

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE EM CÉLULAS CALICIFORMES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E ENVELHECIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL EM
RATOS.**

Larissa Honda Greco Lobo

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a): Prof.(a). Dr(a)
Patrícia Gama

São Paulo

2022

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. O intestino delgado	5
1.2. As células caliciformes	7
1.3. COVID-19.....	10
1.4. O desmame precoce	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Animais	12
3.2. Análise morfológica	14
3.3. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	15
4.1. Análise morfológica da mucosa de animais submetidos ao desmame precoce	15
4.2. Distribuição de células caliciformes	19
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS	25

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

TGI	Trato gastrointestinal
LGR5 leucina	Receptor 5 acoplado a proteína G contendo repetição rico em leucina
MUC2	Mucina 2
FCGBP	Proteína de ligação a IgGFc
CLCA1	Acessório 1 do canal de cloreto
ZG16	Proteína de grânulos de zimogênio 16
AGR2	Homólogo da proteína 2 do gradiente anterior
GalNAz	N-acetilgalactosamina modificada com azida
SARS-Cov-2	Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
TMPRSS2	Protease serina transmembranar 2
AM	Amamentado
DP	Desmame precoce
TA	Temperatura ambiente
HE	Hematoxilina e eosina
PAS	Ácido Periódico Schiff

RESUMO

O trato gastrintestinal possui como principais funções a digestão e a absorção de nutrientes através de células especializadas presentes no tecido epitelial. No intestino delgado, o desenvolvimento, a renovação e a regeneração da mucosa intestinal são controladas pelo nicho de células-tronco intestinais que está localizado na base das criptas. Contudo, diante de mudanças no padrão alimentar, ainda não se sabe qual o comportamento desse nicho. Visto que a amamentação possui papel importante no desenvolvimento da mucosa intestinal, o desmame precoce poderia desencadear alterações no processo de diferenciação e proliferação celular provocando modificações morfológicas importantes. Estudos recentes analisaram padrões epigenéticos de células epiteliais intestinais e demonstraram que a plasticidade da célula é mantida por um estado epigenético permissivo e que o direcionamento da maturação de células-tronco para uma linhagem celular específica é controlado por ativação de vias de sinalização e expressão de fatores de transcrição. Portanto, o objetivo do estudo é avaliar como o desmame precoce influencia na morfologia e distribuição de células caliciformes que afetam o crescimento e o envelhecimento do epitélio intestinal de ratos. Serão investigados os efeitos imediatos e os reflexos na vida adulta avançada (início do estágio de envelhecimento). Durante o desenvolvimento pós-natal, ratos Wistar serão submetidos ao desmame precoce e o intestino será coletado aos 18 e 120 dias para avaliação da organização morfológica da mucosa e distribuição de células caliciformes. Os resultados obtidos serão agrupados e analisados estatisticamente.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O intestino delgado

O intestino delgado é um dos órgãos do corpo humano que compõe o trato gastrointestinal (TGI) juntamente com boca, faringe, esôfago, estômago, intestino grosso, reto e ânus, sendo responsável principalmente pela secreção e absorção de nutrientes, além de funcionar como uma barreira sendo capaz de prevenir que patógenos e antígenos do ambiente externo entrem em contato com o tecido da mucosa. Assim, mantendo-a protegida (YANG et al, 2021).

O intestino delgado é anatomicamente subdividido em três partes, ainda que possuam constituição histológica semelhantes, sendo elas: o duodeno (parte inicial do intestino logo após o estômago), jejuno (parte central) e íleo (extremidade próxima ao intestino grosso) (VOLK et al, 2017). Sua camada mucosa é constituída de vilosidades intestinais, que são projeções alongadas do tecido epitelial em direção ao lúmen, e na lâmina própria, camada de tecido conjuntivo logo abaixo do epitélio, estão situadas na base das vilosidades, invaginações denominadas criptas (figura 1). As vilosidades possuem alta capacidade de absorção sendo considerado o compartimento funcional do intestino delgado e as criptas são responsáveis pela renovação do tecido epitelial sendo, então, considerado o compartimento proliferativo (DUNN, 1967).

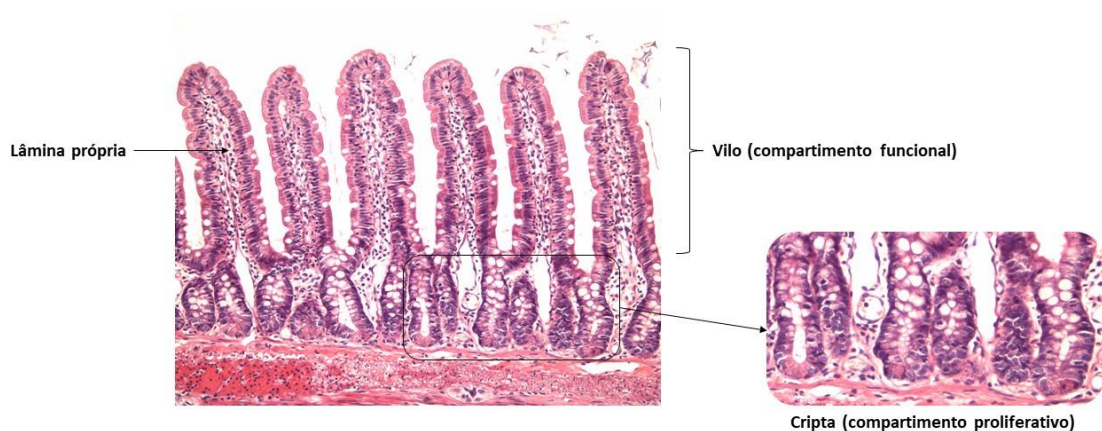


Figura 1. Imagem representativa do intestino delgado, na região do jejuno, indicando a lâmina própria, as vilosidades em direção ao lúmen e as invaginações denominadas criptas. Corte histológico corado em HE. Aumento original 20x.

As vilosidades e as criptas intestinais possuem uma população celular dinâmica e variada, constituída por cinco tipos de células principais: os enterócitos, as células caliciformes, as células enteroendócrinas, as células de Paneth e as células tufo (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017).

