

HISTOMORFOMETRIA DO INTESTINO DELGADO DE RATOS INDUZIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL POR 1,2- DIMETILHIDRAZINA

Ériko dos Santos Moreira de Oliveira¹, Daniel Alves de Paula¹, Ewelín Nunes Martins¹, Tiago Zamperlini Moraes², Bruno Pimentel da Silva², Leonardo Oliveira Trivilin³

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, erikosmoliveira@gmail.com, daniel.paula@edu.ufes.br, ewelin.martins@edu.ufes.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, tiago.morais@edu.ufes.br, bruno.silva.64@edu.ufes.br

³Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Departamento de Medicina Veterinária, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, leonardo.trivilin@ufes.br

Resumo

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais incidentes no Brasil e no mundo, estando relacionado a fatores genéticos, inflamatórios e dietéticos. A integridade da mucosa intestinal é fundamental para a homeostase gastrointestinal, mas pode ser comprometida durante o processo carcinogênico. Este estudo avaliou o efeito da indução da carcinogênese por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) sobre parâmetros histomorfométricos do intestino delgado de ratos Wistar. Para tanto, sete ratos foram submetidos à carcinogênese colorretal (grupo DMH+) e sete ratos mantidos como controle negativo (grupo DMH-), com posterior análise histomorfométrica do intestino delgado utilizando fotomicrografias e o software ImageJ. Observou-se redução da altura da parede intestinal e altura da mucosa (grupo DMH+), sem alterações no comprimento e largura da vilosidade. Conclui-se que a indução de câncer colorretal promove alterações estruturais relevantes no intestino delgado, com possíveis implicações funcionais, e que estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Câncer colorretal. Espessura intestinal. Modelo murino. Análise histomorfométrica.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

O câncer colorretal (CCR), segundo Harada *et al.* 2025, continua sendo um dos grandes desafios da medicina contemporânea, sendo persistente entre as principais causas de morbimortalidade ao redor do mundo. Mesmo diante dos avanços no diagnóstico e nas terapias, o quadro permanece pertinente, decorrente não apenas das mutações genéticas, mas também da relação com células tumorais, estroma, microbiota e processos inflamatórios (Harada *et al.*, 2025).

Logo, os modelos animais continuam ocupando papel central, pois permitem, em escala controlada, reproduzir a carcinogênese e testar hipóteses que, de outra forma, ficariam apenas no campo da especulação (Yang *et al.*, 2024). Contudo, como alertam as diretrizes (Devleeschauwer *et al.*, 2024), não basta usar os modelos, é necessário refiná-los, padronizar os métodos e garantir que os resultados não sejam casos isolados, compondo um corpo de evidências sólido.

Estudos com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos mostraram que o tecido tumoral cria um microambiente que prejudica a permeabilidade transepitelial e as junções célula-célula, favorecendo a progressão e invasão do câncer de cólon (Bekusova *et al.*, 2018, 2021; Brennan; Garrett, 2016). Após administração subcutânea, o DMH é metabolizado no fígado em metilazoximetanol (MAM), que pode ser excretado pela bile e atingir o intestino, onde causa principalmente lesões no intestino grosso, embora também haja relatos de lesões no intestino delgado (Venkatachalam *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 1974; Teague *et al.*, 1981; Sunter; Senior, 1983, *apud* Silva-Reis *et al.*, 2022).

Sendo assim, torna-se relevante investigar de que maneira a indução química, realizada com a 1,2-dimetil-hidrazina (DMH), altera a integridade intestinal. A histomorfometria com medidas precisas de altura de vilosidades, profundidade de criptas e espessura da mucosa apresenta-se indispensável para observar fatores precursores da progressão tumoral (Harada *et al.*, 2025; Yang *et al.*, 2024). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da indução à carcinogênese colorretal com DMH na histomorfometria do intestino delgado de ratos Wistar.

Metodologia

Os animais usados neste estudo foram mantidos de acordo com a Lei Brasileira de Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008). Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 043/2013.

