

RATOS COM CÂNCER ADMINISTRADOS COM MELATONINA 10 mg/kg: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE VARICOSIDADES IMUNORREATIVAS AO VIP NA MUCOSA INTESTINAL

Júlia Miwa Komagome (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lídia Rodrigues Cicero (Coorientadora), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora). E-mail: jnzanoni@uem.br.

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

Ciências Biológicas / Morfologia

Palavras-chave: Câncer; jejuno; antioxidante

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial e o seu desenvolvimento envolve inflamação sistêmica e estresse oxidativo. O objetivo do trabalho foi investigar se o efeito do tratamento com a melatonina 10 mg/kg é capaz de prevenir as possíveis alterações na área de varicosidades imunorreativas ao VIP+ na mucosa intestinal de ratos induzidos ao carcinoma pulmonar de células não pequenas, linhagem A549. Foram utilizados 28 ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro diferentes grupos, contendo 7 animais cada, sendo: controle (C), animais controle administrados com melatonina 10 mg/kg (CM), animais inoculados com células tumorais A549 (A) e animais inoculados com células tumorais A549 administrados com melatonina 10mg/kg (AM). Após esse período, os animais foram eutanasiados e jejuno foi coletado para a realização da técnica de imuno-histoquímica para marcação das varicosidades imunorreativas ao VIP+. Neste estudo, observamos diminuição da varicosidades no grupo CM comparado ao grupo C. Não houve diferenças significativas entre o grupo C e o A, bem como entre o grupo AM comparado ao A. Sendo assim, no presente modelo de câncer, o tratamento com melatonina não alterou as varicosidades VIP+, mas por outro lado foi observado o possível efeito pró-oxidante da melatonina nos animais saudáveis.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial que tem como origem uma mutação genética e é caracterizada pelo crescimento desordenado de células, podendo levar a metástases. No Brasil, para cada ano do triênio de 2023-2025 haverá 704 mil novos casos de câncer (INCA, 2022). Essa enfermidade causa inflamação sistêmica pela produção de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, ativam vias de produção de radicais livres levando a um desbalanço entre a produção e eliminação, feito pelos antioxidantes, estado denominado de estresse oxidativo. Esse estado leva a danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas causando morte celular e afetando todo o organismo. O estresse oxidativo e a inflamação podem afetar a função gastrointestinal, onde o sistema nervoso entérico (SNE) e as células da mucosa

intestinal podem ser afetados e resultar em neuropatias e outras complicações (SESTAK., *et al* 2024).

O SNE é formado por dois plexos: Mioentérico (*Auerbach*) e submucoso (*Meissner*). Estes são responsáveis pelo controle da motilidade, secreção, proliferação, absorção e pelo sistema imunológico intestinal. Alguns neurônios do SNE secretam e liberam o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que tem papel na neurotransmissão inibitória, age no controle da proliferação, secreção epitelial, aumento da produção de muco e exerce funções protetoras da barreira intestinal. Além disso, possui ação anti-inflamatória, possuindo potencial terapêutico (VERGNOLLE; CIRILLO, 2018).

A melatonina é um hormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal e seu uso na forma exógena possui efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos (BELLAPART; BOOTS, 2012). Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar se o efeito do tratamento com a melatonina 10 mg/kg é capaz de prevenir as possíveis alterações na área de varicosidades imunorreativas ao VIP+ na mucosa intestinal de ratos inoculados com células de carcinoma pulmonar de células não pequenas, linhagem A549.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos grupos de estudo e eutanásia

Foram utilizados 28 ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) e com a faixa de peso de 175-185g foram disponibilizados para o período experimental com duração de 14 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro diferentes grupos, contendo 6 animais cada, sendo: grupo controle (C), animais controle administrados com melatonina 10 mg/kg (CM), animais inoculados com células tumorais A549 (A) e animais inoculados com células tumorais A549 administrados com melatonina 10mg/kg (AM). Todos os procedimentos realizados neste estudo 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 8812040521. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e coletado o jejuno para a imuno-histoquímica.

Indução do carcinoma de células não pequenas e tratamento

Cada animal dos grupos A e AM sofreram a indução do tumor por meio da inoculação de uma suspensão de células tumorais de carcinoma pulmonar contendo $1,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis em 0,3 mL de PBS (16,5 mM pH 7,5), injetada no flanco direito traseiro. A melatonina foi dissolvida em etanol a 0,5% em solução salina normal na concentração de 5 mg/ml preparada a fresco antes do uso. A dose administrada será de 10 mg/kg por gavagem em cada animal diariamente. Para o cálculo individual da dose os animais foram pesados e calculada a dose a cada dois dias.

Processamento do material e imuno-histoquímica

Cerca de 2 cm do jejuno foi aberto ao longo da borda mesentérica, cuidadosamente lavado com PBS (0,1 M, pH 7,4) e fixado em Zamboni por 18h à 4°C e depois lavados em PBS por 12h. Seguido de troca do PBS na sexta hora, crioproteção, inclusão a O.C.T. e armazenado a -80 C°. Após, foi feito cortes histológicos em

cortes semi seriados de 10µm e aderidos a lâminas histológicas previamente preparadas com solução de Poli-L-lisina. Os cortes obtidos foram submetidos a técnica imuno-histoquímica utilizando o anticorpo primário rabbit anti-VIP e o anticorpo secundário donkey anti-rabbit 488.

