

ANÁLISE QUANTITATIVA DE CÉLULAS CALICIFORMES POSITIVAS PARA ALCIAN BLUE NO CÓLON DE RATOS ENXERTADOS COM CARCINOMA PULMONAR DA LINHAGEM A549 ADMINISTRADOS COM MELATONINA

Maria Clara Panont dos Santos (PIC/Uem), Aline Lisboa Coutes, Maysa Pacheco Alvarez da Silva (Coorientadora), Juliana Vanessa Colombo Martins (Orientadora).
E-mail: jvcimperles@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

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

Palavras-chave: Antioxidante; Criptas; Mucina.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte mundial e o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) representa cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão. Este estudo avaliou os efeitos da melatonina sobre células caliciformes colônicas em ratos Wistar inoculados no flanco direito com a linhagem tumoral A549. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle, controle com melatonina, A549 e A549 com melatonina. Após 14 dias, fragmentos do cólon foram analisados por coloração com Alcian Blue pH 2,5. A inoculação tumoral promoveu redução significativa de células caliciformes em A. A melatonina provocou aumento em CM mas não demonstrou efeito protetor significativo em AM. Desse modo, os resultados reforçam a necessidade de novos estudos sobre a ação da melatonina no câncer.

INTRODUÇÃO

O câncer, atualmente, é a segunda maior causa de morte no mundo e foi responsável por, aproximadamente, 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes no mundo em 2022. Ainda nesse mesmo ano, os cânceres mais incidentes foram o câncer de pulmão, de mama feminino e o câncer colorretal (WHO, 2024). Os principais casos de câncer de pulmão podem ser classificados histologicamente como: câncer pulmonar de células pequenas (CPCP), que correspondem a cerca de 15% dos casos, e câncer pulmonar de células não pequenas (CPCNP), o mais prevalente, com cerca de 85% dos casos. Um modelo experimental de câncer utilizado em pesquisas é o modelo de CPCNP da linhagem A549, isolado de células epiteliais alveolares tipo II de humanos (JABLONSKA *et al.*, 2019). A função do trato gastrointestinal (TGI), na presença do câncer, é comprometida, uma vez que há distúrbios no mecanismo de digestão e motilidade, além de alterações no sistema nervoso entérico presente na parede do TGI, de animais portadores de câncer, como já foi documentado em modelo de animais portadores de tumor de Walker-256 (FRACARO *et al.*, 2016). O cólon é caracterizado como um

tubo oco e dividido em camada mucosa, composta por epitélio de revestimento, lâmina própria, muscular da mucosa e criptas; submucosa, composta por tecido conjuntivo e o plexo submucoso; a camada muscular, composta de músculo liso, com o plexo mioentérico; e serosa (JULIO-PIEPER & BRAVO, 2016). Nas criptas colônicas, há grande quantidade de células caliciformes, cuja função é a produção e secreção de muco composto, sobretudo, por mucinas e pode estar alterada em situações de desequilíbrio da barreira intestinal. Para analisá-las, podem ser usados diferentes marcadores baseando-se nos padrões de glicosilação das mucinas produzidas. O método de Alcian Blue é utilizado para identificação de mucinas ácidas, que em pH 2,5 evidenciam mucinas com grupos carboxílicos, sialomucinas e O-sulfatados (TANO DE LA HOZ *et al.*, 2024).

A melatonina apresenta potente efeito antioxidante e de sequestro de radicais livres. Em experimentos com linhagens de células de câncer de pulmão, a melatonina evidenciou mecanismos de defesa por meio da diminuição da viabilidade celular (linhagens A549 e PC9), redução da capacidade das células de metastatizar (linhagem A549) e aumento da apoptose celular (JABLONSKA *et al.*, 2019). Desse modo, torna-se pertinente o estudo dos efeitos sistêmicos do câncer na quantidade de células caliciformes Alcian Blue pH 2,5+ no cólon de animais inoculados com CPCNP da linhagem A549, além dos efeitos do tratamento com melatonina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos com animais foram realizados com aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM (CEUA N 8812040521). Foram utilizados segmentos intestinais do intestino grosso de ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) que passaram por período experimental de 14 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: controle (C), controle administrado com melatonina 10 mg/kg (CM), inoculados com CPCNP linhagem A549 (A) e inoculados com CPCNP linhagem A549 administrados com melatonina 10 mg/kg (AM). A melatonina foi administrada nos grupos CM e AM por gavagem, 10mg/Kg, diariamente. Os animais dos grupos A e AM sofreram a indução do tumor por meio da inoculação de uma suspensão de células tumorais do carcinoma pulmonar de células não pequenas (linhagem A549), contendo $1,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis em 300 µl de tampão fosfato salino (PBS) 16,5 mM pH 7,5 por animal, injetada de forma subcutânea no flanco direito traseiro. Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, os segmentos intestinais foram coletados e fragmentos de 2 cm do cólon foram preparados para técnica histológica de coloração com Alcian Blue pH 2,5. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio óptico Motic® BA400 acoplado à câmera digital calibrada em micrômetros. Foram obtidas cerca de 30 imagens por animal, na objetiva de 40x, e quantificadas as células caliciformes Alcian Blue+ em 30 criptas por animal utilizando o software Image-Pro Plus® 4.5 e os resultados expressos em µm². Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando os softwares Statistica® 8.0 e GraphPad Prism® 6.0, expressos como média ± erro padrão. Inicialmente, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados,

seguido da análise de delineamento em blocos e do Teste de Fisher. O nível de significância utilizado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise quantitativa de células caliciformes Alcian Blue+ e suas respectivas fotomicrografias estão demonstradas na figura 1.

