

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

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

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

Morfologia - Histologia

Palavras-chave: Intestino Grosso; Câncer; Criptas.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do câncer e da administração de melatonina na quantidade de células caliciformes PAS⁺ (células secretoras de mucina) do colón de ratos portadores de tumor. Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos (certificado CEUA nº 8812040521; n=6): controle (C), controle com melatonina (CM; 10mg/kg, v.o.), animais inoculados com CPCNP A549 (A) e inoculados tratados com melatonina (AM; 10mg/kg, v.o.). Os grupos A e AM receberam indução tumoral por inoculação subcutânea no flanco traseiro direito de $1,0 \times 10^7$ células viáveis da linhagem A549, suspensas em 300 µl de PBS (16,5 mM, pH 7,5). Após 14 dias de tratamento os animais sofreram eutanásia, segmentos colônicos foram coletados, fixados e posteriormente corados seguindo a técnica de coloração para PAS. Não foi detectado diferença significativa na comparação A x C, no entanto, foi observado reduções significativas nº de células colônicas PAS⁺ de 39,30% e 12,81% nas comparações AM x A e CM x C, respectivamente, levando a concluir que a suplementação com melatonina apresentou impacto na densidade de células caliciformes tanto em animais doentes quanto em animais saudáveis.

INTRODUÇÃO

O câncer representa atualmente a segunda maior causa de mortalidade no mundo, sendo responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018. Em 2022, os diagnósticos mais frequentes corresponderam ao câncer de pulmão, de mama e colorretal (FERLAY et al., 2024). Estudos epidemiológicos apontam ainda diversos fatores que aumentam o risco para o desenvolvimento da doença, tais como exposição à radiação, infecções, ingestão de bebidas alcoólicas, estilo de vida, alimentação inadequada e predisposição genética.

O estresse oxidativo é causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas em um metabolismo energético normal. O aumento de ERO pode

causar danos ao DNA que geram mutações e instabilidade nos cromossomos, o que pode levar à formação do câncer e seu desenvolvimento (CARINI et al., 2017).

As células caliciformes são células epiteliais especializadas presentes nas superfícies mucosas, como o trato gastrointestinal. Sua principal função é a síntese e secreção de mucinas no intestino, que formam a camada de muco responsável por recobrir e proteger o epitélio contra agentes patogênicos, toxinas e danos mecânicos. Essa camada de muco atua como uma barreira física e química, limitando o contato direto de microrganismos com o epitélio e favorecendo a lubrificação e o trânsito de materiais. As células caliciformes são denominadas dessa forma devido ao formato característico de seu polo apical, semelhante a uma taça. Elas pertencem à linhagem secretora e se originam a partir de células-tronco situadas na base das criptas intestinais (GUSTAFSSON E JOHANSSON, 2022).

No entanto, a produção de mucinas pode ser alterada em desequilíbrio da barreira intestinal. Para estudá-las, empregam-se diferentes marcadores baseados nos padrões de glicosilação das mucinas. A técnica do ácido periódico de Schiff (PAS) é utilizada para identificar mucinas neutras, pois o ácido periódico oxida ligações 1,2-glicol dos carboidratos gerando aldeídos, posteriormente evidenciados pelo reagente de Schiff (TANO DE LA HOZ et al., 2019).

A melatonina tem potente efeito antioxidante e elevada capacidade de neutralizar radicais livres (FERLAZZO et al., 2020). A ligação entre esse hormônio e o câncer vem sendo estudada há décadas, e diversos trabalhos epidemiológicos sustentam suas possíveis propriedades anticancerígenas. Entre os mecanismos propostos para sua ação oncostática, destacam-se a inibição da proliferação celular e a estimulação das respostas imunes de defesa contra tumores (TALIB, 2018).

Esse trabalho tem como objetivo quantificar a população de células caliciformes PAS+ nas criptas do cólon de ratos portadores de tumor originado de carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) da linhagem A549 administrados com melatonina 10 mg/Kg.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos com animais foram realizados com aprovação prévia da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (nº 8812040521). Foram utilizados segmentos intestinais do cólon de ratos adultos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, provenientes do Biotério Central da UEM. Inicialmente, os animais foram divididos em 4 grupos (n=6) aleatoriamente: controle (C), controle administrado com melatonina 10 mg/kg (CM), inoculados com CPCNP linhagem A549 (A), inoculados com CPCNP linhagem A549 administrados com melatonina 10 mg/kg (AM).

A melatonina foi administrada diariamente aos grupos CM e AM, e os animais foram pesados a cada dois dias e tiveram sua dose individual calculada. 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 sofreram eutanásia, e cerca de 2cm dos segmentos colônicos foram coletados, fixados e posteriormente corados seguindo a técnica de coloração para PAS, e posteriormente foram feitas lâminas do material já preparado.