Os enterócitos são células epiteliais com microvilosidades que formam a borda em escova na região apical, apresentam em seu glicocálice enzimas como peptidases, dissacaridases (lactase, sacarase e maltase), lipases e fosfatase alcalina que são responsáveis por finalizar a digestão e, por fim, realizam a absorção dos nutrientes (VAN DER FLIER, CLEVERS, 2009). As células caliciformes são células produtoras de glicoproteínas formando grânulos de mucina abaixo da região apical da membrana que, ao formarem ligações cruzadas, vão compor o muco, o qual lubrifica e protege o revestimento intestinal (RADWAN, OLIVER, SPECIAN, 1990; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). As células enteroendócrinas são responsáveis pela secreção de hormônios peptídicos como enteroglucagon, somatostatina, colecistoquinina, serotonina, secretina, motilina e VIP que são essenciais para realizar a regulação do processo de digestão, motilidade intestinal, controle do apetite e metabolismo (MAY, KAESTNER, 2011). As células de Paneth, localizadas somente na cripta, apresentam grânulos secretórios contendo proteínas específicas como lisozimas, defensinas e peptídeos antimicrobianos com função de permeabilizar e digerir a parede celular de bactérias patogênicas (VAN DER FLIER, CLEVERS, 2009; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). Entretanto, estudos publicados nos últimos anos mostraram que as células de Paneth compõem o nicho de células tronco na cripta intestinal e interagem com células positivas a proteína G acoplada ao receptor de leucina 5 (LGR5) (SATO, CLAVERS, 2013). E, por fim as células tufo localizadas na cripta e no vilo, possuem papel importante na eliminação de parasitas no intestino através da secreção de IL-25 e recrutamento de eosinófilos e, também, demonstrou-se que as células tufo contribuem para a

regeneração epitelial após danos através da indução da proliferação de células-tronco e na promoção da recuperação do tecido pós-dano (GERBE, JAY, 2016).

O tecido epitelial do intestino delgado possui renovação rápida dependente da proliferação celular contínua que ocorre somente nas criptas, e da morte celular, no topo dos vilos. A proliferação celular nas criptas, se dá a partir de células tronco, e de células em transição em amplificação, das quais se originam células comprometidas com as diferentes linhagens, que migram ao longo do eixo cripta-vilo, dando origem às células características do intestino delgado (HEUBERGER et al., 2014; VAN DER FLIER et al., 2009).

Em humanos, ocorre a formação dos vilos por volta de 8 semanas de gestação na região do intestino proximal (MAHESHWARI, 2006). A maturação epitelial continua durante o período pós-natal até a infância sendo este processo modulado por hormônios e fatores de crescimento presentes na circulação sistêmica, fluido intersticial e leite materno (HIRAI et al., 2002; MONTGOMERY et al, 1999). Em ratos, o processo de crescimento é tardio durante a fase fetal (gestação de 21 dias). A partir do 15º dia há intenso processo proliferativo e reorganização tecidual para projeção dos vilos primitivos (DUNN, 1967), e do 18º ao 21º dia, as células epiteliais se diferenciam (WILSON, 1989).

Ao final da fase de amamentação, ocorre uma adaptação dietética, e a mucosa intestinal passa por mudanças, como a substituição de dissacaridases presentes na borda em escova (lactase para sacarase/isomaltase) e a diminuição da atividade endocítica do enterócito, resultando em fechamento das junções intercelulares (XIONG et al., 2015).

1.2. As células caliciformes

As células caliciformes possuem esse nome devido ao seu típico formato de cálice ou taça que é formado por conta dos grânulos de mucina que estão presentes no citoplasma preenchendo o interior dessas células (figura 2). Os grânulos de mucina possuem como seu principal componente a glicoproteína MUC2, porém, outros componentes proteicos também estão presentes em menor quantidade como FCGBP, CLCA1, ZG16 e AGR2. Foi demonstrado em estudos que, camundongos que não possuíam a glicoproteína MUC2,

apresentavam a mesma quantidade de células caliciformes, porém elas não possuíam o formato de cálice (BIRCHENOUGH et al, 2015).



Figura 2. Imagem representativa do intestino delgado, na região do jejuno, indicando as células caliciformes marcadas com PAS no vilo e no compartimento cripta. Corte histológico com reação histoquímica com Ácido Periódico Schiff (PAS) e posteriormente corado em HE. Aumento original 20x.

Como já mencionado anteriormente, as células caliciformes são extremamente importantes para a proteção do revestimento intestinal através da produção de muco. Por muito tempo, os imunologistas não entendiam ao certo como não ocorria o desencadeamento de uma resposta do sistema imune contra a população de bactérias que formam a microbiota intestinal em um contexto em que se assumia que essa população bacteriana ficava em contato direto com as células epiteliais. Porém, essa hipótese foi descartada quando se observou que entre a microbiota e as células epiteliais do intestino delgado havia uma camada de muco as separando, o que funciona como uma primeira barreira limitando as interações entre elas (SWIDSINSKI et al, 2007).

Além de promover proteção contra patógenos externos, o muco intestinal também reduz o estresse mecânico no epitélio causado pelo conteúdo alimentar, através da lubrificação da região (CONE, 2009). O muco é um gel complexo composto de 95% de água, 0,5-5% de glicoproteínas e lipídios, 0,5-1% de sais minerais e 1% de proteínas livres (RATHBONE et al, 1991). A principal

glicoproteína produzida e secretada pelas células caliciformes é a mucina 2 (MUC 2), uma molécula grande (contendo aproximadamente 5.100 aminoácidos) e extensivamente O-glicosilada, sendo ela responsável por conferir a propriedade viscosa formadora de gel observada no muco, através da formação de polímeros (KIM, 2010). O polímero formado pelas moléculas de mucina se liga com água, assim, limitando e desacelerando a difusão de microrganismos para a camada mais interna do epitélio. Há duas camadas de muco recobrindo o epitélio intestinal. A primeira camada é estéril e firmemente aderida à superfície epitelial, e apresenta em sua composição peptídeos antibacterianos secretados pelas células de Paneth e enterócitos, e a segunda camada mais externa em contato com o lúmen, possui uma composição mais fluida para que a adesão de bactérias residentes da microbiota intestinal seja facilitada (ATUMA et al, 2001).

A renovação das camadas de muco no intestino se dá a partir da secreção de muco contínua realizada pelas células caliciformes. Estudos conduzidos a partir da marcação de glicoproteínas in vivo utilizando N-acetilgalactosamina modificada com azida (GalNAz), a qual é incorporada nos glicanos durante o processo de biossíntese de proteínas, mostraram que as células caliciformes presentes nas criptas superiores, acumulam material dentro dos grânulos de forma gradual e secretam o muco lentamente. Enquanto, as células caliciformes presentes nos vilos, apresentaram biossíntese de glicoproteínas e secreção de muco de forma mais rápida. Além disso, nesse mesmo estudo foi observado, algumas horas após a injeção de GalNAz, uma grande secreção de muco na região das criptas superiores, o que poderia indicar uma resposta de proteção induzida das células caliciformes presentes nessa região (JOHANSSON, 2012).

