

AValiação QUANTITATIVA DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS A CD68 NA MUCOSA INTESTINAL DO ÍLEO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO CâNCER COLORRETAL ADMINISTRADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA E *Bifidobacterium animalis*

Júlia Miwa Komagome (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Thalita Camilo da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lucas Casagrande, Carla Cristina de Oliveira Bernardo, Sabrina Silva Sestak (Coorientadora), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientador).
E-mail: jnzanoni@uem.br.

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

Ciências Biológicas / Morfologia

Palavras-chave: antioxidante; probiótico; inflamação.

RESUMO

O câncer colorretal é uma neoplasia com grande incidência mundial. O objetivo deste trabalho foi analisar a densidade de macrófagos CD68 imunorreativos na mucosa do íleo de ratos Wistar quimicamente induzidos ao câncer colorretal administrados com quercetina microencapsulada e *Bifidobacterium animalis*. Foram utilizados 25 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 (CQP). 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. O período total de experimento foi de 16 semanas. Observamos aumento na densidade de macrófagos nos animais doentes, atenuado com a administração com quercetina microencapsulada evidenciando sua propriedade anti-inflamatória. Nesse parâmetro, o probiótico de forma isolada não demonstrou nenhum efeito significativo.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) abrange os tumores que iniciam no cólon e reto, e encontra-se na terceira posição entre os mais incidentes do mundo. No Brasil, o número de novos casos para o triênio de 2023-2025, é de \cong 47 mil casos de CCR/ano (INCA, 2023). O CCR desenvolve-se a partir de alterações no epitélio colônico com conseqüente proliferação anormal de células e formação de pólipos, que se projetam em direção a luz intestinal, podendo progredir a adenomas ou adenocarcinomas. O surgimento do CCR está ligado principalmente ao estilo de vida (sedentarismo, dieta, tabagismo e alcoolismo), obesidade e envelhecimento. Em

modelos animais, o CCR é frequentemente induzido pelo 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) que promove hipermetilação do DNA das células epiteliais colônicas.

O estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos na origem e progressão do CCR. A quercetina é um flavonoide presente em muitos vegetais e frutas. Este composto, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênicas e antimicrobianas. A suplementação com probióticos representam uma nova opção de tratamento e prevenção do CCR. A interação dos probióticos com a microbiota intestinal auxilia na resposta imune e inflamatória, inibição da formação de células tumorais e conversão de substâncias pré-carcinogênicas.

A mucosa intestinal, especialmente do íleo, conta com a presença de inúmeras células do sistema imune, formando uma barreira de proteção entre o organismo e o ambiente externo. Os macrófagos, são células imunes presentes na lâmina própria da mucosa intestinal. São fagócitos mononucleares importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas, liberam quimiocinas e citocinas que podem atrair e ativar outras células imunes para o local da infecção, intensificando a resposta inflamatória. Em situações patológicas os macrófagos atuam na regeneração e manutenção do epitélio e promovem o recrutamento e a ativação de neutrófilos para o intestino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos grupos e eutanásia

Foram utilizados 25 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 feita com injeção intraperitoneal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), 40mg/Kg, duas vezes por semana durante 2 semanas. A administração da quercetina microencapsulada 10 mg/kg/dia foi realizada 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 depois da indução da carcinogênese com DMH. Após o período experimental de 16 semanas os animais foram eutanasiados. Logo após 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 n° 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

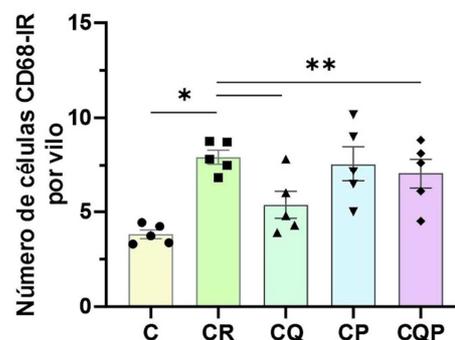
cortes histológicos passaram por processo de imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-CD68 para identificação de macrófagos na mucosa.

