., 2020). A ação antitumoral é uma das propriedades estudadas para a própolis Marrom Brasileira (Sepúlveda et al., 2020). Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade quimiopreventiva, em relação à carcinogênese colorretal, da Própolis Marrom Brasileira e sua fração enriquecida e do composto majoritário da PMB, a artepellin C, por meio da avaliação das lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar.

Materiais e Métodos

Foram usados 25 cólons de ratos Wistar adultos machos distribuídos em 8 grupos, com duração total de 16 semanas, e o extrato de Própolis Marrom foi fornecido pelo setor de farmacologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Os grupos foram: Controle negativo diluente DMH (GI), controle negativo da gavagem (GII), Controle positivo indução (GIII), Grupo tratamento experimental PMBE (GIV), Grupo tratamento experimental com ART C (GV), Controle tratamento experimental PMBE (GVI), Controle tratamento experimental ART C (GVII) e Controle tratamento padrão 5-FU (GVIII). Os animais foram inoculados via intraperitoneal com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 40mg/kg, diluída em solução de tampão fosfato (PBS) com EDTA 1,5 pH 6,5, duas vezes por semana durante 2 semanas (Rodrigues et al., 2002). Os animais tratados com 5-FU receberam 01 dose via IP por 5 dias consecutivos, correspondente a 35 mg/kg, na 3ª semana de experimento. Porém estes animais morreram nas primeiras semanas de inoculação, possivelmente por erro na dosagem, e foram excluídos da amostra. Os extratos foram inoculados por gavagem. A análise da avaliação ponderal foi representada pelo percentual de aumento relativo (peso final/peso inicial x 100) (Blainski, 2010), e as doses eram adequadas semanalmente, de acordo com a variação do peso. A eutanásia foi realizada com a administração de Cloridrato de Xilazina (30mg/kg) e Cloridrato de Quetamina (240mg/kg) por via IP. O intestino grosso foi totalmente removido e aberto na linha mesentérica na sua extensão, distendido e fixado sobre pequenas placas de isopor, medidos com fita métrica, lavados com solução salina e imersos em paraformaldeído por 06 horas. As porções intestinais foram mantidas em álcool 70º e corados com azul de metileno 1%, diluído em PBS, para análise das CA e FCA. As criptas e os focos de criptas aberrantes foram identificadas segundo descrição de Bird (1987), com auxílio de um microscópio de luz/objetiva de 4x. As categorias histológicas incluíram: CA isolada e FCA com 02 a 03, 04 a 09 ou mais de 10 CA/foco.

Os experimentos foram descritos em média $\pm$ desvio padrão do número de criptas e focos de criptas aberrantes por animal de cada grupo, e os dados analisados por testes estatísticos Oneway ANOVA e Tukey HSD ou Kruskal-Wallis e Nemeniy. 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 $\pm$ e desvio padrão. De acordo com os

resultados, os grupos controles não induzidos com o DMH, (GI, GII, GVI e GVII), as CAs e FCAs não foram visualizados. Porém, no grupo III observamos valores elevados na região proximal e distal, tanto de CA quanto de FCA. Em relação as CA isoladas (Figura 1A), em ambas as porções, proximais e distais, observamos a ocorrência de um aumento de CA sem diferença significativa, no GV, quando comparados ao grupo III (Tabela 01). Quanto aos FCA (Figuras 1B, 1C), os resultados encontrados mostraram diferença significativa entre os grupos GIII e GIV para FCA com 2-3 criptas/foco na região proximal, e nos FCA com 4-9 e mais de 10 criptas/foco na porção distal, sugerindo que a PMBE pode ter controlado a proliferação de criptas aberrantes nos focos. Esses resultados podem sugerir que a PMB, inicialmente, não conseguiu controlar a transformação de criptas normais em aberrantes, mas, provavelmente, inibiu a expansão clonal de células que compõem os FCA e a sua formação. Estes resultados sugerem que o tratamento experimental com PMBE e ART C exerce ação quimioprotetora, controlando a multiplicidade de criptas/foco, manifestação tecidual importante no desenvolvimento do CCR (Venkatachalam et al., 2020).