A integridade da camada de muco intestinal é extremamente importante para o mantimento da homeostase. Estudos em ratos mostram que, em uma condição em que as células caliciformes não produzem normalmente a molécula de MUC2, a rede de moléculas para formar a camada de muco não ocorre de forma efetiva ocorrendo um aumento da permeabilidade dessa barreira. Com isso, patógenos que antes não conseguiam atravessar a camada de muco para penetrar a mucosa intestinal, agora estão em contato direto com a camada epitelial favorecendo as infecções por esses patógenos. Assim, ocorre a ativação do sistema imune inato e o desencadeamento do processo inflamatório podendo

acarretar o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas que, se não tratadas, podem levar ao surgimento de câncer (VAN DER SLUIS et al, 2006).

Além disso, foi demonstrado em experimentos com indução de infecção intestinal de nematoides que, em camundongos que produzem MUC2 normalmente, os parasitas provocam uma hiperplasia das células caliciformes, ocorrendo um aumento na síntese de MUC2 e, conseqüentemente, o aumento da secreção de muco. Assim, aumentando a motilidade intestinal provocando a expulsão do nematoide. Porém, em camundongos com deficiência de MUC2, foi observado que houve o aumento da produção de MUC2 pelas células caliciformes de forma significativamente mais lenta quando comparado ao grupo citado anteriormente causando uma maior dificuldade na expulsão do parasita (HASNAIN et al, 2010).

1.3. COVID-19

A COVID-19 é uma doença causada pela infecção do vírus SARS-Cov-2, comumente denominado coronavírus, que continua provocando grandes preocupações para a saúde pública mundial (AL-QAHTANI, 2020). O SARS-COV-2 é um vírus transmitido majoritariamente pela inalação de gotículas liberadas pelos infectados (HUI, 2017). Possui como principais sintomas apresentados pelos pacientes infectados: febre, tosse seca, dispnéia, fadiga e pneumonia (CASCELLA et al, 2020). Porém, hoje se observa que 1/3 dos pacientes infectados pelo coronavírus também apresentam sintomas gastrointestinais como diarreia, náusea, dores abdominais e hematoquezia (SONG et al, 2020).

Sua infecção nas células se dá através da ligação da proteína spike, presente em sua membrana superficial, ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), sendo então processada pela protease serina transmembranar 2 (TMPRSS2) para chegar no citoplasma da célula hospedeira (HOFFMANN et al, 2020). A ECA2 e TMPRSS2 são altamente expressas no epitélio pulmonar alveolar tipo II e células ciliadas (LUKASSEN et al, 2020). Yin W. et al reportaram em suas análises fisiopatológicas as mudanças no epitélio das vias respiratórias causadas pela COVID-19 em um paciente infectado. O estudo mostra que o epitélio dos pulmões desse paciente apresentava um

aumento dramático da quantidade de células caliciformes o que provocou um grande acúmulo de muco em muitos bronquíolos. Além disso, foi observado que o número de células multiciliadas e células do grupo bronquiolar foram significativamente reduzidas (YIN et al, 2021).

Ainda que as células presentes nas vias respiratórias sejam a principal porta de entrada para a infecção do SARS-CoV-2, o intestino delgado também pode ser uma região de entrada muito relevante com sítios de interações importantes para o vírus visto que, os enterócitos são células intestinais ricas em receptores de ECA2, assim como as células presentes nas vias respiratórias (TO et al, 2004). Alguns fatos suportam essa hipótese como os sintomas gastrointestinais apresentados por alguns pacientes no início do curso da doença e a constatação de que os vírions do SARS-CoV são preferencialmente liberados na região apical das células das vias respiratórias e não na região basal. Assim, os vírions liberados podem ser removidos via depuração mucociliar e possuir acesso ao TGI através de uma exposição luminal (JIA et al, 2005). Além disso, Wei et al. Recentemente mostrou que a diarreia está associada à piora da febre e dispneia em pacientes com COVID-19. Nesse mesmo estudo, pacientes CoV-2 com pneumonia, a presença de diarreia foi associada à diminuição da depuração viral. Assim, sugerindo que o envolvimento do TGI leva a uma carga viral mais alta e/ou eliminação viral mais prolongada (WEI et al, 2021).

1.4. O desmame precoce

No período do desenvolvimento pós-natal, a amamentação é um fator importante na programação do crescimento, pois o colostro e o leite materno são os principais alimentos ingeridos pelo neonato provendo aminoácidos, anticorpos e microrganismos que atuam tanto na maturação intestinal como na função imunoreguladora influenciando várias funções do tubo digestório. Além disso, contribuem para defesa do bebê contra patógenos bacterianos e virais, dando auxílio para a redução do grau de virulência, como na infecção por COVID-19 (KOLDOVSKÝ et al., 1995; LETTERIO et al., 1994; DONOVAN E ODLE, 1994; WADA E LÖNNERDAL, 2020; ROGIER et al., 2014; VASQUES DA COSTA et al, 2021).

Em ratos, o aleitamento é gradativamente substituído pela ingestão de alimento sólido da terceira para a quarta semana de vida pós-natal, caracterizando a fase do desmame levando a uma mudança de composição nutricional de leite materno rico em gorduras e baixo carboidrato (sendo a lactose mais prevalente), para uma dieta com maior teor de carboidrato e fibras (HENNING, 1985). Entretanto, para fins experimentais, em biotérios, o desmame é normalmente realizado no 21º dia de vida pós-natal. Em contrapartida, o desmame precoce se caracteriza pela abrupta separação materna e retirada do leite e de todos os seus fatores antecipadamente.

2. OBJETIVOS

O objetivo do estudo é avaliar como o desmame precoce influencia na morfologia e distribuição de células caliciformes que afetam o crescimento e o envelhecimento do epitélio intestinal de ratos. Serão investigados os efeitos imediatos visto em filhotes após o desmame e os reflexos na vida adulta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Machos e fêmeas de ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar produzida em padrão SPF no Biotério de Produção de Ratos, Rede USP de Biotérios) foram acasalados e as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os animais permaneceram com acesso à ração e água *ad libitum*, e foram mantidos sob um ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, com temperatura (22º a 24ºC) e exatidão controladas. O protocolo experimental foi certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA ICB 115/2017).