Análise

A contagem de macrófagos CD68-IR foi realizada na região da lâmina própria de 30 vilos por animal, em imagens capturadas com objetiva de 10X. A análise foi realizada utilizando o *software* de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29. Resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram submetidos à análise estatística de delineamento em blocos, seguido de Teste de Fisher, utilizando o *software* Statistica 8.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na densidade de macrófagos CD68-IR observa-se um aumento de 108% dessas células no grupo doente (CR vs C; $p < 0,0001$; Figura 1). A administração de quercetina microencapsulada reduziu significativamente o recrutamento de células imunes CD68-IR: 32% no grupo CQ e 11% no grupo CQP (vs CR; $p < 0,01$). Enquanto que a administração do probiótico *Bifidobacterium animalis* de forma isolada (grupo CP) não apresentou diferença significativa em relação com grupo CR



($p = 0,29$).

Figura 1. Número de células CD68-IR por vilos. (C) Controle, (CR) Câncer Colorretal, (CQ) Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada, (CP) Câncer Colorretal administrado com probiótico e (CQP) Câncer Colorretal administrado com quercetina microencapsulada e probiótico. Valores expressos com média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C; ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CR. $n=5$ animais por grupo.

Neste estudo observamos um provável quadro inflamatório e estresse oxidativo sistêmico gerado pela instalação do processo de carcinogênese. O aumento expressivo de macrófagos nos animais doentes (grupo CR) já era esperado, considerando que durante a carcinogênese há liberação de mediadores inflamatórios e citocinas que contribuem na ativação e migração dos macrófagos. Pesquisas associando os macrófagos com o CCR expõem o efeito dessas células na associação e progressão do tumor (HE *et al.*, 2009).

O aumento demonstra uma possível resposta à inflamação e ao estresse oxidativo na tentativa de manutenção da homeostase e proteção da mucosa dos efeitos

deletérios dos mesmos. Por outro lado, a ativação dos macrófagos pode gerar espécies reativas de O₂ e N₂, impulsionando a inflamação instalada e prejudicando a mucosa intestinal (PIECHOTA *et al.*, 2014). Outrossim, a infiltração dos macrófagos pode lesar a barreira intestinal, afetando a permeabilidade e a proteção contra os antígenos (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Doenças inflamatórias, como a doença de Crohn, estão solidificadas quanto aos danos na barreira intestinal devido aos radicais livres e inflamação, pela ativação excessiva dos macrófagos (PIECHOTA *et al.*, 2014).

Papel anti-inflamatório e imuno regulador da quercetina refletiu na diminuição populacional dos macrófagos nos animais tratados, executando um papel na diminuição de expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e interleucina (IL-6), conseqüentemente há uma diminuição na atividade quimiotática sob os macrófagos (SATO *et al.*, 2020).

CONCLUSÕES

O desenvolvimento da carcinogênese colorretal no cólon refletiu no íleo, aumentando a densidade de macrófagos na mucosa. A suplementação da quercetina microencapsulada reduziu expressivamente o recrutamento dessas células imunes, evidenciando sua propriedade anti-inflamatória. O probiótico de forma isolada, neste estudo, não demonstrou efeitos significativos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida e a minha orientadora e coorientadora pelos ensinamentos e suporte para realização do projeto.

REFERÊNCIAS

HE, X.X., *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Colorectal Cancer. **Molecular medicine**, v. 15, p. 1-10, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19009023/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de cólon e reto**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios/cancer-de-colon-e-reto>. Acesso em: 13 de agosto de 2023.

PIECHOTA, A; FICHNA, J. The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, p. 605-620, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24798211/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

SÁNCHEZ, F; ROMERO-CALVO, I; MASCARAQUE, M; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. **Inflammatory bowel**

diseases, v. 20, n. 12, p. 2394-2404, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25222662/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

SATO, S; MUKAI, Y. Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity. **Journal of inflammation research**, p. 421-431, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32848440/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.