**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS VARICOSIDADES DAS FIBRAS NERVOSAS MIOENTÉRICAS IMUNORREATIVAS AO CGRP DO ÍLEO DE RATOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER**

Jaqueline Janaina Jumes (PICVAF), Adma Poliana de Borba Cecilio da Silva (CNPq), Luiz Felipe Becker (PICV) Geraldo Emílio Vicentini (Orientador), e-mail: gevicentini@yahoo.com.br.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências da Saúde/Francisco Beltrão, PR.

**Área e subárea:** Ciências biológicas/ Morfologia

**Palavras-chave:** sistema nervoso entérico; câncer**;** peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**Resumo**

O tumor Walker-256 em ratos é considerado um modelo experimental para o estudo da síndrome da caquexia. O estresse oxidativo associado ao câncer pode levar a distúrbios do trato gastrointestinal (TGI), com evidência para as alterações morfológicas e quantitativas em neurônios e na expressão de neurotransmissores no Sistema Nervoso Entérico. Nesse cenário, enquadra-se o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o qual tem por funções a modulação do processo digestivo, a secreção gástrica e a motilidade gastrintestinal. Com objetivo de avaliar a expressão do CGRP nas varicosidades das fibras mioentéricas, imagens (fotomicrografias) de dois grupos experimentais, controle (C) e portadores de tumor de Walker-256 (TW), cedidas pelo Laboratório de Plasticidade Neural Entérica da Universidade Estadual de Maringá UEM-PR, foram analisadas. Assim, dezesseis ratos *norvergiccus Wistar* foram divididos em dois grupos com n=8. A análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao CGRP (CGRP-IR) ao longo das fibras nervosas mioentéricas se deu por meio da mensuração da área de 400 varicosidades (μm2) por animal. Os valores médios encontrados mostraram diferença estatística significante, tendo o grupo TW uma área de 2.77 ± 0.032, enquanto o grupo C apresentou uma área de 2.06 ± 0.025 (p<0,05). No tocante a elevação dos neuropeptídios, tem-se o aumento da área da varicosidade da fibra nervosa CGRP-IR na ordem de 34,63% em comparação ao grupo C, sugerindo que a expressão de CGRP está elevada e foi induzida pela presença do tumor.

**Introdução**

A caquexia associada ao câncer vem sendo estudada com frequência em modelos animais. A utilização do tumor Walker-256 em ratos é considerada um modelo experimental adequado para a compreensão da síndrome da caquexia devido ás características tumorais definidas, além da facilidade de sua manutenção em laboratório (OLIVEIRA *et al*., 1998). Nesse contexto, faz-se necessário o entendimento do trato gastrointestinal (TGI) associado a essa síndrome. As células neurais do TGI fazem parte de um sistema nervoso próprio da parede intestinal, o Sistema Nervoso Entérico (SNE) que é organizado em plexos. A maioria das células nervosas possuem corpos celulares inseridos em dois plexos ganglionados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS, 2006). Diversos estudos observaram disfunções gastrintestinais, as quais são atribuídas, em partes, às alterações morfológicas e quantitativas dos neurônios ou á expressão de neurotransmissores no SNE. Entre os neurotransmissores, ganha destaque o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), cuja função envolve a modulação do processo digestivo, da secreção gástrica, e da motilidade gastrintestinal (VILLALÓN; OLESEN, 2009).

