

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA E *Bifidobacterium animalis* NA MORFOMETRIA DE NEURÔNIOS VIPÉRGICOS SUBMUCOSOS DO JEJUNO DE RATOS INDUZIDOS QUIMICAQUENTE A CARCINOGENESE COLORRETAL

Anna Lara Secorun (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lucas Casagrande (Coorientador),
Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (Orientador), e-mail: jvcmpertes@uem.br.

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

Morfologia e histologia

Palavras-chave: neurônios, câncer, quercetina.

Resumo:

Objetivou-se avaliar o efeito da carcinogênese colorretal na expressão de VIP no plexo submucoso do jejuno de ratos induzidos quimicamente a lesões pré-neoplásicas e o efeito do tratamento com quercetina microencapsulada, probiótico (*Bifidobacterium animalis*), analisando a morfometria medindo a área de 100 corpos celulares de neurônio por animal. Foram utilizados ratos adultos machos da linhagem Wistar sendo divididos em 5 grupos com 8 animais cada: Controle (C), Câncer Colorretal (CR), Câncer Colorretal Quercetina (10mg/Kg, vo.) (CQ), Câncer Colorretal Probiótico (solução com 5×10^7 UFC, vo.) (CP) e Câncer Colorretal Quercetina Probiótico (CQP). A indução das lesões pré-neoplásicas foi feita, por injeção via intraperitoneal, com 1,2-dimetilhidrazina (DMH), 40 mg/Kg duas vezes por semana por duas semanas. Após eutanásia dos animais, processamento do material e realização das técnicas de imunomarcagem para VIP, realizou-se a captura das lâminas e a quantificação de neurônios em 32 imagens por animal, seguida por análise estatística.

Introdução

O câncer colorretal (CCR), no ano de 2020, foi o quarto tipo mais comum de câncer no mundo, assim como a terceira maior causa de mortes relacionadas ao câncer (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020). O câncer colorretal se desenvolve no intestino grosso, cólon e o reto, que se inicia por alterações genômicas, resultantes de mutações espontâneas ou induzidas por carcinógenos. Posteriormente essas células mutadas se proliferam e expandem, progredindo para perda de controle do crescimento celular e ainda se tornam capazes de ir para outros tecidos (metástase). Esses acontecimentos são resultantes de interações entre fatores genéticos, agentes externos ambientais e do estilo de vida (WEINBERG, 2008).

O CCR é caracterizado por apresentar evolução sequencial partindo de focos de criptas aberrantes, originando adenoma e formando então o carcinoma. As criptas aberrantes são lesões pré-neoplásicas que consistem em criptas com epitélio maior e mais espesso, em comparação com criptas normais, frequentemente reunidas em focos (CHENG; LAI, 2003; LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017). A resposta para essas lesões no trato gastrointestinal de acordo com a plasticidade, alterações neuronais, surgem por meio de mediadores como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e prostanoídes que comunica o sistema nervoso entérico ao sistema imunológico.

Sustâncias antioxidantes, como a quercetina que é um flavonoide presente em alimentos como cebola, coentro e brócolis são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a quercetina foi capaz de preservar o SNE durante o desenvolvimento de artrite reumatoide (PIOVEZANA BOSSOLANI et al., 2019). Além disso, a quercetina apresenta efeitos e interação com proteínas e receptores específicos. Tais características podem tornar a quercetina promissora no tratamento do CCR (DARBAND et al., 2018).

A avaliação de populações neuronais específicas dentre eles neurônios classificados funcionalmente como inibitórios é importante na avaliação do SNE. Desta forma, avaliamos o efeito da carcinogênese colorretal na expressão de VIP no plexo submucoso de jejuno de ratos e a resposta com o tratamento utilizando quercetina microencapsulada, probiótico (*Bifidobacterium animalis*) e a junção dos dois.

Materiais e Métodos

Obtenção dos grupos de estudo

Os procedimentos com animais foram realizados mediante aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 1126010419 da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizados 40 ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade albinus.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos com 8 ratos cada, sendo eles: controle (C), carcinogênese colorretal (CR), carcinogênese colorretal Quercetina (CQ), carcinogênese colorretal probiótico (CP) e carcinogênese colorretal quercetina probiótico (CQP). Passaram por injeção, via intraperitoneal, com 1,2-dimetilhidrazina (DMH), 40mg/Kg duas vezes por semana por duas semanas (FUKUI et al., 2001). O tratamento com quercetina microencapsulada foi administrado em dosagem de 10mg/Kg por gavagem diariamente. A administração do probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo lactis foi por gavagem com uma solução contendo 5×10^7 UFC no volume adequado ao peso de cada rato (BOZKURT; QUIGLEY; KARA, 2019).