Foram utilizados animais de ambos os sexos e o dia do nascimento dos filhotes foi anotado como zero. No 3º dia de vida pós-natal, as ninhadas foram reduzidas a 8-9 filhotes para melhor distribuição e equilíbrio alimentar. Para o desmame precoce, os filhotes foram divididos aleatoriamente em: grupo amamentado-controle (AM) e desmame precoce (DP) a partir do 15º dia de vida

pós-natal. Os animais DP foram separados de suas mães e mantidos em outra gaiola, onde a dieta passou a ser uma pasta de ração, disponível 24 horas/dia (OSAKI et al., 2010). Duas vezes ao dia, os filhotes também receberam alimento e água através de pipeta descartável e foram massageados na região abdominal para facilitar a excreção de urina e fezes. Já os animais do grupo controle permaneceram com suas mães até o 21º dia, quando foi realizado o desmame, conforme padrão do biotério. Nesse caso, para que não houvesse ingestão excessiva de leite materno e indução de sobrepeso, controlou-se o número de filhotes que ficaram em companhia da mãe, por meio da substituição dos animais em experimentação por outros que não foram usados para a coleta, de maneira a manter um número de 6 a 8 por mãe no grupo controle. Um procedimento semelhante foi usado no grupo em desmame precoce para que não houvesse indução de estresse por isolamento dos filhotes (OSAKI et al, 2010).

Os animais foram eutanasiados aos 18 e 120 dias de vida pós-natal conforme ilustrado no desenho experimental (figura 3). Em todos os procedimentos foram utilizados 3-5 animais/grupo experimental. A massa corpórea dos animais foi monitorada durante todo o processo. A coleta do intestino delgado foi feita sob anestesia com injeção intraperitoneal de cloridratos de cetamina e xilazina (Vetbrands, Paulínia, SP, Brasil) em dose excessiva (1:1, dose de 0,5 ml/100g de massa corpórea). O intestino delgado na região mediana do jejuno foi aberto e a mucosa foi coletada para fixação em formaldeído 10% para estudo morfológico em microscopia de luz.

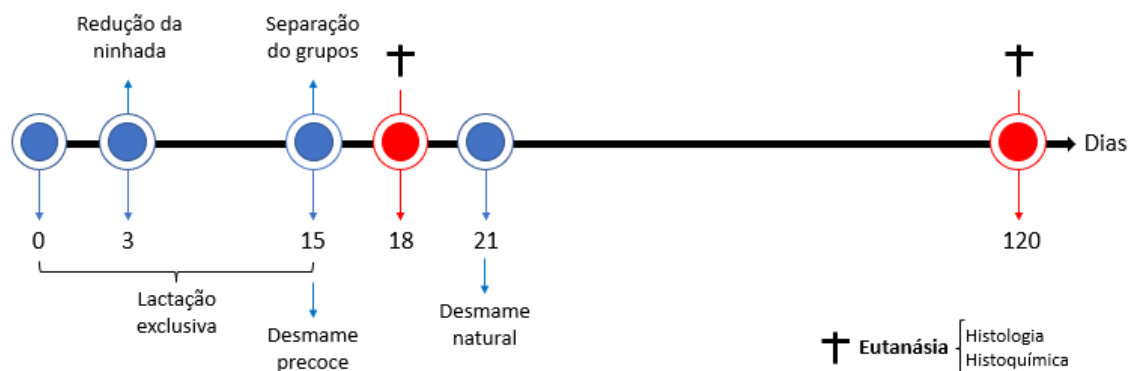


Figura 3. Linha do tempo experimental indicando o tratamento das ninhadas, indução do desmame precoce (15 dias) e idades nas quais foram realizadas as coletas (18 e 120 dias).

3.2. Análise morfológica

Para cada animal, a preparação dos animais e a realização da coleta dos materiais foi feita pelo grupo em que um segmento do jejuno foi retirado, aberto e acomodado sobre um fragmento de papel cartão, lavado com solução salina 0,9% e mergulhado em solução de formaldeído 10% para fixação por 4 horas. Após esse período, o material foi transferido para álcool 70%, e para a inclusão, as amostras foram desidratadas em uma sequência de álcool 95° (1 h); álcool 100° (2 x 1 h); diafanizadas em xilol (2 x 1h); impregnadas com parafina a 60°C (3 x 1 h), e incluídas em parafina. O bloco com material incluso esfriou em temperatura ambiente (TA).

Para realização das análises morfológicas, foram feitos cortes não seriados de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Adicionalmente, para observação de células caliciformes, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos acima e as lâminas passaram pela reação histoquímica com Ácido Periódico Schiff (PAS) com contra coloração de hematoxilina.

Para a realização da reação histoquímica com Ácido Periódico Schiff (PAS) primeiramente realizou-se a desparafinização das lâminas. Após a desparafinização, as lâminas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e tratadas pelo Ácido Periódico 1% por 10 minutos. As lâminas então foram lavadas em 3 frascos com água destilada e tratadas com o reativo de Schiff por 20 minutos. Logo em seguida, as lâminas foram lavadas novamente em água de torneira por 10 minutos e coradas pela Hematoxilina de Harris por 3 minutos. Realizada a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada até a retirada do excesso do corante, desidratadas e, por fim, montadas.

Para análise da morfologia, a captura das imagens foi realizada com aumento de 20x para o vilo e 40x para cripta. O registro das imagens foi realizado

através de um computador acoplado a um microscópio de luz e conectado a um sistema fotográfico (Olympus Bx51, Montreal, Canada). Para medidas de vilosidades e cripta, foi realizada a quantificação de 10 campos por animal. Para avaliação de células caliciformes, foram contados 5 campos por animal. A contagem foi realizada a partir do software de análise de imagem Image ProPlus v.5.2 (Média Cybernetics, Bethesda, USA).

3.3. Análise estatística

Foi utilizado para as análises estatísticas o programa GraphPad Prisma 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA). Os resultados obtidos foram agrupados de acordo com os grupos experimentais, representados individualmente e a média $\pm$ DP foi indicada para cada grupo. Utilizamos o teste ANOVA *one way* seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey em caso de significância. Adotado $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise morfológica da mucosa de animais submetidos ao desmame precoce

Ao analisarmos os materiais coletados sob o microscópio de luz, observamos claramente uma diminuição no tamanho dos vilos dos animais DP em relação aos AM nos animais de 18 dias. De forma contrária, ao analisarmos as criptas, nenhuma diferença na profundidade foi observada entre AM e DP em ambas as idades. Porém, notamos um aumento grande na profundidade das criptas entre os animais de idades diferentes sob o mesmo tratamento.