O presente estudo adotou delineamento experimental controlado, utilizando modelo murino para avaliação do efeito da indução de câncer colorretal na espessura da parede do intestino delgado. Foram utilizados 14 ratos Wistar, machos jovens, com idade aproximada de 8 semanas, mantidos em grupos de cinco a seis animais por gaiola, em sala sob condições controladas de temperatura entre 22 a 24 °C, umidade relativa do ar entre 45 e 55% e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle negativo, composto por 7 animais não induzidos à carcinogênese (DMH-), e controle positivo, composto por 7 animais submetidos à indução da carcinogênese (DMH+).

A indução carcinogênica foi realizada por meio de injeções de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), de acordo com a metodologia modificada por Laranjeira *et al.* (1998). Neste, o DMH foi dissolvido em NaCl 0,9% contendo 1,5% de EDTA como veículo, ajustado para pH final de 6,5 com o uso de solução de NaOH 1N quando necessário. A aplicação ocorreu por via subcutânea, uma vez por semana, durante cinco semanas, na dose final de 240 mg/kg, ou seja, 48 mg/Kg de rato.

A eutanásia foi realizada ao final da 23ª semana, ocorrendo mediante a indução anestésica (cetamina e xilazina) de acordo com o peso vivo do animal, seguida da aplicação de cloreto de potássio hipersaturado, ocasionando morte imediata. Segmentos do intestino delgado foram coletados para análise histológica, as amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado, processadas, incluídas em parafina, cortadas a espessura de 3 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Após isso, as lâminas foram montadas e analisadas por fotomicrografia digital em microscópio óptico com aumento de 5X e submetidas à análise histomorfométrica no software ImageJ.

Para a análise histomorfométrica foram obtidas mensurações em triplicata para: altura da mucosa intestinal, altura da parede intestinal, altura da microvilosidade, largura da microvilosidade. Em seguida, as médias e desvios padrão das mensurações foram comparados entre os grupos experimentais. Todos os dados dos parâmetros avaliados foram tabulados e direcionados para a avaliação da distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dada a distribuição dos dados, avaliou-se a influência da indução neoplásica colorretal a partir do Teste t para amostras não pareadas, comparando os grupos controle negativo (DMH-) e controle positivo (DMH+). Para todas as análises, considerou-se $p = 0,05$. Todas as análises estatísticas e produção de gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism 10.4.1 versão DEMO.

Resultados

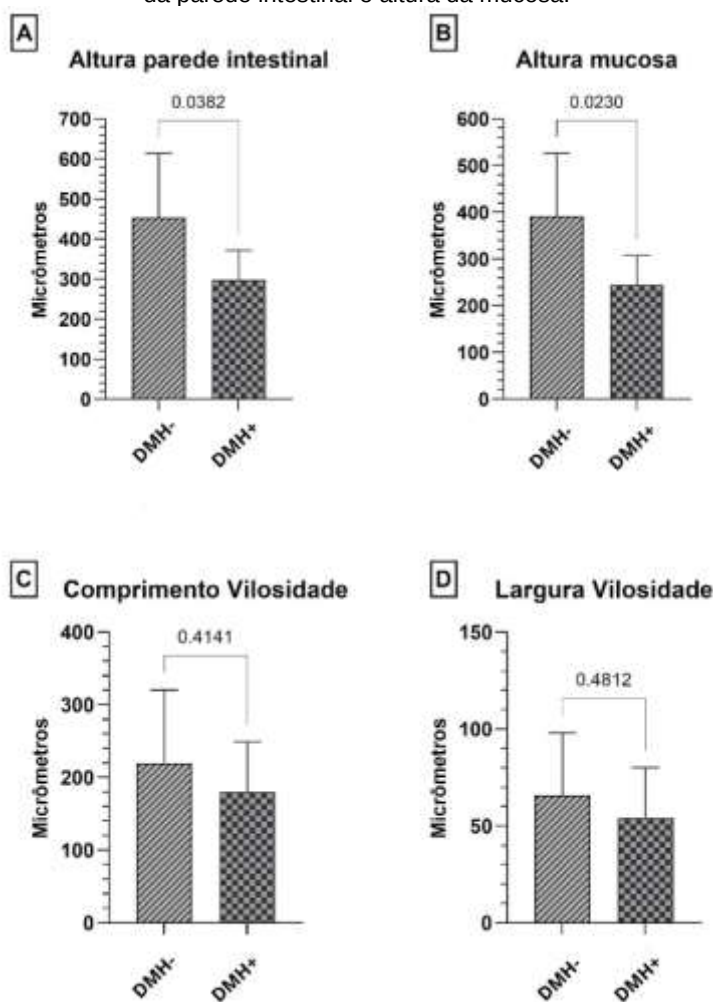
A partir da análise histomorfométrica intestinal comparativa entre ratos submetidos (DMH+) e não submetidos (DMH-) à carcinogênese colorretal, observou-se que indução à carcinogênese colorretal está associada à redução significativa da altura da parede intestinal (Figura 1A) e altura da mucosa (Figura 1B) ($p < 0,05$).

