

## **AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA PRÓPOLIS MARROM NO CONTROLE DO NÚMERO E TIPO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES NA REGIÃO COLORRETAL DE RATOS WISTAR - PRIMEIROS PRECURSORES IDENTIFICÁVEIS DO CÂNCER COLORRETAL (CCR).**

Sabrina Roledo Mazarin (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Paulo Hernandes Nabarro, Brenda Barroso Pelegrini; Amanda Alexandrino Becker; Gregório Rosseto Machado, 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: 40600009 (Saúde Coletiva); Subárea: 40603008 (Medicina Preventiva).**

**Palavras-chave:** Focos de Criptas Aberrantes, 1,2-dimetilhidrazina, Própolis Marrom Brasileira.

### **Resumo:**

O câncer colorretal (CCR) é um dos maiores problemas de saúde no mundo. O 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é um potente carcinógeno usado na indução do CCR, gerando lesões na mucosa intestinal conhecidas como Criptas Aberrantes (CA) e seu conjunto, os Focos de Criptas Aberrantes (FCA) hiperplásicas e displásicas, sendo que o epitélio hiper proliferativo é uma das etapas principais no desenvolvimento do CCR. Modelos experimentais desenvolvidos em roedores auxiliam na obtenção de informações sobre a iniciação e progressão dessas lesões de caráter pré-neoplásico. Atividades biológicas importantes foram descobertas na Própolis Marrom Brasileira (PMB). **Objetivo:** Avaliar a atividade quimiopreventiva e/ou antitumoral da própolis marrom em lesões de caráter pré-neoplásicas na região colorretal de ratos Wistar. **Métodos:** Utilizamos 26 ratos *Wistar* machos, divididos em seis grupos experimentais, dentre eles, grupos controles, grupos com e sem indução com DMH e tratamentos com PMB, durante dezesseis semanas. O cólon dos animais foi analisado por meio da coloração de azul de metileno para classificação e quantificação das CA e dos FCA. **Resultados:** a quantidade de FCA nos grupos experimentais (induzidos ou não) diminuiu, em ambas as porções do cólon, enquanto o número de CA isoladas aumentou. Além disso, o DMH foi eficaz na indução de FCA. **Conclusão:** A PMB e seus derivados têm bom potencial antioxidante e impediram a expansão clonal das células das criptas.

### **Introdução**

O câncer colorretal (CCR) é um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental (Eser et al, 2018). Vários são os fatores de risco que contribuem para o aumento na incidência de neoplasias nos seres humanos, através de alterações no estado oxidativo das células. O 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é um carcinógeno

potente, muito utilizado na indução do CCR devido à alta especificidade às células do cólon, e à semelhança de patogenia entre roedores e humanos (Venkatachalam et al., 2020). Esse composto pode gerar um estresse oxidativo capaz de lesionar a mucosa intestinal, podendo levar à formação de Criptas Aberrantes (CA), caracterizadas por seu formato elíptico e zona pericriptalelevada em relação às normais e, o conjunto dessas, são conhecidos como Focos de Criptas Aberrantes (FCA). Na superfície da mucosa colônica de ratos corada com azul de metileno, tratados com carcinógenos, é fácil a observação de CA e FCA (Bird, 1987; Venkatachalam et al., 2020). A capacidade antioxidante dos produtos apícolas, comprovadamente capazes de neutralizar os efeitos do estresse oxidativo pertencente à patogênese, torna a Própolis Marrom Brasileira objeto de estudo relevante na formulação de fármacos de ação antitumoral à base de seu extrato (Sepúlveda et al., 2020). Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade quimiopreventiva, em relação à carcinogênese colorretal da PMB por meio da avaliação das lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos *Wistar*.

## Materiais e Métodos

A amostra era composta de 26 ratos adultos machos, da linhagem Wistar, durante um período experimental de 16 semanas, distribuídos em 6 grupos (GI – controle negativo de gavagem; GII – controle positivo indução; GIII – tratamento experimental PMB; GIV – tratamento experimental profilático PMB; GV – controle tratamento experimental PMB; GVI – controle tratamento padrão). Os animais do GI receberam apenas o diluente do DMH (PBS) via gavagem. Os ratos dos grupos GII, GIII e GVI foram inoculados via intraperitoneal (IP) com DMH 40mg/kg 2x/semana, durante as 2 semanas iniciais; e o grupo GIV, durante a 6ª e a 7ª semana. O extrato alcoólico de PMB foi administrado via gavagem nos grupos GIII e GV na dosagem de 80mg/kg, 5x/semana nas 2 semanas iniciais e 3x/semana nas restantes. No grupo GIV, as suspensões de PMB foram aplicadas 3x/semana durante todo o experimento. Os animais do grupo GVI receberam 01 dose IP 35mg/kg de 5-FU durante 5 dias consecutivos, na 3ª semana do experimento. Os animais foram pesados semanalmente para correção das doses.

Todos os animais sofreram eutanásia e tiveram seu cólon coletado. O material foi incluído em solução fixadora de paraformaldeído por 6h. Após, os intestinos foram armazenados em álcool 70º para análise das CA e FCA com azul de metileno 1% dissolvido em PBS. A quantificação das foi realizada ao microscópio de luz, com aumento de 40x, nas regiões proximais e distais. 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 nº de CA e FCA/animal de cada grupo, e os dados foram analisados por testes estatísticos (teste de Shapiro-Wilk, teste de Levene, 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 azul de metileno estão expressas na Tabela 1, pela média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados mostraram que, nos grupos controles não induzidos com DMH (GI, GII, GIV), CA e FCA foram visualizados, mas sem significância estatística. Já no grupo III, observam-se valores elevados de criptas em ambas as porções. Em relação as CA isoladas (Figura 1A), nota-se um aumento numérico de CA em todos os grupos com tratamento experimental induzido com DMH, se comparados a GIII.