Nossos resultados mostram que ocorreu uma redução da altura do vilo aos 18 dias no grupo submetido ao desmame precoce (DP) quando comparado ao grupo amamentado (AM) ($P < 0,05$) (Figura 1B). Entretanto, essa diferença não foi vista aos 120 dias (Figura 1B) em que se observa que o comprimento do vilo permaneceu o mesmo entre os grupos analisados. Ao fazermos uma análise comparativa da altura do vilo nos respectivos grupos AM e DP no decorrer das idades, podemos notar que os animais AM apresentam uma redução do comprimento do vilo entre 18 e 120 dias ($P < 0,05$) (Figura 1B), enquanto, os

ratos do grupo DP, apresentam um crescimento aos 120 dias ($P < 0,05$) (Figura 1B).

Em relação ao compartimento da cripta, nossos resultados mostram que somente o parâmetro do desenvolvimento das idades apresentou diferença entre os mesmos grupos ($P < 0,05$) (Figura 2B). Ao fazermos uma análise comparativa da profundidade da cripta no decorrer das idades nos respectivos grupos, AM e DP, é possível notar que ambos os grupos de animais, AM e DP, apresentaram um aumento da profundidade da cripta entre 18 e 120 dias ($P < 0,05$) (Figura 2B).

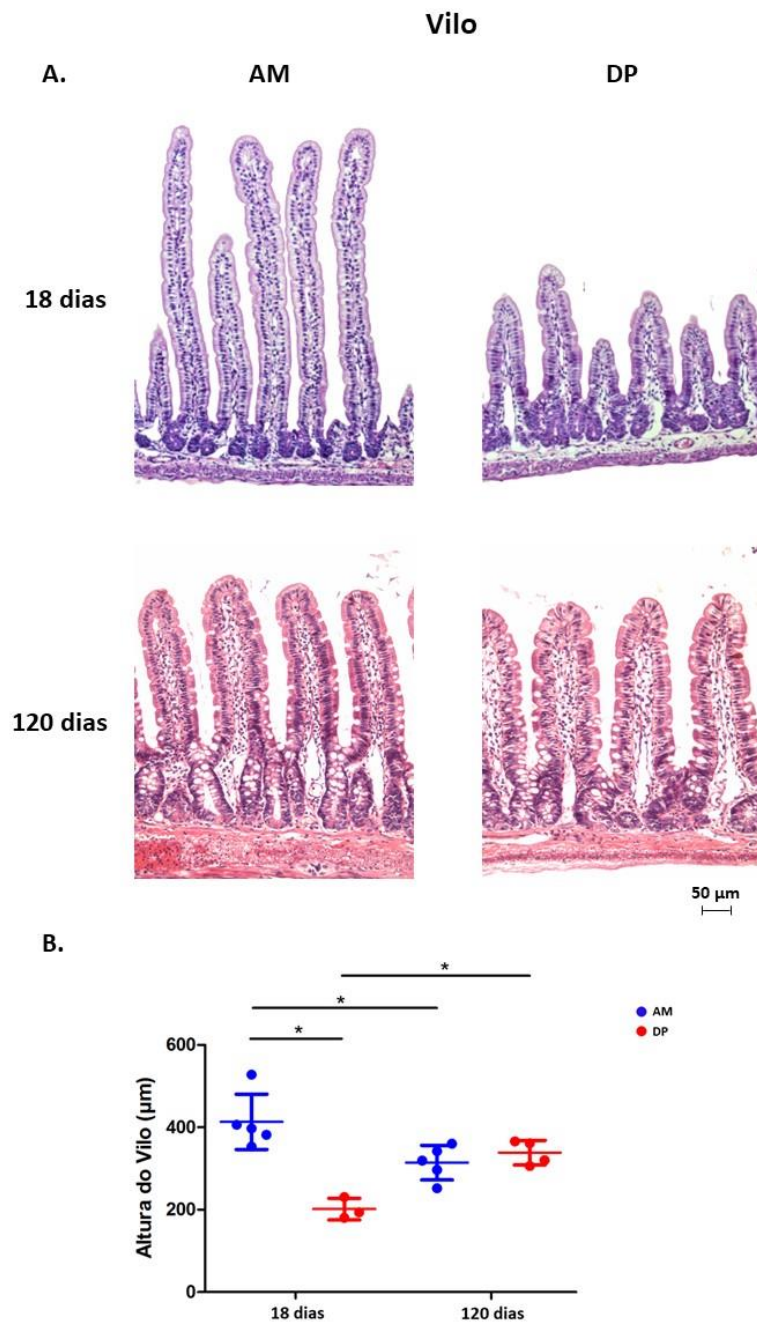


Figura 4. Análise morfológica do jejuno (vilo) de ratos submetidos ao desmame precoce aos 18 e 120 dias de vida pós-natal. A. Imagens representativas da mucosa intestinal (vilo) nos grupos amamentado (AM) e desmame precoce (DP) nas diferentes idades. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). **B.** Análise morfométrica da altura do vilo comparado entre AM e DP nas diferentes idades. Cada ponto representa um animal e as barras indicam a média $\pm$ DP. Foram analisados 10 campos por animal. Análise por ANOVA seguida por teste de Tukey $*P < 0,05$.

