

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO FÍGADO DE RATOS WISTAR COM CARCINOGENESE COLORRETAL TRATADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA E *Bifidobacterium animalis*

Maria Luiza Melo Sergio (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliana Vanessa Colombo Perles (Orientador), Carla Cristina de Oliveira Bernardo (Coorientadora) E-mail: ra119959@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Morfologia.

Palavras-chave: carcinogênese colorretal; DMH; probiótico.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações morfológicas no fígado de ratos Wistar induzidos a Carcinogênese Colorretal (CCR) pela administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) tratados com quercetina microencapsulada (10mg/kg) e *Bifidobacterium animalis* (5X10⁷UFC), para isso foi utilizado 40 ratos adultos onde foram divididos em 5 grupos com 8 ratos cada, sendo eles: Controle (C), Carcinogênese Colorretal (CR, 4 injeções de DMH 40 mg/kg, por 2 semanas), Carcinogênese Colorretal Quercetina (CQ), Carcinogênese Colorretal Probiótico (CP), Carcinogênese Colorretal Quercetina Probiótico (CQP). Após o período experimental de 20 semanas, os animais foram eutanasiados e os fígados coletados, corados pela técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) e foram realizadas análises da medida das áreas celular, nuclear e citoplasmática, onde foi detectada uma hiperplasia nos hepatócitos no lobo esquerdo dos animais doentes e a quercetina microencapsulada potencializou esse efeito, enquanto que o probiótico apresentou efeito positivo sobre a carcinogênese colorretal induzido pelo DMH.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) se desenvolve por alterações em pólipos pré-cancerosos benignos, que são caracterizados pelo crescimento anormal de células da mucosa intestinal. Em roedores é induzido pela administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), que é um agente pró-carcinógeno, metabolizado no fígado. Sua utilização acarreta na produção de radicais livres, que são responsáveis por causar danos oxidativos ao DNA das células do cólon e do fígado. (CAETANO *et al.*, 2020). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Um exemplo de antioxidante é a quercetina, no qual possui várias vias metabólicas que interagem para tratar o câncer (HA-NA *et al.*, 2007). Além dos antioxidantes, outra classe de compostos é utilizada como inibidor de reações oxidativas por agentes alquilantes, são elas os probióticos, como a *Bifidobacterium*, suas cepas possuem efeitos protetores e preventivos na composição da microbiota

colônica e podem ter impacto na regulação epigenética do CCR (LEE, Y., KANG, C., 2022). Sendo assim, torna-se interessante um estudo que avalie a interação desses compostos em modelo animal de câncer, como o CCR e os possíveis efeitos na arquitetura morfológica hepática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos neste estudo foram aprovados mediante certificado nº 1126010419, pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizados 40 ratos adultos machos, da linhagem Wistar, divididos em 5 grupos (n=8): Controle (C), Carcinogênese Colorretal (CR), Carcinogênese Colorretal Quercetina (CRQ, 10 mg/Kg, v.o.), Carcinogênese Colorretal Probiótico (CRP, 5×10^7 UFC, v.o.), Carcinogênese Colorretal Quercetina e Probiótico (CRQP). A indução da carcinogênese colorretal foi realizada com 4 injeções de DMH (40 mg/kg, ip) por 2 semanas. Após o período experimental de 20 semanas, os animais foram eutanasiados e os fígados coletados, fixados e incluídos em parafina para rotina histológica de HE usando cortes semi seriados de 5 μm de espessura. Foram obtidas imagens por microscopia óptica, para a mensuração das áreas (μm^2) celulares e do núcleo dos hepatócitos, além da área citoplasmática, determinada pela diferença entre os valores da área celular e nuclear. Por fim os resultados foram submetidos ao delineamento em blocos com pós-teste de Fisher.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 apresenta os dados da avaliação morfométrica dos hepatócitos do lobo esquerdo nos diferentes grupos avaliados. Foi detectado um aumento significativo ($p < 0,0001$) em todas as áreas analisadas nos grupos CR, bem como dos grupos CQ, CQP e CP, em relação ao grupo C. Também é possível observar um aumento ($p < 0,0001$) em todas as áreas analisadas nos grupos CQ e CQP em relação ao CR, em contrapartida nota-se uma redução ($p < 0,0001$) do grupo CP em relação ao CR.