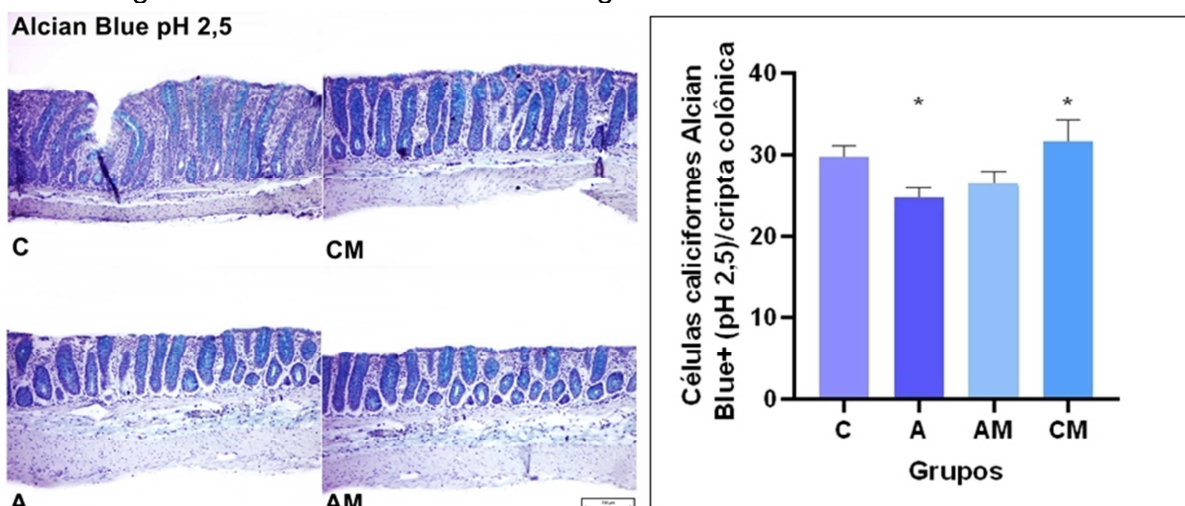


Figura 1 – À esquerda, fotomicrografias capturadas em microscópio óptico, em objetiva de 10x, do cólon dos grupos estudados, corado em Alcian Blue pH 2,5 indicando as células caliciformes. Régua de referência de 150µm. À direita, gráfico representando o número de células caliciformes por cripta no cólon dos animais estudados em Alcian Blue (pH 2,5). Estão representados os grupos C (controle), A (inoculados com CPCNP), AM (inoculados com CPCNP administrados com melatonina 10mg/kg) e CM (controle administrado com melatonina 10 mg/kg). * Indica diferença significativa em relação ao grupo C ($p < 0,05$)

A presença de câncer foi comprovada nos animais deste trabalho haja vista o desenvolvimento do tumor sólido nos ratos inoculados com o tumor. Em relação às células caliciformes de mucinas ácidas Alcian Blue+ em pH 2,5, que coram sialomucinas, houve redução significativa de 16,43% no grupo A em relação ao grupo C ($p < 0,0001$), por outro lado o grupo CM teve aumento significativo de 6,32% em relação a C ($p < 0,05$).

Entretanto, embora pesquisas indiquem o papel da melatonina na redução dos impactos do câncer por suas propriedades antioxidantes, modulação por meio dos receptores MT1 e MT2 e regulação da apoptose celular (JABLONSKA *et al.*, 2019), evidencia-se que a melatonina não apresentou ação considerável ao minimizar as alterações colônicas provocadas pelo desenvolvimento do tumor nos animais estudados nesta pesquisa (AM), uma vez que só foi observado aumento das células caliciformes nos grupos CM. Esses resultados denotam a necessidade de mais estudos acerca dos mecanismos envolvidos na ação da melatonina no câncer, além da necessidade de mais estudos sobre melatonina em condições fisiológicas.

CONCLUSÕES

A inoculação de células CPCNP provocou alterações morfológicas significativas no padrão de glicosilação das mucinas ácidas. Entretanto, a administração com melatonina não demonstrou efeitos protetores consideráveis nos ratos com tumor, visto que as modificações foram mais notáveis nos ratos saudáveis. Desse modo, mais estudos são necessários para melhor entendimento dos dados observados, tendo em vista que os efeitos fisiológicos da melatonina em casos de câncer são pouco explorados.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Juliana Vanessa Colombo Martins Perles e à doutoranda Maysa Pacheco Alvarez da Silva pelo aprendizado e paciência durante o projeto. Ao Laboratório de Plasticidade Neural Entérica e à Universidade Estadual de Maringá. À amiga e parceira de projeto Aline Lisboa Coutes.

REFERÊNCIAS

FRACARO, L. et al. **Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal. Effects on ICC in the Walker 256 tumor model.** Neurogastroenterology & Motility, v. 28, p. 101–115, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/nmo.12702>.

JABLONSKA, Karolina et al. **Prognostic impact of melatonin receptors MT1 and MT2 in non-small cell lung cancer (NSCLC).** Cancers, v. 11, n. 7, p. 1001, 17 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11071001>.

JULIO-PIEPER, M.; BRAVO, J. A. **Intestinal Barrier and Behavior.** International Review of Neurobiology, v. 131, p. 127–137, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/BS.IRN.2016.08.006>.

TANO DE LA HOZ, M. F. et al. **Histological and Histochemical Characteristics of the Intestinal Tract: Morphofunctional Specializations to Herbivory.** In: RASIA, L. L.; BARBEITO, C. G.; ACUÑA, F., eds. Plains Vizcachas. Springer, Cham, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-49487-1_19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer.** In: Cancer overview. 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 20 ago. 2024