AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CRIPTAS E FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES NO TECIDO COLÔNICO DE CAMUNDONGOS SWISS INDUZIDOS COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA (DMH) E TRATADOS COM *Curcuma longa*

Laura de Castro Vasconcellos (PIBIC/FA), Giovanna de Carvalho, Natalia Castelhano de Oliveira, Priscilla de Laet Sant'ana, Alice Maria de Souza Kaneshima, Tânia Cristina Alexandrino Becker (orientador). E-mail: tcabecker@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR

Área: Ciências da Saúde Sub-área: Anatomia Patológica

PALAVRAS-CHAVE: DMH; Criptas aberrantes; Quimioprevenção; *Cúrcuma longa*

RESUMO

Dentre os eventos iniciais da carcinogênese coloretal estão as criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA), considerados marcadores morfológicos em modelos experimentais. A *Curcuma longa* apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, podendo apresentar um potencial quimiopreventivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito do extrato etanólico de *Curcuma longa* sobre a formação de CA e FCA no tecido colônico de camundongos Swiss submetidos à indução por DMH. Foram utilizados 27 camundongos Swiss machos, distribuídos em cinco grupos experimentais, dentre eles os grupos induzido com DMH e tratados com o extrato etanólico de *C. longa* na dose de 250 mg/kg e seus respctivos grupos controles. Os resultados demonstraram maior número de CA no grupo induzido com DMH em comparação ao controle negativo da indução, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), confirmando a eficácia do modelo experimental. Entretanto, o tratamento com o extrato etanólico de *C. longa* na dose de 250 mg/kg não promoveu redução estatisticamente significativa no número de CA em comparação ao grupo controle de indução. Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relacionadas presença de FCA e à multiplicidade dos focos entre os grupos submetidos à indução e tratados com o extrato. Dessa forma, nas condições experimentais avaliadas, o extrato etanólico de *C. longa*, na dose de 250 mg/kg, não demonstrou efeito quimiopreventivo significativo sobre os parâmetros analisados no tecido colônico dos camundongos Swiss.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal constitui um importante problema de saúde pública e seu desenvolvimento envolve alterações progressivas no epitélio intestinal. Entre os eventos iniciais da carcinogênese estão as criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA), utilizados como parâmetros de alterações pré-neoplásicas em modelos experimentais (Bird, 1987; Rodrigues et al., 2002).

A busca por substâncias naturais com potencial quimiopreventivo vem recebendo maior atenção devido a presença de compostos biologicamente ativos. A *Curcuma longa* L. se destaca por apresentar curcuminoides e outros constituintes associados a propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Alonso, 2016). Assim, este estudo avaliou o efeito do extrato etanólico de *C. longa*, administrado por gavagem, sobre CA e FCA em camundongos Swiss submetidos à indução por DMH.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 27 animais foram distribuídos de maneira aleatória em cinco grupos experimentais, sendo seis animais por grupo de indução e tratamento e três indivíduos no grupo controle do veículo. Os rizomas de *C. longa* foram secos, triturados e submetidos à extração em aparelho do tipo Soxhlet com etanol absoluto. Em rota-evaporador, o extrato foi concentrado e liofilizado. O período de acompanhamento total foi de 10 semanas. Os grupos foram: Controle negativo diluente DMH (GI), Controle positivo indução (GII), Grupo tratamento experimental (GIII), Controle negativo diluente da curcuma. Os animais foram inoculados via intraperitoneal com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 20mg/kg, diluída em solução de tampão fosfato (PBS) com EDTA 1,5 pH 6,5, duas vezes por semana durante 4 semanas (Rodrigues et al., 2002). O extrato foi inoculado via gavagem. A eutanásia foi realizada com a administração de Cloridrato de Xilazina (30mg/kg) e Cloridrato de Quetamina (240mg/kg) por via IP. O intestino grosso foi removido e aberto na linha mesentérica na sua extensão, distendido e fixado sobre pequenas placas de isopor, lavados com solução salina e imersos em paraformaldeído por 6 horas. As porções intestinais foram mantidas em álcool 70º e corados com azul de metileno 1%, diluído em PBS, para análise das CA e FCA. As criptas e os foco de criptas aberrantes foram identificadas segundo descrição de Bird (1987), com auxílio de um microscópio de luz/objetiva de 4x. As categorias histológicas incluiram: CA isolada e FCA com 02 a 03, 04 a 05 ou mais de 05 CA/foco. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn com correção de Bonferroni, adotando-se $p < 0,05$. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição ao DMH promoveu um aumento significativo na quantidade de CA em comparação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), confirmando a eficiência do protocolo de indução empregado. Nos animais submetidos ao DMH e tratados com *C. longa*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de CA em relação ao grupo controle positiva. As análises histológicas realizadas por meio da coloração com azul de metileno (Tabela 01) foi expressa pela média ± e desvio padrão. Nossos resultados mostraram que, nos grupos controles não induzidos com DMH (GI, GII, GIV e GVI), CA e FCA não foram visualizados. O grupo II submetido à indução com DMH apresentou um maior número de CA em comparação ao grupo I de controle negativo, a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Porém, no grupo III observamos valores