Os animais foram anestesiados com lidocaína (10mg/kg) seguido de superdosagem de tiopental (150 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, o jejuno foi coletado e processado para as técnicas imuno-histoquímicas.

Processamento do Material

Após a realização do processo de imunofluorescência as lâminas foram montadas tendo como meio de montagem glicerol tamponado 10%, sendo armazenadas em seguida a 4°C. As imagens para análise foram capturadas e a análise foram feitas a partir da medida da área em μm^2 de 100 corpos celulares de neurônios por animal, utilizando o programa Image Pro Plus 4®, com total de 800 neurônios por grupo experimental.

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando os softwares Statistica® 8.0 e Graph Pad Prism® 6.0, sendo expressos como média \pm erro padrão. A normalidade dos dados será avaliada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados morfométricos será utilizada a análise de Delineamento em Blocos, seguida de Teste de Fisher. Os dados quantitativos serão analisados por meio de análises de variância One-way (ANOVA), seguidas de Teste de Fisher. Com um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A figura 1 apresenta fotomicrografias obtidas com as técnicas imunohistoquímicas para evidenciação de neurônios VIP-IR (em verde) no plexo submucoso do jejuno dos ratos dos 5 grupos experimentais.

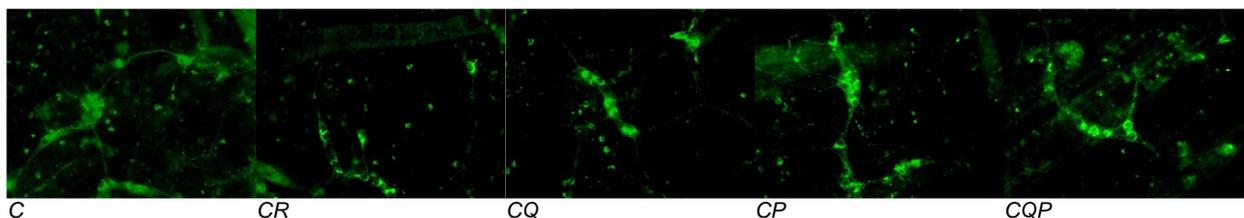


Figura 1: Prancha com fotomicrografias capturadas com objetiva de 40x demonstrando, em verde, marcação para evidenciação de neurônios VIP-IR. Estão representados os grupos C (controle), CR (carcinogênese colorretal), CQ (carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada), CP (carcinogênese colorretal administrado com probiótico *Bifidobacterium animalis subtipo lactis*) e CQP (carcinogênese colorretal administrado com quercetina microencapsulada e probiótico *Bifidobacterium animalis subtipo lactis*).

A figura 2 apresenta o gráfico demonstrando a morfometria de neurônios VIP-IR. Observou-se redução significativa de 48% na média de neurônios VIP-IR no grupo CR em comparação com o grupo C. As administrações utilizadas apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo CR, onde CP apresentou um aumento de 31% e o CQ 41% na média de neurônios VIP-IR. O grupo CQP apontou um aumento de 10% comparando com o grupo CR.

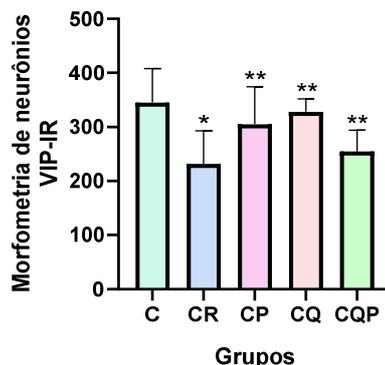


Figura 2: Gráfico demonstrando a morfometria de neurônios VIP-IR de acordo com os grupos experimentais.

Conclusões

A carcinogênese colorretal afetou a população VIP-IR reduzindo o tamanho dos neurônios. Dentre os tratamentos testados, a quercetina microencapsulada (10mg/Kg) administrada de forma isolada apresentou o melhor efeito neuroprotetor ao prevenir redução das células VIP-IR. Adicionalmente os grupos CP e CQP também obtiveram um resultado significativo.

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe por sonhar os meus sonhos junto a mim.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica pela confiança, e por todos os ensinamentos ao longo do ano.

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.

CHENG, L; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. World. **Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 12, p. 2642, 15 dec. 2003.

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.

EKBLAD, E.; BAUER, A. J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. **NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY**, V. 16, N. S1, P. 123–128, ABR. 2004.

FUKUI, M. et al. The tumor-preventing effect of a mixture of several lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. **Oncology Reports**, v. 8, n. 5, p. 1073–8, 1 set. 2001.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de
2022

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acessado em 25 ago. 2021.

WEINBERG, R.A. A biologia do câncer. Porto Alegre: **ARTMED**, 2008.