 **Materiais e Métodos**

Neste estudo houve uma colaboração do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica da Universidade Estadual de Maringá UEM-PR que, gentilmente, cedeu imagens (fotomicrografias) para as análises. Estas imagens foram capturadas em microscopia de fluorescência e foram produzidas por técnica de imunohistoquímica com anticorpos específicos para a proteína CGRP. Foram utilizados 2 grupos experimentais com características metodológicas que envolveram 16 ratos *norvergiccus Wistar* machos com 57 dias de idade, divididos em dois grupos experimentais com n=8. Os animais dos grupos experimentais, Controle (C) e portadores de tumor de Walker-256 implantados no flanco direito (TW), ao final de 14 dias, foram eutanasiados para coleta e processamento do íleo para obtenção de preparados totais da túnica muscular para análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao CGRP (CGRP-IR) ao longo das fibras nervosas mioentéricas. Foram mensuradas as áreas de 400 varicosidades (μm2) por animal na região intermediária do íleo, em um programa de análise de imagens (Image Pro Plus 4.5), totalizando 3200 mensurações por grupo. Os resultados neste estudo estão expressos como média ± erro padrão da média. Para o tratamento estatístico dos resultados, foi utilizado o teste *t* de student através do programa GraphPad Prism 6 com nível de significância de 5%. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os procedimentos envolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação sob o Parecer 99/2012-CEAE (UEM).

**Resultados e Discussão**

Neste estudo, as varicosidades foram identificadas e determinadas como sendo dilatações ao longo da fibra nervosa analisada, as quais acumulam em seu interior o CGRP. A análise morfométrica revelou que os valores médios das áreas das varicosidades encontrados mostram diferença estatística significante, tendo o grupo TW uma área de 2.77 ± 0.032, enquanto o grupo C apresentou uma área de 2.06 ± 0.025, conforme estão mostrados na figura 1.



**Figura 1**– Área média das varicosidades CGRP-IR (µm2) das fibras nervosas do plexo mioentérico do íleo de ratos pertencentes aos grupos: Controle (C) e Portadores de Tumor de Walker 256 (TW). n= 8 animais por grupo. p < 0,0001 (test *t* de Student)

Os tumores aumentam a quantidade de substâncias pró-oxidantes e diminuem as atividades das enzimas antioxidantes em tecidos extra-tumorais, promovendo o aumento do estresse oxidativo (Mena *et al*, 2009).

Tal afirmação está de acordo com o que foi identificado no presente trabalho, no que tange a elevação dos neuropeptídios, mostrado pelo aumento da área da varicosidade da fibra nervosa CGRP-IR na ordem de 34,63% em relação ao grupo controle. Este resultado sugere que a expressão de CGRP está aumentada e foi promovida pela presença do tumor. Essa elevação significativa das áreas das varicosidades reflete a plasticidade neural no trato digestório provocados pelo câncer ou uma consequência uma provável neurodegeneração ao nível do plexo mioentérico como reflexo do elevado estresse oxidativo imposto pelo tumor neste modelo experimental. Doenças crônicas como o diabetes induzem alterações semelhantes às observadas neste estudo (GUARNIER *et al*, 2010; CHANDRASEKHARAN & SRINIVASAN, 2007).

**Conclusões**

Evidências sugerem que a presença do tumor de Walker-256 induz ao aumento da área das varicosidades CGRP-IR do plexo mioentérico do íleo em um modelo experimental de caquexia associada ao câncer em ratos. Efeito este que pode ser atribuído ao elevado estresse oxidativo presente em ratos portadores de tumor de Walker-256.

**Agradecimentos**

Agradeço a Deus, razão de toda minha existência e ao meu orientador, Geraldo Emílio Vicentini, por se inclinar ao ensino e a arte de transferir mais do que conhecimento, ofertando oportunidades e incentivo para a realização deste trabalho.

Nossos agradecimentos à Fundação Araucária pelo suporte financeiro e ao Laboratório de plasticidade neural entérica.

**Referências**

CHANDRASEKHARAN, B. AND SRINIVASAN, S. (2007). Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 951–960.

Furness, J. B. (2006). The enteric nervous system**.** *Malden: Blackwell Publishing.*

Guarnier, F. A. *et al*. (2010). Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. *Muscle and Nerve* **42**, 950-8.

Mena S., et al. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* **674**, 36–44.

Oliveira, P. F. M.; *et al*. (1998). Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de walker em estômago de rato. *Acta Cir. Bras* **13***,* 243-248.

Villalón, C. M., Olesen, J. (2009). The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacology & Therapeutics* **124**, 309-323.