Em contraste, o resultado observado referente ao comprimento da vilosidade (Figura 1C) e a largura da vilosidade (Figura 1D) indica que a indução à carcinogênese colorretal não teve um impacto significativo.

Os resultados obtidos demonstraram que a indução do câncer colorretal a partir da administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) comprometeu significativamente a integridade histomorfológica da barreira intestinal, sobretudo pela redução da altura da mucosa e da parede intestinal. O grupo controle negativo (DMH-) apresentou arquitetura intestinal preservada, com manutenção da altura da mucosa

e da parede, enquanto o grupo controle positivo (DMH+) exibiu redução estatisticamente significativa desses parâmetros, acompanhada de desorganização estrutural.

Figura 1 – Análise histomorfométrica do intestino delgado de ratos submetidos à carcinogênese colorretal. (A) Altura da parede intestinal; (B) Altura da mucosa; (C) Comprimento das vilosidades; (D) Largura das vilosidades. Os dados estão expressos em micrômetros (μm), representando média $\pm$ desvio padrão. O grupo DMH- corresponde aos animais não tratados com DMH (grupo controle negativo), enquanto o grupo DMH+ corresponde aos animais submetidos ao protocolo de carcinogênese com DMH (grupo controle positivo). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$) foram observados nos parâmetros de altura da parede intestinal e altura da mucosa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é um membro da classe das hidrazonas, um forte agente alquilante de DNA, naturalmente presente em cíclades (Venkatachalam *et al.*, 2020). É um agente carcinogênico metabolizado no fígado, que alcança o intestino por meio da bile e da corrente sanguínea, promovendo mutações no DNA de células-tronco dos colonócitos localizadas na base das criptas de Lieberkühn (Venkatachalam *et al.*, 2020). Essas alterações resultam em perda da integridade das junções estreitas e da permeabilidade epitelial, desencadeando a formação de adenocarcinomas colorretais e posterior risco de metástase (Bekusova *et al.*, 2018, 2021, 2022).

O intestino delgado representa um ambiente complexo de interação entre o meio externo e o interno. Suas superfícies mucosas e células especializadas atuam como barreira física, bioquímica e

imunológica, impedindo a entrada de agentes nocivos que poderiam causar infecções (Vancamelkebe; Vermeire, 2018; Lueschow; Mcelroy, 2020). Em condições normais, a homeostase entre nutrição, hospedeiro e microbiota intestinal é mantida; no entanto, alterações anatômicas ou inflamatórias podem comprometer essa função, afetando negativamente a saúde do hospedeiro (Delbaere *et al.*, 2023; Khoshbin; Camilleri, 2020).

O câncer colorretal (CCR) figura entre os tipos mais incidentes de câncer, tanto mundialmente quanto no Brasil, ocupando a terceira posição segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2023). Sua origem é multifatorial, podendo estar associada a obesidade, baixo consumo de fibras, frutas e vegetais, fatores que impactam diretamente a integridade da barreira intestinal (Khoshbin; Camilleri, 2020). A progressão do CCR compromete a morfologia e a organização da barreira epitelial, perturbando a homeostase intestinal por meio da desregulação das vias de sinalização envolvidas na manutenção das células-tronco intestinais e do contato célula-célula, culminando em proliferação e diferenciação anormal (Grazioso; Brandt; Djouder, 2019; Ternet; Kiel, 2021).

Nos modelos experimentais com ratos, a indução da carcinogênese por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) demonstrou que o tecido tumoral é capaz de modificar o microambiente intestinal, interferindo negativamente na permeabilidade transepitelial e na expressão de proteínas de junção célula-célula, favorecendo a progressão e invasão tumoral (Bekusova *et al.*, 2018, 2021). Com o crescimento tumoral, há invasão da submucosa e expansão além do cólon, decorrente da ruptura da barreira epitelial (Brennan; Garret, 2016).