A tabela 02 apresenta os dados da avaliação morfométrica dos hepatócitos do lobo direito nos diferentes grupos avaliados. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,0001$) apenas na área do núcleo no grupo CR em relação ao grupo C. Houve aumento ($p < 0,0001$) de todas as áreas analisadas dos grupos CQ e CQP em relação ao grupo C, porém houve redução ($p < 0,0001$) na área do corpo celular e do citoplasma do grupo CP em relação ao grupo C. Observa-se um aumento ($p < 0,0001$) em todas as áreas analisadas nos grupos CQ e CQP em relação ao grupo CR, em contrapartida, foi observada uma redução desses parâmetros no grupo CP em relação ao grupo CR.

Tabela 1: Média \pm EPM (n = 8/ grupo) das áreas (μm^2) celular, nuclear e citoplasmática dos hepatócitos do lobo esquerdo, nos seguintes grupos: controle (C), câncer colorretal (CR), câncer colorretal administrado com quercetina (CQ), câncer colorretal administrado com quercetina e probiótico (CQP), câncer colorretal administrado com probiótico (CP).

LE	C	CR	CQ	CQP	CP
Área do corpo celular (μm^2)	159.27 \pm 0,74 ^a	187.35 \pm 1,46 ^b	258.62 \pm 2,10 ^c	200.07 \pm 1,51 ^d	171.16 \pm 0,91 ^e
Área do núcleo (μm^2)	40.31 \pm 0,19 ^a	44.68 \pm 0,40 ^b	54.25 \pm 0,42 ^c	47.11 \pm 0,36 ^d	41.47 \pm 0,30 ^e
Área do citoplasma (μm^2)	118.95 \pm 0,71 ^a	142.66 \pm 1,24 ^b	204.36 \pm 1,91 ^c	152.96 \pm 1,34 ^d	129.68 \pm 0,83 ^e

Médias seguidas por letras diferentes (a, b, c, d, e) na mesma linha, são significativamente diferentes ($p < 0,0001$) no pós-teste de Fisher.

Tabela 2: Média \pm EPM ($n = 8/$ grupo) das áreas (μm^2) celular, nuclear e citoplasmática dos hepatócitos do lobo direito, nos seguintes grupos: controle (C), câncer colorretal (CR), câncer colorretal administrado com quercetina (CQ), câncer colorretal administrado com quercetina e probiótico (CQP), câncer colorretal administrado com probiótico (CP).

LD	C	CR	CQ	CQP	CP
Área do corpo celular (μm^2)	179.92 \pm 1,15 ^a	183.48 \pm 1,54 ^a	245.49 \pm 1,86 ^b	212.10 \pm 1,68 ^c	160.15 \pm 0,85 ^d
Área do núcleo (μm^2)	42.85 \pm 0,28 ^a	47.44 \pm 0,44 ^b	54.87 \pm 0,41 ^c	51.51 \pm 0,46 ^d	42.50 \pm 0,24 ^a
Área do citoplasma (μm^2)	137.06 \pm 1,04 ^a	136.03 \pm 1,29 ^a	190.62 \pm 1,68 ^b	160.59 \pm 1,45 ^c	117.64 \pm 0,79 ^d

Médias seguidas por letras diferentes (a, b, c, d) na mesma linha, são significativamente diferentes ($p < 0,0001$) no pós-teste de Fisher.