Análise e estatística dos dados

A área (µm²) de 300 varicosidades por animal foram mensuradas utilizando imagens capturadas com objetiva de 40X. A análise foi realizada utilizando o programa Motic Images Plus. Os resultados foram submetidos à análise estatística nos programas Statistica 8.1 e GraphPad Prism 6.1, sendo expressos como média ± erro padrão da média. Foi usado o Delineamento em Blocos, seguido do teste de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na área de varicosidades VIP+ observou-se uma diminuição de 11% dessas varicosidades no grupo CM (CM vs C; $p < 0,0001$; Figura 1). O grupo A não apresentou diferenças significativas na morfometria de varicosidades VIP+ em comparação ao grupo C ($p = 0,15$). A administração da melatonina no grupo AM também não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo A ($p = 0,18$).

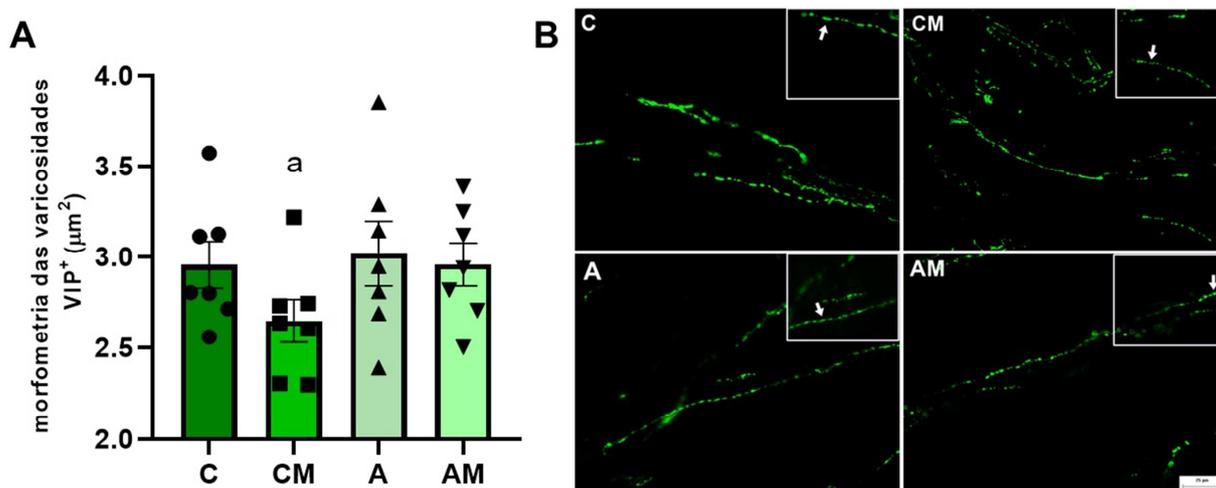


FIGURA 1- A) Morfometria de varicosidades VIP+ (µm²). B) Fotomicrografias de varicosidades VIP+ presentes na mucosa do jejuno. A seta branca indica varicosidade VIP+. Grupos experimentais: controle (C), animais controle administrados com melatonina 10 mg/kg (CM), animais inoculados com células tumorais A549 (A) e animais inoculados com células tumorais A549 administrados com melatonina 10mg/kg (AM). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. $a p < 0,05$ quando comparado ao grupo C. $n = 7$ animais/grupo. Barra de escala 25 µm.

Como descrito na literatura, o câncer leva a um estado de inflamação sistêmica e estresse oxidativo, afetando todo o organismo, inclusive podendo afetar as varicosidades VIP+ na mucosa intestinal (SESTAK *et al.*, 2024.). Entretanto, nesse

estudo não foi observado alterações na área das varicosidades VIP+ no grupo doente (A) em comparação ao grupo controle (C).

Além disso, também não foi observado alterações no grupo doente tratado com melatonina (AM) em relação ao grupo doente (A). Em contrapartida, foi observado que houve uma diminuição de 11% da área das varicosidades da mucosa intestinal VIP+ no grupo controle tratado com melatonina (CM) em comparação ao grupo controle (C). Essa diminuição pode ser explicada por uma possível ação pró-oxidante da melatonina em algumas condições experimentais, como em animais saudáveis, levando a ativação da produção de radicais livres (HERMOSO et al, 2016), o que poderia afetar as varicosidades VIP+ nesses animais.

CONCLUSÕES

O presente modelo de câncer e o tratamento com melatonina não causou alterações na área das varicosidades VIP+. Por outro lado, a melatonina reduziu a área dessas varicosidades nos animais saudáveis, refletindo um possível efeito pró-oxidante do composto, sendo necessário mais estudos do tratamento da melatonina nessas condições experimentais.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

BELLAPART, J.; BOOTS, R. Potential use of melatonin in sleep and delirium in the critically ill. **British journal of anaesthesia**, v. 108, n. 4, p. 572-580, 2012.

HERMOSO, DAM., et al. Melatonin protects female rats against steatosis and liver oxidative stress induced by estrogen deficiency. **Life Sciences**, v. 157, p. 178-186, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estatísticas de câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao>

SESTAK, SS; da MOTTA LIMA, FG; de OLIVEIRA, AP *et al.* Efeitos da caquexia induzida por câncer e administração de l-glutathiona na mucosa intestinal de ratos. **Amino Acids**, 30, 2024.

VERGNOLLE, N.; CIRILLO, C. Neurons and glia in the enteric nervous system and epithelial barrier function. **Physiology**, v. 33, n. 4, p. 269–280, 2018.