

ANÁLISE DA MORFOMETRIA DE VARICOSIDADES VIP-IR DA MUCOSA INTESTINAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO CÂNCER COLORRETAL ADMINISTRADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA E *Bifidobacterium animalis*

Isadora Goulart Garcia (PIC/UEM), Lucas Casagrande, Carla Cristina de Oliveira Bernardo, Sabrina Silva Sestak (Coorientadora), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora). E-mail: jnzanoni@uem.br.

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

Morfologia – Histologia

Palavras-chave: Antioxidante; Probiótico; Íleo.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfometria de varicosidades VIPérgicas na mucosa intestinal de ratos Wistar submetidos à carcinogênese administrados com quercetina microencapsulada e *Bifidobacterium animalis*. Foram utilizados 30 ratos machos (50 dias) distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=5): Controle (C), Câncer Colorretal (CR), Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada (CQ), Câncer Colorretal administrado com probiótico (CP) e Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada e probiótico. A carcinogênese foi induzida por 1,2-dimetil-hidrazina (DMH). A administração com quercetina microencapsulada (10 mg/kg/dia) e o probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo *lactis* (5×10^7 UFC/dia) foram realizadas por gavagem. Houve um aumento na morfometria das varicosidades VIPérgicas nos grupos CQ e CQP em comparação com o CR. O grupo CP preveniu o aumento em comparação com o CR. O desenvolvimento da carcinogênese no cólon refletiu no sistema nervoso entérico do íleo, aumentando a neurotransmissão VIPérgica.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia que acomete o intestino grosso, cólon e/ou reto. O desenvolvimento da carcinogênese acarreta efeitos deletérios como a inflamação e o estresse oxidativo os quais promovem alterações na mucosa intestinal, como neuro degeneração do Sistema Nervoso Entérico (SNE), que é uma rede de neurônios e células glias entéricas responsáveis pelo funcionamento do trato gastrointestinal (FURNESS, 2012).

Os neurônios entéricos controlam diversas funções na mucosa intestinal, por meio da liberação de neuropeptídeos. Um exemplo, é o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), relacionado com o controle da integridade da barreira epitelial estimulando a

contração das células musculares lisas, secreções pancreáticas e fluxo sanguíneo gastrointestinal (COLTURATO; DA SILVA; ARAUJO, 2002).

As substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias como a quercetina e o probiótico *Bifidobacterium animalis*, atenuam os efeitos deletérios da inflamação e estresse oxidativo, gerado pela carcinogênese no SNE e na mucosa intestinal. O objetivo do projeto foi avaliar a morfometria de varicosidades VIPérgicas na mucosa intestinal de ratos Wistar submetidos à carcinogênese tratados com quercetina microencapsulada e *Bifidobacterium animalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos grupos e eutanásia

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar com 50 dias de idade, aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n=5): Controle (C), Câncer Colorretal (CR), Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada (CQ), Câncer Colorretal administrado com probiótico (CP) e Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada e probiótico (CQP). A indução da carcinogênese colorretal foi realizada com injeção intraperitoneal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 40mg/Kg duas vezes por semana durante 2 semanas. A administração da quercetina microencapsulada foi na dosagem de 10 mg/kg/dia por gavagem. A administração do probiótico *Bifidobacterium animalis* subtipo *lactis*, ocorreu por meio de gavagem de uma solução contendo 5×10^7 UFC/dia. Ambas as administrações tiveram início após a indução da carcinogênese com DMH.

Após o período experimental de 16 semanas os animais foram eutanasiados. Posteriormente a celiotomia, foram retirados os segmentos intestinais (íleo) e destinados à técnica de imuno-histoquímica. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios éticos e sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº 1126010419.

Processamento da amostra e imuno-histoquímica

O íleo foi aberto ao longo da borda mesentérica, cuidadosamente lavado com PBS (0,1 M, pH 7,4) e fixado em Zamboni por 18h a 4°C. Seguido de lavagem em PBS, crioproteção, inclusão em O.C.T e armazenado à -80 C°. Cortes histológicos de 10 µm foram seccionados utilizando criostato, e aderidos a lâminas histológicas. Os cortes histológicos passaram por processo de imuno-histoquímica utilizando anticorpo primário (rabbit anti-VIP) e secundário (Alexa fluor 488 - Donkey anti-rabbit).