Após administração parenteral, o DMH é metabolizado no fígado por enzimas do citocromo P450, originando compostos carcinogênicos como a metilazoximetanol (MAM) e esse metabólito pode ser excretado tanto na bile quanto na circulação sanguínea, alcançando o intestino delgado e grosso (Venkatachalam *et al.*, 2020). Embora os efeitos mais pronunciados ocorram no intestino grosso, devido à maior concentração de metabólitos e ao tempo prolongado de contato com a mucosa colônica, estudos indicam que o intestino delgado também pode sofrer alterações morfológicas e funcionais, incluindo comprometimento das vilosidades e da relação cripta-vilosidade, impactando a homeostase intestinal (Bekusova *et al.*, 2021; Lueschow; Mcelroy, 2020). Dessa forma, o DMH afeta de modo primário o cólon, mas não exclui as repercussões deletérias no intestino delgado.

Assim, os achados confirmam a efetividade do protocolo de indução da carcinogênese por DMH, demonstrando seu impacto deletério sobre a histoarquitetura intestinal e a relevância desse modelo experimental para o estudo do câncer colorretal.

Conclusão

A indução da carcinogênese colorretal promoveu alterações histológicas marcantes, como redução da espessura da mucosa e desorganização tecidual, confirmando a efetividade do modelo experimental. Tais resultados reforçam a relevância do método para o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal e sua aplicação em futuras investigações.

Referências

- BEKUSOVA, Viktoria V. *et al.* Increased paracellular permeability of tumoradjacent areas in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. **Cancer Biology & Medicine**, v. 15, n. 3, p. 251, 2018.
- BEKUSOVA, V.; FATYYKHOV, I.; AMASHEH, S.; MARKOV, A. Heterogeneity of the barrier properties of the colon in rat. **Biological Communications**, v. 66, n. 2, p. 160–170, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.207>.
- BEKUSOVA, Viktoria *et al.* Selective Role of TNF α and IL10 in regulation of barrier properties of the colon in dmh-induced tumor and healthy rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15610, 2022.
- BRENNAN, C. A.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 395–411, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095513>.

DELBAERE, L. *et al.* The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 20, p. 399–418, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00763-2>.

DEVLEESCHAUWER, S. I. *et al.* OBSERVE: guidelines for the refinement of rodent cancer models. **Nature Protocols**, v. 19, p. 2571–2596, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-024-00998-w>.

GRAZIOSO, T. P.; BRANDT, R.; DJOUDER, N. Regulation of intestinal stem cells by nutrient-sensing pathways. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 9, p. 725–738, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.004>.

HARADA, A. *et al.* Hypoxia-induced Wnt5a-secreting fibroblasts promote colon cancer progression. **Nature Communications**, v. 16, art. 3653, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58748-9>.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 23 ago. 2025.

KHOSHBIN, K.; CAMILLERI, M. Colonic and intestinal barrier functions: implications for health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, p. 731–745, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0312-1>.

LARANJEIRA, L. L. S; TAHA, M. O; FERME, A; LEMOS, R; Plaple rH. (1998). Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. **Acta cirúrgica brasileira** [online], 13(3), 177-182. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-86501998000300008>>. Acesso em: 23 ago 2025.

LUESCHOW, Shiloh R.; MCELROY, Steven J. The Paneth cell: the curator and defender of the immature small intestine. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 587, 2020.

SILVA-REIS, Rita *et al.* An integrative approach to characterize the early phases of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in the rat. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 409, 2022.

TERNET, C. M.; KIEL, M. J. Wnt signaling in intestinal stem cells: lessons from mouse models. **Stem Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1098–1112, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.005>.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821–834, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>.

VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology Research**, v. 9, n. 1, p. 2–18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa004>.

YANG, L. *et al.* Tissue-location-specific transcription programs drive tumor dependencies in colon cancer. **Nature Communications**, London, v. 15, art. 1384, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45605-4>.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo, Brazil (Fapes) - Edital FAPES Universal nº 03/2017 [80707750/18].