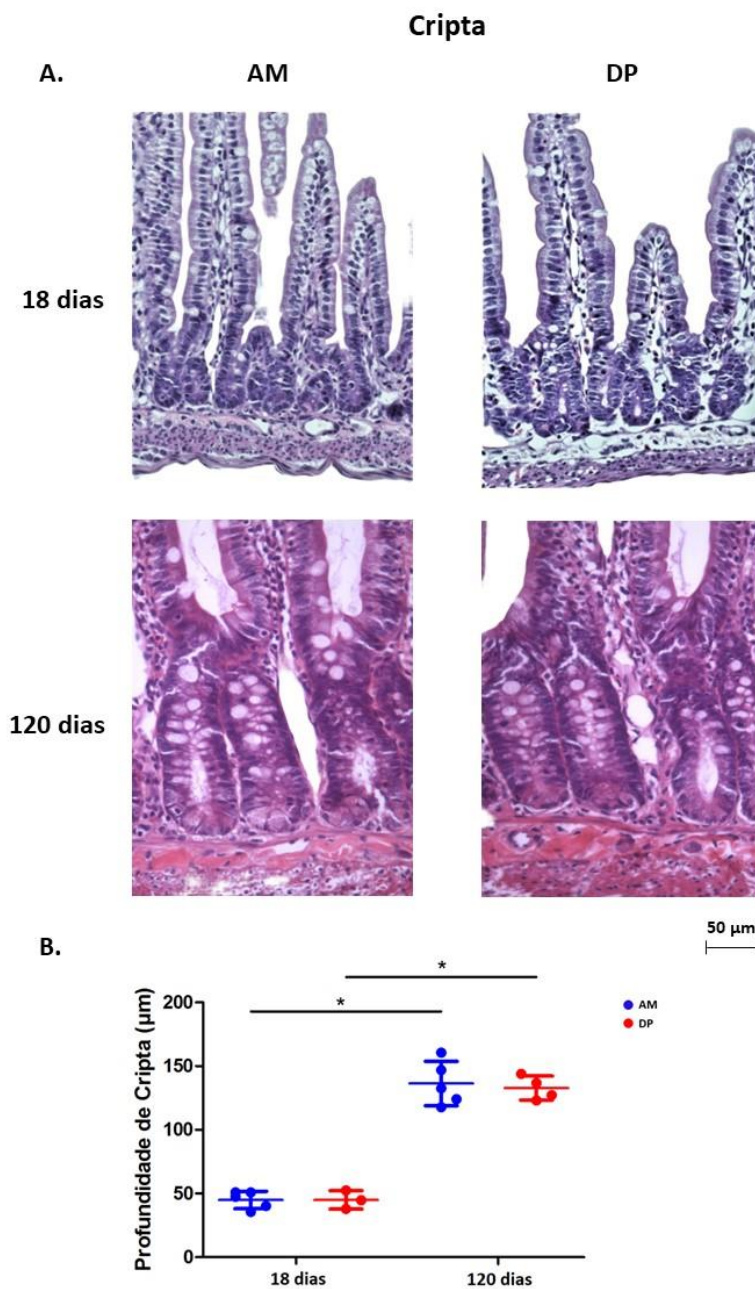


Figura 5. Análise morfológica do jejuno (cripta) de ratos submetidos ao desmame precoce aos 18 e 120 dias de vida pós-natal. A. Imagens representativas da mucosa intestinal (cripta) nos grupos amamentado (AM) e desmame precoce (DP) nas diferentes idades. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). **B.** Análise morfométrica da altura da cripta comparado entre AM e DP nas diferentes idades. Cada ponto representa um animal e as barras indicam a média $\pm$ DP. Foram analisados 10 campos por animal. Análise por ANOVA seguida por teste de Tukey * $P < 0,05$.

4.2. Distribuição de células caliciformes

Após o desmame precoce, analisamos também o número de células caliciformes positivas para a reação com PAS distribuídas ao longo do eixo cripta-vilo (Figura 3A e 4A). A reação de PAS (Ácido Periódico Schiff) é um método histoquímico de coloração em que o ácido periódico reage com macromoléculas de carboidratos (glicogênio e glicoproteínas neutras), como a mucina, produzindo aldeídos que, ao reagirem com o reagente de Schiff gera um produto com a cor de púrpura-magenta.

Ao observarmos os vilos no microscópio de luz, notamos uma menor quantidade de células caliciformes nos animais DP em relação aos animais AM aos 18 dias devido ao tamanho menor do vilo nos animais DP também observado. Esse aumento da quantidade de células caliciformes também é notável nos animais de 120 dias, em ambos os tratamentos, em relação aos animais de 18 dias. Já nas criptas, notamos um aumento grande na quantidade de células caliciformes entre os animais de idades diferentes sob o mesmo tratamento, assim como observado na profundidade.

Em relação ao vilo, nossos resultados mostram que o número de células caliciformes PAS-positivas/campo no vilo aos 18 dias no grupo submetido ao desmame precoce (DP) diminuiu de forma significativa quando comparado ao grupo controle AM ($P < 0,05$) (Figura 3B). De forma inversa, aos 120 dias no grupo submetido ao desmame precoce (DP) observamos um aumento do número de células caliciformes em relação ao grupo controle AM ($P < 0,05$) (Figura 3B). Além disso, pudemos observar que o número de células caliciformes, quando comparado ao longo das idades entre os mesmos grupos, apresentou um aumento tanto no grupo DP quanto no grupo controle AM ($P < 0,05$) (Figura 3B).

Em relação ao compartimento cripta, observamos a influência do desmame precoce no número de células caliciformes somente nos animais de 120 dias em que se constata um aumento no grupo DP quando comparado ao grupo controle AM ($P < 0,05$) (Figura 4B).

Assim como observado no vilo, o fator idade também provocou aumento no número de células caliciformes no compartimento cripta tanto nos grupos DP quanto nos grupos AM ($P < 0,05$) (Figura 4B).

Aos compararmos os resultados obtidos com a análise da altura do vilo e profundidade da cripta ao longo do tempo, identificamos que a distribuição da população de células caliciformes foi paralela à variação do tamanho do vilo e da profundidade de cripta em ambos os grupos analisados ($P < 0,05$) (Figuras 1B, 2B, 3B e 4B).

