

RATOS CAQUÉTICOS ADMINISTRADOS COM MELATONINA 10 mg/kg: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NITRÉRGICOS

Larissa Celine Violin (PIC/UEM), Gabriel Uliano Cerci, Fabiana Galvão da Motta Lima (Coorientadora), Maysa Pacheco Alvarez da Silva, Lídia Rodrigues Cicero, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora).
E-mail: jnzanoni@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Morfologia/Histologia.

Palavras-chave: câncer; sistema nervoso entérico; melatonina.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar a densidade populacional da subpopulação nitrérgica do plexo mioentérico durante o desenvolvimento da caquexia e sob a administração de melatonina 10 mg/kg. 20 ratos foram distribuídos em 4 grupos: controle (C), portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (A), controle administrados com melatonina 10 mg/kg (CM) e portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas administrados com melatonina 10 mg/kg (AM). A indução do câncer foi feita com 1×10^7 células da linhagem A549. A melatonina foi dada diariamente, por gavagem. Ratos com índice de caquexia maior que 10% foram considerados caquéticos e a quantificação foi expressa em neurônios/cm². Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. No grupo A, 3 animais apresentaram IC > 10% e a média obtida para o grupo foi de 8,68%. Já para o grupo AM apenas 1 animal apresentou IC acima de 10% e a média do grupo foi de 7,79%. Houve uma redução de 29,48% na densidade nitrérgica mioentérica comparando A com AM. Conclui-se que, a adição de outras análises ajudarão a esclarecer o comportamento plástico da subpopulação nitrérgica mioentérica frente à administração de melatonina.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença causada pelo crescimento deflagrado por mutações no DNA, afetando os genes estimuladores do crescimento das células. A divisão e a morte de uma célula normal são mecanismos regulados por circuitos genéticos. Em uma célula cancerígena, esses circuitos são rompidos, e a célula não consegue parar de crescer (Mukherjee, 2010). A carcinogênese é um processo que, em geral, acontece lentamente e resulta de efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos externos e características individuais, como a predisposição genética (INCA, 2020). De acordo com uma estimativa feita pelo Global Cancer Observatory, em 2020, a incidência de novos cânceres no continente americano foi de 4,03

milhões e prevê o surgimento de 5,96 milhões de novos casos até o ano de 2040 (Ferlay *et al.*, 2020).

Uma das mais importantes comorbidades do câncer é a caquexia. Em 2011, um consenso internacional definiu a caquexia do câncer como: “uma síndrome multifatorial caracterizada pela perda contínua de massa muscular esquelética (com ou sem perda de massa gorda), que não pode ser totalmente revertida pelo suporte nutricional convencional e leva ao comprometimento funcional progressivo” (Fearon *et al.*, 2011). A manutenção da função gastrointestinal é crítica no manejo de comorbidades em pacientes com câncer, que apresentavam distúrbios digestivos e de motilidade associados ao câncer, como anorexia, disfagias, constipação, dor abdominal e obstrução intestinal (DiBaise; Quiqley, 1998). Nessas distúrbios, o sistema nervoso entérico (SNE) apresentava algum grau de comprometimento, o que pode levar à neuropatia e outras consequências (Vicentini *et al.*, 2016). O SNE é composto principalmente por células da glia entérica (CGE) e por neurônios, que controlam a motilidade gastrointestinal, secreção, absorção de nutrientes, o fluxo sanguíneo e processos inflamatórios (Furness, 2012). Todavia, é organizado em forma de plexos (redes), sendo o submucoso e o mioentérico os dois principais plexos ganglionares.

Um neurotransmissor importante encontrado no SNE é o óxido nítrico (NO), que possui papel inibitório dos músculos gastrointestinais, como em casos de reflexos para a acomodação no intestino. É produzido por uma enzima constitutiva de localização neuronal central e periférica, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Sanders *et al.*, 1992; Stark *et al.*, 1992). Várias linhas de evidência indicam que o NO também pode ter efeitos citotóxicos e citoprotetores (Rivera *et al.*, 2011; Wiley, 2007). O estudo de Vicentini *et al.* (2017) demonstrou aumento da produção de NO e da expressão da enzima nNOS, relacionando estresse oxidativo e neurodegeneração em modelo experimental de caquexia associada ao câncer. Estudos anteriores destacaram o uso de antioxidantes na proteção aos danos oxidativos e inflamatórios do câncer e da síndrome da caquexia, como por exemplo a L-glutamina (Todorova *et al.*, 2004; Vicentini *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2016). Recentemente, a melatonina ganhou destaque por apresentar forte ação antioxidante e promover grande limpeza de radicais livres, podendo ser promissora na proteção aos danos oxidativos e inflamatórios do câncer (Ferlazzo *et al.*, 2020).