Quanto aos FCA (Figuras 1B, 1C), os resultados encontrados mostraram diferença significativa nos FCA  $\geq 10$  criptas apenas entre GIII e GIV. Por outro lado, percebe-se que os animais induzidos e tratados com a PMB (GIV e GV) apresentaram resultados inferiores de FCA àqueles do grupo controle.

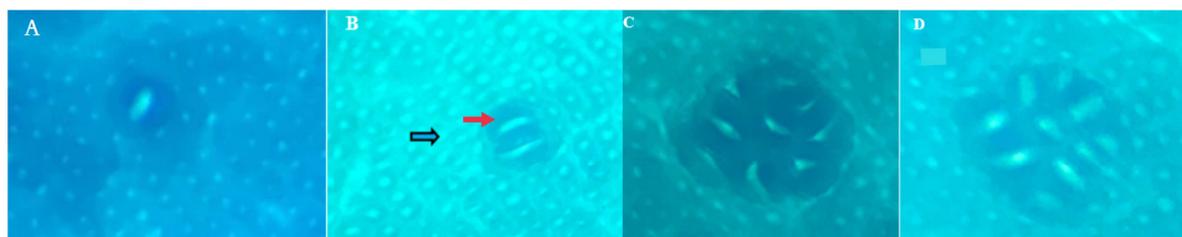
Os resultados do grupo de animais tratados com 5-FU (GVI) não foram mostrados pois os animais morreram, provavelmente por problemas com a dose administrada.

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. Tal fato reforça a hipótese que o tratamento experimental com PMB exerce ação quimioprotetora, controlando a multiplicidade de criptas/foco, manifestação tecidual importante no desenvolvimento do CCR (Wargovizh et al., 2010).

**Tabela 1**—Médias 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.

| Grupos | Cólon proximal  |                 |               |                   | Cólon distal    |                  |                 |   |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|---|
|        | CA              |                 | FCA           |                   | CA              |                  | FCA             |   |
|        | 1 cripta        | 2-3 criptas     | 4-9 criptas   | $\geq 10$ criptas | 1 cripta        | 2-3 criptas      | 4-9 criptas     | $\geq 10$ criptas                           |
| GI     | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0   | 0 $\pm$ 0.0       | 0 $\pm$ 0.0     | 0,16 $\pm$ 0.4   | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0                                 |
| GII    | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0   | 0 $\pm$ 0.0       | 0 $\pm$ 0.0     | 0,16 $\pm$ 0.4   | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0                                 |
| GIII   | 25,3 $\pm$ 11.2 | 29,6 $\pm$ 12.9 | 3,4 $\pm$ 3.3 | 0 $\pm$ 0.0       | 26,1 $\pm$ 7.5  | 101,6 $\pm$ 26   | 96,3 $\pm$ 26.5 | <b>4,0 <math>\pm</math> 2.9<sup>a</sup></b> |
| GIV    | 33,5 $\pm$ 8.6  | 28,6 $\pm$ 10.5 | 2,8 $\pm$ 2.6 | 0 $\pm$ 0.0       | 35,6 $\pm$ 20.2 | 87,1 $\pm$ 24.5  | 70,8 $\pm$ 16.9 | <b>1,3 <math>\pm</math> 1.2<sup>a</sup></b> |
| GV     | 34,6 $\pm$ 25.6 | 29,5 $\pm$ 25.1 | 2,3 $\pm$ 3.3 | 0 $\pm$ 0.0       | 61,5 $\pm$ 32.5 | 114,3 $\pm$ 31.3 | 59 $\pm$ 47.5   | 0,6 $\pm$ 1.2                               |
| GVI    | 0 $\pm$ 0.0     | 0,16 $\pm$ 0.4  | 0 $\pm$ 0.0   | 0 $\pm$ 0.0       | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0      | 0 $\pm$ 0.0     | 0 $\pm$ 0.0                                 |

% - porcentagens de Pixels marcados por mucina. GI= grupo controle; GII= grupo controle gavagem; <sup>a</sup>GIII= grupo experimental com indução por DMH; <sup>b</sup>GIV= grupo experimental com indução por DMH + PMB; GV= grupo profilático tratamento de PMB antes da indução por DMH; GII= grupo controle PMB. Resultados expressos como média das quantidades observadas nos animais do mesmo grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 1** – Fotomicrografias de criptas e focos de criptas aberrantes do cólon distal de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH). A: CA isolada; (B, C e D): FCA com 2, 9 e mais de 10, respectivamente, corados com Coloração Azul de Metileno e 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 Fundação Araucária pelo apoio financeiro, à minha professora orientadora Tania Cristina Alexandrino Becker, aos técnicos de laboratório Maristela Gabriel e Jailson Araújo Dantas, e aos colegas Brenda Barroso Pelegrini e Gregório Rosseto Machado, 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**, v. 37, p.147-51, 1987.

ESER, S. *et al.* Incidence patterns of colorectal cancers in four countries of the middle east cancer consortium (Cyprus, Jordan, Israel, and Izmir, Turkey) compared with those in the United States surveillance, epidemiology, and end results program. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 29, p.36-44, 2018.

SEPÚLVEDA, C. *et al.* Antitumor activity of propolis: recent advances in cellular perspectives, animal models and possible applications. **Food Reviews International**, v.36, n.5, p.429-455, 2020.

VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicol Res (Camb)**, v.9, n.1, p.2-18, 2020.

WARGOVICH, M. J.; BROWN, V. R.; MORRIS, J. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. **Cancers**, v. 2, p.1705–1716, 2010.