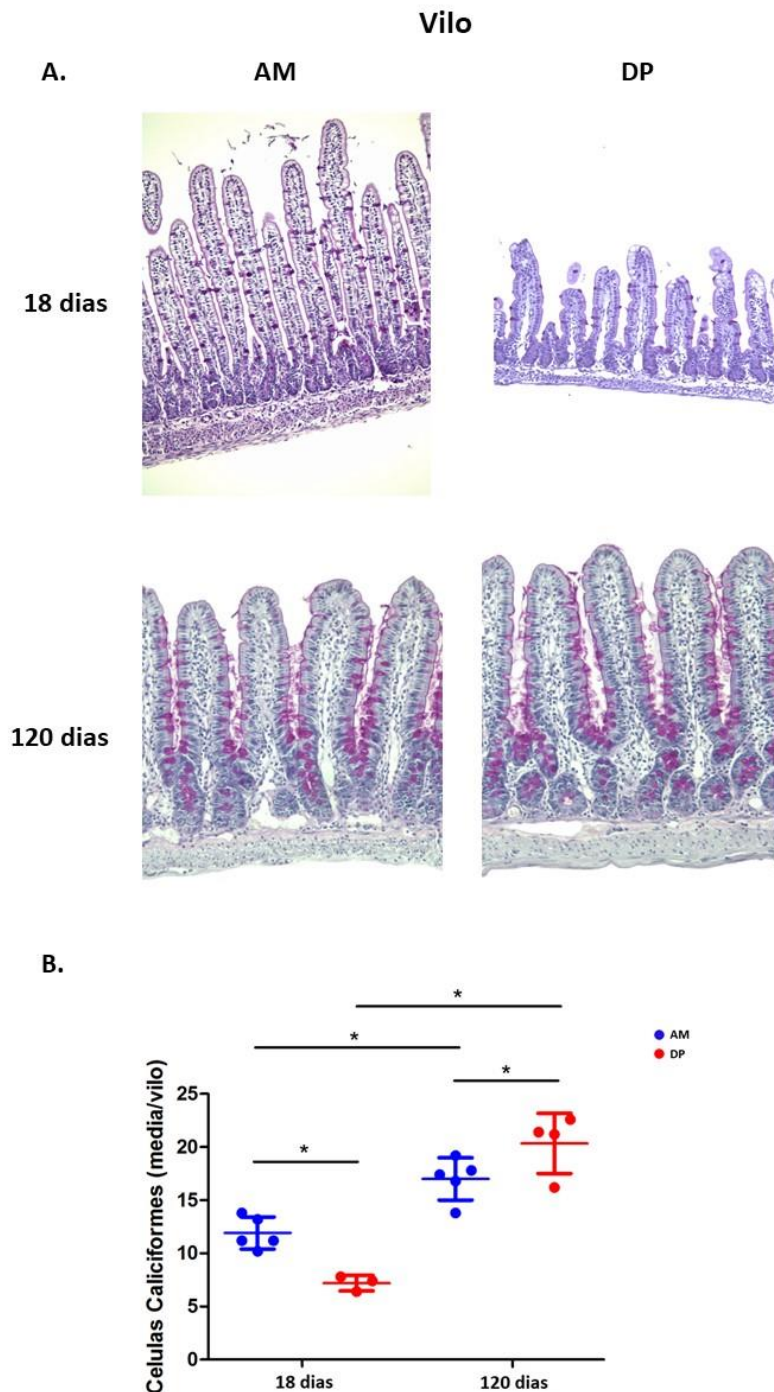


Figura 6. Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de células caliciformes no vilo. **A.** Imagens representativas da mucosa do jejuno (vilo) após reação histoquímica com PAS e contra coloração com hematoxilina. Estão evidenciadas as células caliciformes ao longo do vilo (aumento original de 20x). **B.** Número de células caliciformes positivas/campo. Cada ponto no gráfico representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam a média $\pm$ DP. Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey $P < 0,05$.

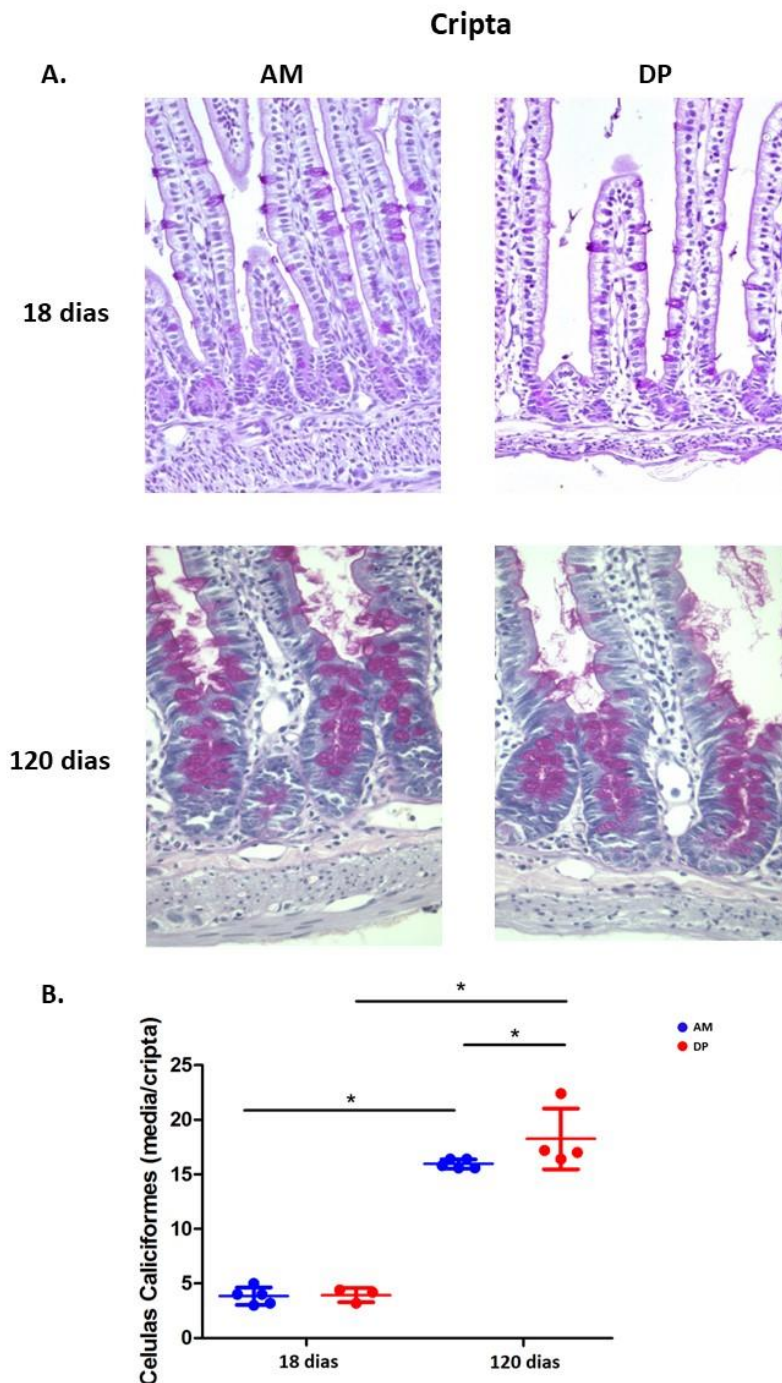


Figura 7. Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de células caliciformes na cripta. A. Imagens representativas da mucosa do jejuno (cripta) após reação histoquímica com PAS e contra coloração com hematoxilina. Estão evidenciadas as células caliciformes ao longo da cripta (aumento original de 40x). **B.** Número de células caliciformes positivas/campo. Cada ponto no gráfico representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam a média $\pm$ DP. Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento funcional do intestino ocorre no período do desmame que é considerado adaptativo para transição dietética (MIYATA, 2008). A primeira infância é definida por um período de amamentação, seguido por um desmame gradual e um novo padrão alimentar com a introdução da dieta sólida. Esta fase de transição alimentar é caracterizada por mudanças na composição corporal, velocidade na maturação e função do metabolismo celular. Neste estudo, nosso objetivo foi investigar os efeitos imediatos e tardios do desmame precoce sobre as células caliciformes e sua correlação com possíveis mudanças estruturais do epitélio intestinal.