elevados tanto de CA quanto de FCA. Em relação às CA isoladas, observamos a ocorrência de um aumento de CA sem diferença significativa, quando comparados ao grupo III. Quanto aos FCA, os grupos tratados apresentaram valores numericamente superiores aos que foram observados no grupo controle positivos, porém sem uma diferença estatística significativa. Da mesma forma, a média de CA foi de 21,2 no grupo tratado e 20,0 no grupo DMH, enquanto a multiplicidade dos FCA foi de 3,01 e 2,81, respectivamente, mostrando que a análise da multiplicidade dos FCA não demonstrou diferença significativa entre os grupos submetidos à indução por DMH, sugerindo que a cúrcuma longa não agiu no controle da proliferação de criptas aberrantes nos focos. Os grupos que não receberam DMH apresentaram uma baixa ocorrência de CA e FCA, incluindo os animais que foram tratados apenas com a *C. longa* e o grupo que recebeu o veículo (Tween 20). De maneira geral, os resultados demonstram que a DMH foi capaz de induzir a formação de alterações aberrantes no cólon, enquanto o tratamento com *C. longa* não promoveu uma redução significativa perante os parâmetros avaliados. A *C. longa* apresenta compostos associados a diferentes atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (ALONSO, 2016). Estudos com curcumina demonstraram efeitos sobre alterações pré-neoplásicas em modelos de carcinogênese induzida por DMH, embora a resposta possa variar entre protocolos (BOUNAAMA et al., 2012; KWON et al., 2004). Dessa forma, os resultados não permitem excluir um potencial quimiopreventivo da espécie, mas indicam que esse efeito não foi demonstrado para o extrato etanólico, na dose de 250 mg/kg e nas condições experimentais avaliadas.

Tabela 1 – Representação da média ± desvio padrão de criptas aberrantes (CA), focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade dos FCA.

Grupos	CA (média ± DP)	FCA			
	x̄ ± DP IC95%	x̄ ± DP IC95%			Multiplicidade de FCA x̄ score ± DP [IC95%]
		2 a 3	4 a 5	> 5	
I	1,0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
II	20,0 ± 1,41 [18,24 – 21,76]	8,6 ± 2,30 [5,74 – 11,46]	1,2 ± 0,45 [0,64 – 1,76]	0,2 ± 0,45 [-0,36 – 0,76]	2,81 ± 0,12 [2,67 – 2,95]
III	21,2 ± 15,22 [2,3 – 40,1]	13,0 ± 9,14 [1,65 – 24,35]	3,2 ± 2,17 [0,51 – 5,89]	0,6 ± 0,55 [-0,08 – 1,28]	3,01 ± 0,15 [2,82 – 3,19]
IV	2,0 ± 0,71 [1,12 – 2,88]	0,4 ± 0,55 [-0,28 – 1,08]	0 ± 0	0 ± 0	1,0 ± 1,37 [-0,7 – 2,7]
V	0,67 ± 0,58 [-0,77 – 2,1]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

CA: criptas aberrantes isoladas; DP: desvio padrão; FCA: foco de criptas aberrantes; IC95%: intervalo de confiança a 95%.

CONCLUSÕES

A indução com DMH foi capaz de promover um aumento significativo na formação de criptas aberrantes no tecido colônico dos camundongos, demonstrando a eficiência do modelo experimental. Entretanto, a administração do extrato etanólico de Curcuma longa, na dose de 250 mg/kg, não promoveu uma redução significativa na quantidade de CA, FCA ou na multiplicidade dos focos. Portanto, nas condições avaliadas, o extrato de C. longa não apresentou um efeito quimiopreventivo significativo sobre os parâmetros analisados.

AGRADECIMENTOS:

A Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de iniciação científica, e a Universidade Estadual de Maringá pelo apoio institucional e pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS:

ALONSO, J. Curcuma. In: ALONSO, J. ***Tratado de fitofármacos e nutracêuticos***. São Paulo: A. C. Farmacêutica, 2016. p. 364-373.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. ***Cancer Letters***, v. 37, n. 2, p. 147-151, 1987.

BOUNAAMA, A.; DJERDJOURI, B.; LAROCHE-CLARY, A.; LE MORVAN, V.; ROBERT, J. Short curcumin treatment modulates oxidative stress, arginase activity, aberrant crypt foci, and TGF-β1 and HES-1 transcripts in 1,2-dimethylhydrazine-colon carcinogenesis in mice. ***Toxicology*****,** v. 302, n. 2-3, p. 308-317, 2012.

JYOTIRMAYEE, B.; MAHALIK, G. A review on selected pharmacological activities of *Curcuma longa* L. ***International Journal of Food Properties***, v. 25, n. 1, p. 1377-1398, 2022.

KWON, Y.; MALIK, M.; MAGNUSON, B. A. Inhibition of colonic aberrant crypt foci by curcumin in rats is affected by age. ***Nutrition and Cancer***, v. 48, n. 1, p. 37-43, 2004.

RODRIGUES, M. A. M.; SILVA, L. A. G.; SALVADORI, D. M. F.; DE CAMARGO, J. L. V.; MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 35, n. 3, p. 351-355, 2002.