As imagens foram obtidas por microscopia óptica, com auxílio do microscópio Motic® BA400 microscópio óptico (Motic China Group Co., Xangai, China) acoplada a câmera digital. Akville - USA), calibrado em micrômetros.

Foram capturadas cerca de 30 imagens por animal, na objetiva de 40x e em seguida, foi feita a quantificação de células caliciformes PAS+ em 30 criptas por animal. As imagens foram analisadas com o auxílio do *software* Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics; Rockville - USA) e os resultados expressos em μm^2 . Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se os softwares Statistica® 8.0 e Graph Pad Prism® 6.0, sendo expressos como média $\pm$ erro padrão. Inicialmente foram realizados os testes de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados. Foi realizada a análise de Delineamento em blocos, seguido de Teste de Fisher. O nível de significância adotado é de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

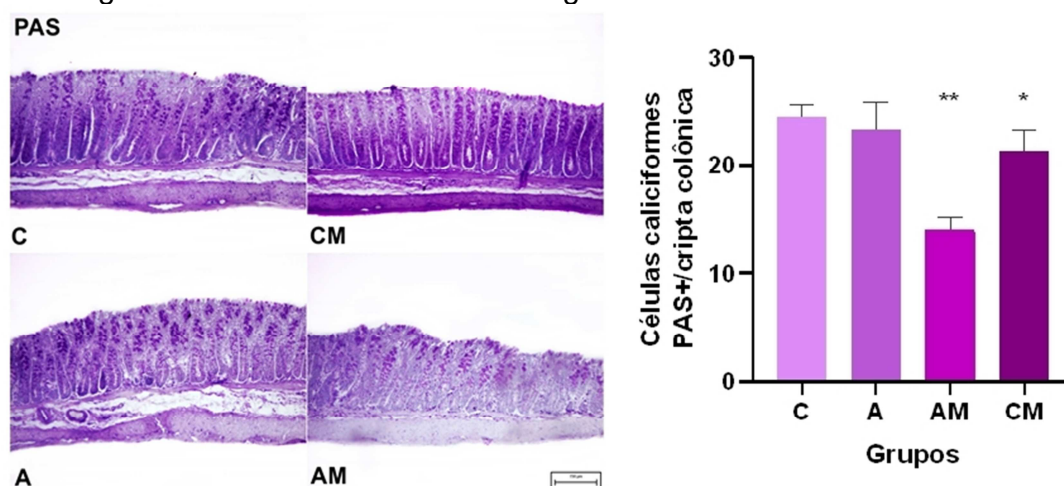


Figura 1: À esquerda, fotomicrografias capturadas em microscópio óptico, em objetiva de 10x do cólon dos grupos estudados, corados em PAS, indicando as células caliciformes. Régua de referência de 150 μm . À direita, gráfico representando o número de células caliciformes PAS+ por cripta no cólon dos animais estudados. 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 ($p < 0,0001$); ** Indica diferença significativa em relação ao grupo A ($p < 0,0001$)

Não houve diferença significativa entre os grupos A e C. No entanto, ao comparar o número de células PAS+ do grupo AM com A, houve redução significativa de 39,30% no grupo AM ($p < 0,0001$), enquanto ao comparar CM com C houve redução

significativa de 12,81% ($p < 0,0001$). As células caliciformes foram reduzidas em quantidade provavelmente devido à alteração plástica da mucosa (GUSTAFSSON E JOHANSSON, 2022).

Isso demonstra a necessidade de mais estudos que possam esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na ação dessa substância, uma vez que é amplamente estudada em condições patológicas, mas não em condições fisiológicas.

CONCLUSÕES

A suplementação com melatonina apresentou impacto na densidade de células caliciformes tanto em animais doentes quanto em animais saudáveis. São necessários mais estudos para esclarecer melhor os fatores envolvidos, visto que os efeitos da melatonina em condições fisiológicas normais ainda são pouco investigados.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Juliana Vanessa Colombo Martins Perles e à doutoranda Maysa Pacheco Alvarez da Silva pela profunda paciência e cuidado ao me ensinarem. Ao Laboratório de Plasticidade Neural Entérica e à Universidade Estadual de Maringá. À Maria Clara Panont, pela parceria e companhia.

REFERÊNCIAS

CARINI, F. et al. **Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants**. Anticancer Research, 2017. v. 37, n. 9, p. 4759–4766.

FERLAY J, ERVIK M, LAM F, et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. In: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 16 Ago 2025.

FERLAZZO N, ANDOLINA G, CANNATA A, et al. **Is melatonin the cornucopia of the 21st century?** Antioxidants, 2020. n. 9, p. 1–29.

GUSTAFSSON J.K., JOHANSSON M.E.V. **The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis**, 2022. Nat Rev Gastroenterol Hepatol v.19, p. 785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x>

TALIB WH, ALSAYED AR, ABUAWAD A, et al. **Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities**, 2021. Molecules p. 26. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092506>.

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.