O CCR induzido pelo DMH, no modelo experimental utilizado, ocasionou uma hipertrofia de hepatócitos no lobo esquerdo, enquanto que no lobo direito foi detectado apenas um aumento na área nuclear. A hiperplasia observada indica uma maior atividade celular que pode estar relacionada a diferentes fenômenos, como síntese, proliferação celular ou apoptose. Em um estudo realizado com ratos wistar utilizando DMH (40mg/kg, administrados por via subcutânea 4 injeções em 2 semanas) na indução do CCR foi observado alterações de curto prazo (24h após a última administração), como índices aumentados de proliferação celular, apoptose e focos únicos positivos para a enzima pré-neoplásica glutationa S-transferase hepática (GST). Por outro lado, em médio prazo (22 semanas), o modelo levou a um elevado número de focos de criptas aberrantes colônicas pré-neoplásicas, mas poucos focos pré-neoplásicos positivos para glutationa S-transferase hepática (GST-P) (CAETANO *et al*, 2020). Os fenômenos observados pelos autores, tanto a curto e médio prazo, poderiam estar relacionados a uma possível hiperplasia hepática observada em nosso estudo.

Ainda, no estudo de curto prazo, foi observado um aumento nos níveis de hidróperóxido lipídico (LOOH) e diminuição da atividade da catalase, glutationa peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) no fígado dos ratos, demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo nos danos hepáticos gerados pelo DMH, por isso em nosso estudo empregamos uma substância com atividade antioxidante, o flavonóide quercetina (CAETANO *et al*, 2020). No presente estudo a administração da quercetina provocou uma hipertrofia hepática mais acentuada do que o grupo doente.

Em um estudo que avaliou efeito da quercetina em fígado de ratos administrados com DMH, em diferentes concentrações (0,2 e 2% em sua forma livre) identificou que 24h após a última administração de DMH a suplementação com quercetina (0,2 e 2%) foi capaz de diminuir a formação de 8-hidroxiguanina (8-OH-Gua) que estava aumentada no fígado dos animais doentes, sem, no entanto prevenir a evolução da carcinogênese colorretal em animais que foram sacrificados 12 semanas após

indução do CCR. Mostrando que a quercetina pode ter efeitos contraditórios nesse modelo. (HA-NA et al, 2007).

Por outro lado, o uso de probiótico preveniu a hipertrofia hepática em animais doentes. Em um estudo que avalia o estresse oxidativo em hepatócitos de camundongos, observou-se que os probióticos *Lactobacillus lactis* e *Bifidobacterium bifidum* exercem um efeito antioxidante e são eficazes na melhoria do estresse oxidativo (LEE, Y., KANG, C., 2022). Confirmando os resultados encontrados, indicando que o probiótico utilizado, *Bifidobacterium animalis*, possui ação protetora e preventiva sobre os impactos causados pela carcinogênese colorretal. Por fim, observa-se que a utilização da quercetina mais o probiótico prevaleceram os efeitos da quercetina.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a indução da carcinogênese colorretal por DMH impactou somente o lobo esquerdo levando a uma hiperplasia dos hepatócitos, o antioxidante utilizado, quercetina, em sua forma microencapsulada, exacerbou a hiperplasia causada pelo DMH, enquanto que o probiótico apresentou efeitos positivos, tendo ação preventiva na hiperplasia de células hepáticas de ratos quimicamente induzidos a carcinogênese colorretal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientadora Juliana Vanessa Colombo Perles e à coorientadora Carla Cristina de Oliveira Bernardo, pelo auxílio e aprendizado, ao CNPq pela concessão da bolsa e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

CAETANO, B. F. R., et al. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute responses to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. **Elsevier**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427420301144?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2023.

HA-NA, N., et al. Dietary quercetin inhibits 1,2-dimethylhydrazine–induced liver DNA damage without altering colon DNA damage or precancerous lesion formation in rats **Elsevier**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531707001856>. Acesso em: 20 ago. 2023.

LEE, J. Y.; KANG, C. H. Probiotics Alleviate Oxidative Stress in H₂O₂-Exposed Hepatocytes and *t*-BHP-Induced C57BL/6 Mice. **Microorganisms**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8877580/>. Acesso em 20 ago. 2023.