Tabela 1. Média de 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 Própolis Marrom Brasileira enriquecida e artepillin C.

Grupos	Cólon proximal				Cólon distal			
	CA	FCA			CA	FCA		
	1 cripta	2-3 criptas	4-9 criptas	≥ 10 criptas	1 cripta	2-3 criptas	4-9 criptas	≥ 10 criptas
GI	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0,16 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0
II	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0,16 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0
GIII	25,3 ± 11.2	29,6 ± 12.9 *	3,4 ± 3.3	0 ± 0.0	26,1 ± 7.5	101,6 ± 26	96,3 ± 26.5 *	4,0 ± 2.9 *
GIV	17,6 ± 5.2	6,6 ± 4.1 *	0,16 ± 0.4	0 ± 0.0	37 ± 21.2	66,3 ± 13.3	30,5 ± 19.9 *	0,16 ± 0.4 *
GV	29 ± 0.0	10 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	44 ± 19.7	84,5 ± 24.7	51 ± 21.2	0 ± 0.0
GVI	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0,3 ± 0.5	0 ± 0.0	0 ± 0.0
GVII	0 ± 0.0	0,5 ± 0.7	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0

% - porcentagens de Pixels marcados pormucina. GI= grupo controle; GII= grupo controle gavagem; a GIII= grupo experimental com indução por DMH; bGIV= grupo experimental com indução por DMH + PMBE; GV= grupo experimental com DMH+ARC; GVI e GVII= grupo controle PMBE e ARC, respectivamente. Resultados expressos como média das quantidades observadas nos animais do mesmo grupo ± desvio padrão

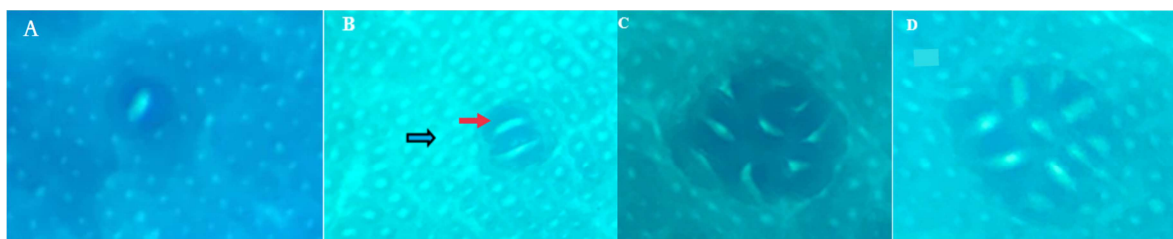


Figura 2. Fotomicrografias de criptas e focos de criptas aberrantes - A: cripta aberrante isolada; (B, C e D): focos de criptas aberrantes com 2, 9 e mais de 10 criptas, respectivamente. Objetiva de 4x.

Conclusões

Os resultados mostraram que este modelo experimental em animal é uma ferramenta útil na investigação de compostos com caráter quimioprotetor e que se faz necessário dar continuidade na pesquisa com uma gama maior de opções de doses experimentais a fim de buscar o equilíbrio necessário na dose e meio de administração, resultando em ganho potencial máximo das substâncias avaliadas.

Agradecimentos

Agradeço à minha professora orientadora Tânia Cristina Alexandrino Becker e aos colegas do laboratório de Patologia geral da UEM, pelo apoio durante a pesquisa.

Referências

BIRD, R.P. Observation and qualification of aberrant crypt in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Letter*. 37:147-51. 1987.

BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 101 f. 2010.

RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, L.A.G.; SALVADORI, D.M.F.; DE CAMARGO, J.L.V.; MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, **35**: 351-355. 2002.

SEPÚLVEDA, C., NÚÑEZ, O., TORRES, A., GUZMÁN, L., & WEHINGER, S. "Antitumor activity of propolis: recent advances in cellular perspectives, animal models and possible applications." *Food Reviews International* 36.5. 2020; 429-455.

VENKATACHALAM K, VINAYAGAM R, AROKIA VIJAYA ANAND M, ISA NM, PONNAIYAN R. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. *Toxicol Res (Camb)*. 2020; 9(1):2-18. doi: 10.1093/toxres/tfaa004.