Análise

A análise da área (µm²) de 300 varicosidades por animal foram mensuradas utilizando imagens capturadas da mucosa ileal com objetiva de 40X. Para a análise foi utilizado o software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Os dados foram

submetidos à análise estatística de delineamento em blocos, seguido de Teste de Fisher, utilizando-se o *software* Statística 8.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

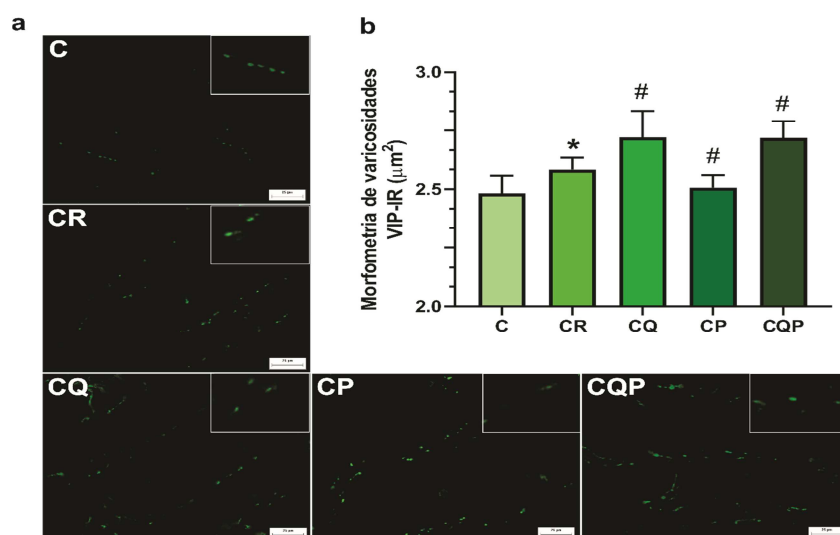


Figura 1: Morfometria de varicosidades VIP-IR na mucosa do íleo. a) Fotomicrografia evidenciando varicosidades VIP-IR na mucosa do íleo. b) Morfometria de varicosidades VIP-IR (µm²). Barra da escala 25µ (C) Controle; (CR) Carcinogênese colorretal; (CQ) Carcinogênese colorretal suplementado com quercetina; (CP) Carcinogênese colorretal suplementado com probiótico e (CQP) Carcinogênese colorretal suplementado com quercetina e probiótico. Valores expressos com média = desvio padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao C; # $p < 0,05$ quando comparado ao CR. $n = 6$ animais por grupo.

Os animais com carcinogênese colorretal apresentaram um aumento de 4,5% na morfometria de varicosidades VIP-IR quando comparado ao grupo C (CR vs C; $p < 0,001$; Figura 1). A suplementação com a quercetina promoveu um aumento de 5,2% em comparação com o grupo doente (CR vs CQ; $p < 0,001$; Figura 1). A suplementação com probiótico *Bifidobacterium animalis* isolado preveniu o aumento da morfometria em comparação com o grupo CR, demonstrando redução de 3% (CR vs CP; $p = 0,01$; Figura 1). Ambas as suplementações, grupo CQP, induziu um aumento de 5% comparado ao grupo doente (CQP vs CR; $p < 0,001$; Figura 1). O aumento na morfometria de varicosidades VIP-IR sugere um aumento da expressão deste peptídeo na mucosa intestinal. Já foi evidenciado que a suplementação com quercetina induz indiretamente a neuroplasticidade em neurônios VIPérgicos (MARTINS-PERLES et al., 2020), A suplementação com o probiótico *Bifidobacterium animalis* preveniu o aumento delas apresentando efeitos contrários a quercetina. A ingestão de probiótico exerce benefícios para a saúde melhorando a barreira intestinal (KHALEEL; KHALAF, 2023). O maior consumo de produtos lácteos, contendo *Bifidobacterium*, estão relacionados a uma menor incidência de CCR, uma vez que reduz os danos ao DNA induzidos por

carcinógenos químicos na mucosa colônica de ratos, como no caso do carcinógeno DMH (RAFTLER,2003.)

CONCLUSÕES

O desenvolvimento da carcinogênese no cólon refletiu no sistema nervoso entérico do íleo, aumentando a neurotransmissão VIPérgica. A administração com quercetina microencapsulada e *Bifidobacterium animalis* também exerceram efeitos neuromoduladores de VIP no íleo frente a carcinogênese colorretal.

REFERÊNCIAS

COLTURATO, M. T.; DA SILVA, C. PG; ARAUJO, E. B. Marcação do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) com radioiodo utilizando diferentes agentes oxidantes em substituição eletrofílica. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. vol.19, n1, p.3-8, 2002. Disponível em: <http://www.rbejournal.periodikos.com.br/article/5889fb725d01231a018b462a>. Acesso em: 22 de Agosto de 2023.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012. Disponível em <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.32>. Acesso em 22 de Agosto de 2023.

KHALEEL, S. M.; SHANSHAL, S. A.; KHALAF, M. M.. The Role of Probiotics in Colorectal Cancer: A Review. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36622515/>. Acesso em: 22 de Agosto de 2023.

MARTINS-PERLES, J. V. C. et al. Quercetin increases bioavailability of nitric oxide in the jejunum of euglycemic and diabetic rats and induces neuronal plasticity in the myenteric plexus. **Autonomic Neuroscience**, v. 227, p. 102675, 2020. Disponível em [https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702\(20\)30109-0/fulltext](https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702(20)30109-0/fulltext). Acesso em: 22 de Agosto de 2023.

RAFTER, Joseph. Probiotics and colon cancer. **Best practice & research. Clinical gastroenterology** vol. 17,5 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691803000568?via%3Di> hub. Acesso em 22 de Agosto de 2023.