A melatonina tem envolvimento na atividade antitumoral, antioxidante e imunomodulatória (Kim *et al.*, 2014). É um hormônio indoleamina, secretado principalmente pela glândula pineal e sintetizado a partir de seu precursor triptofano. Como mencionado anteriormente, a melatonina é um forte agente antioxidante podendo proteger contra danos no DNA, seja pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou pela estimulação do sistema de reparo do DNA e seus mecanismos (aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, inibição de enzimas pró-oxidativas, aumento da atividade de outros agentes antioxidantes e proteção e ativação de enzimas antioxidantes) (Reiter *et al.*, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho é analisar a utilização da melatonina na síndrome da caquexia associada ao câncer e sua atuação na neurotransmissão nitrérgica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos com animais foram realizados seguindo os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 8812040521). Foram utilizados 20 ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade albinus. Eles foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, contendo 5 animais cada: Controle (C), controle administrado com melatonina 10 mg/kg (CM), portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (A) e portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas administrados com melatonina 10 mg/kg. A indução do tumor foi feita por meio da inoculação de uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ células tumorais de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (linhagem A549) injetada no flanco direito. A administração da melatonina foi realizada através de gavagem em cada animal, diariamente, com a dose sendo calculada pelo peso de cada animal a cada dois dias.

Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e o jejuno proximal foi coletado e dissecado para a realização das imuno-histoquímicas para neurônios do plexo mioentérico imunorreativos ao nNOS. A determinação do estado caquético foi realizada por meio do índice de caquexia (IC) (Guarnier *et al.*, 2010). A quantificação foi realizada por amostragem na região intermediária, no plexo mioentérico em 30 campos e expressa em neurônios por cm². Os resultados foram submetidos a delineamento em blocos e pós-teste de Fisher com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo A, 3 animais apresentaram IC > 10% e a média obtida para o grupo foi de 8,68%. Já para o grupo AM, apenas 1 animal apresentou IC acima de 10% e a média do grupo foi de 7,79%. Os resultados encontrados na quantificação de neurônios nitrérgicos foram: não houve diferenças significativas quando comparados os grupos C vs. A e C vs. AM ($p < 0,05$). Houve uma redução de 29,48% comparando A com AM ($p < 0,001$). Os resultados estão descritos na figura 1.

Os resultados demonstram que o desenvolvimento da caquexia não foi uniforme entre todos os animais. Em relação a densidade da subpopulação de neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico, Storr e colaboradores (2002) encontraram que a melatonina inibe a enzima óxido nítrico sintase no sistema nervoso entérico em experimentos *in vitro*, porém mais análises são necessárias para confirmar o mesmo comportamento em análises *in vivo*.

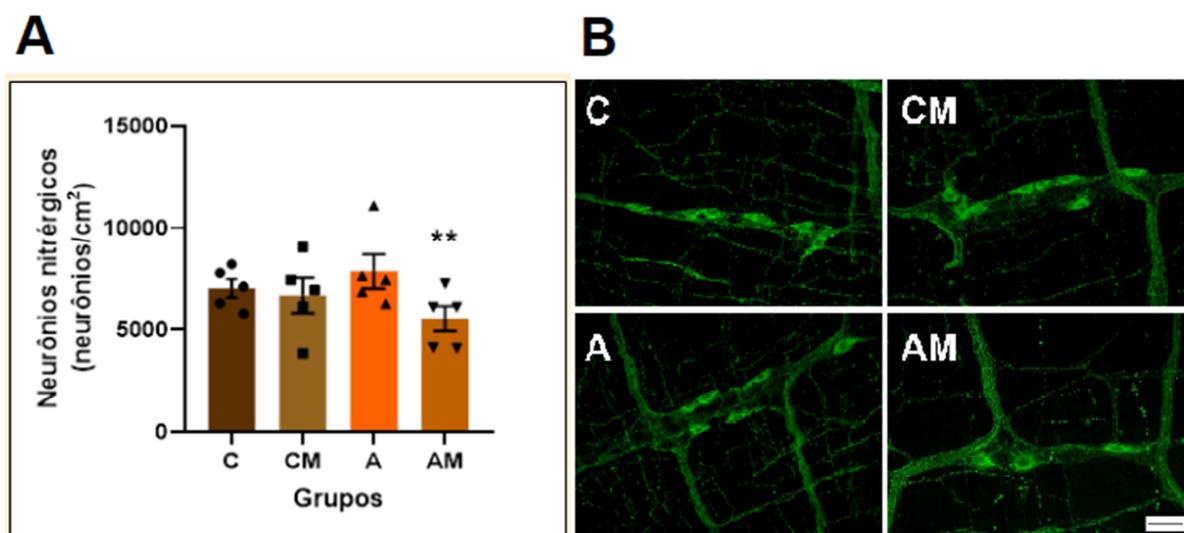


Figura 1 – Quantificação de neurônios nitrérgicos no plexo mioentérico, em neurônios/cm² (A) e fotomicrografias representativas da imunomarcação (B). Grupos: controle (C), controle administrado com melatonina 10 mg/kg (CM), portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (A) e portadores de carcinoma pulmonar de células não-pequenas administrados com melatonina 10 mg/kg (AM). Barra de calibração: 50 µm. ** indica diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo AM.

CONCLUSÕES

O uso de mais animais e a adição de outros tipos de análise ajudarão a esclarecer o comportamento plástico da subpopulação nitrérgica mioentérica frente à administração de melatonina.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.; KIM, S.; CHENG, H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. **Springer Science**. v.198, p.897-907, 2020.

FERLAY, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2022.

FERLAZZO, N. *et al.* Is melatonin the cornucopia of the 21st century? **Antioxidants**. v.9, n.1088, p.1-29, 2020.

GUARNIER, F. A. *et al.* Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**. v.42, n.6, p.950-958, 2010.

REITER, R. J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**. v.61, p.253–278, 2016.