Em relação a morfologia do epitélio intestinal, observamos que ocorreu uma significativa atrofia do vilo nos animais DP de 18 dias e nos grupos controle com o decorrer da idade. Porém, observamos que houve uma recuperação parcial do tamanho do vilo aos 120 dias em animais DP. De forma contrária, Dunsford et al demonstraram em seus estudos com porcos desmamados aos 21 dias, no qual mediu-se o tempo de recuperação da altura do vilo após o desmame, que a altura reduzida das vilosidades teve um período de duração de 8 a 12 dias após o desmame (DUNSFORD et al, 1989). Em outros estudos realizados com ratos submetidos ao desmame precoce, demonstrou-se que modificações na dieta podem ser eventos estressantes para o organismo provocando alterações morfológicas no epitélio intestinal dos animais, como foi demonstrado que houve o encurtamento do vilo e posteriormente, uma recuperação do tamanho correlacionado com o crescimento do animal (LEE et al, 1983). Essa resposta poderia sugerir que ocorreu uma adaptação necessária para o processo de digestão e absorção. Atualmente na literatura, há poucos estudos que mostram de forma clara o efeito do desmame precoce sobre a morfologia intestinal nas idades que estudamos.

Outro fator importante para a dinâmica de crescimento da mucosa intestinal refere-se à profundidade da cripta. Uma maior profundidade de cripta pode indicar que a atividade proliferativa está aumentada (PLUSKE et al., 1997), porém também pode estar associada à cinética de alteração do eixo cripta-vilo, como um todo. Em nosso estudo, somente observamos diferença significativa

em relação ao aumento da profundidade de cripta ao longo da idade, o que pode estar associado ao crescimento e desenvolvimento do animal. Em estudos anteriores, foi observado por Lin et al. (1998) que o desmame precoce aumenta a proliferação do epitélio intestinal (células marcadas com BrDU) em animais até os 21 dias de vida pós-natal (LIN et al., 1998).

Como discutimos anteriormente, a camada de muco produzida pelas células caliciformes possui um papel importante no processo de defesa, formando uma barreira protetora que impede o contato dos microrganismos com o epitélio, além de promover a proteção do epitélio intestinal contra atritos mecânicos provenientes de alimentos. Nosso estudo demonstrou uma redução da quantidade de células caliciformes no vilo em animais de 18 dias que foram desmamados precocemente. Com isso, essa importante barreira formada pelo muco no epitélio intestinal pode ser prejudicada levando a uma maior suscetibilidade a infecções por patógenos, gerando uma maior probabilidade de desencadear respostas inflamatórias na região. Um estudo com porcos desmamados aos 14 dias apresentou redução das células caliciformes e um impacto negativo na imunidade inata do animal (CRISPEL,2019). Além disso, a redução das células caliciformes aliada com a diminuição do crescimento do vilo aos 18 dias pode afetar também a eficiência da capacidade absorptiva do intestino delgado ao longo do desenvolvimento. Em contrapartida, observamos que ao longo do envelhecimento, houve o aumento da quantidade de células caliciformes aos 120 dias no vilo e na cripta em animais de ambos os tratamentos. Uma hipótese para explicar esse resultado poderia ser o aumento da diferenciação celular com o passar da idade como efeito compensatório para garantir a proteção da mucosa. Também observamos um aumento da quantidade de células caliciformes em animais DP de 120 dias, quando comparados aos animais AM, tanto no vilo como na cripta, o que poderia indicar uma resposta protetora tardia mais acentuada da mucosa desencadeada pelo estresse provocado pelo desmame precoce.

Visto que situações que provocam estresse em regiões onde há a presença de células caliciformes levam a alterações na quantidade dessas células como o desmame precoce, tanto no vilo como na cripta, no epitélio intestinal e a infecção pelo vírus SARS-Cov-2 no epitélio das vias respiratórias causando um

grande aumento da quantidade de células caliciformes nessa região, estudos analisando a resposta do epitélio intestinal com relação à quantidade de células caliciformes durante ou após a infecção pelo SARS-Cov-2 poderiam trazer um melhor entendimento relacionado aos sintomas gastrointestinais apresentados pelo paciente durante a doença e se essa infecção provoca alterações permanentes no epitélio intestinal.

6. CONCLUSÃO

Ao final do nosso projeto, nossos resultados permitem concluir que:

- ✓ O desmame precoce induziu uma atrofia dos vilos em animais de 18 dias;
- ✓ O desmame precoce provocou uma redução do número de células caliciformes no vilo em animais de 18 dias;
- ✓ O desmame precoce provocou um aumento do número de células caliciformes no vilo e nas criptas em animais de 120 dias como possível resposta protetora do epitélio intestinal;
- ✓ O fator idade se mostrou ter influência na morfologia das criptas provocando o aumento da sua profundidade e da quantidade de células caliciformes marcadas.
- ✓ O fator idade se mostrou ter influência na morfologia dos vilos provocando o aumento da quantidade de células caliciformes marcadas.

Com isso, nosso estudo mostra que as respostas celulares ao DP podem ser duradouras e permanentes na mucosa intestinal, indicando que a amamentação regular é fundamental para o desenvolvimento do intestino delgado e sua manutenção na vida adulta.

7. REFERÊNCIAS

ATUMA C.; STRUGALA V.; ALLEN A.; HOLM L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. 922–929, 2001.

AL-QAHTANI, A.A., 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): emergence, history, basic and clinical aspects. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 27, p. 2531-2538, 2020.

BIRCHENOUGH G.M.H.; JOHANSSON M.E.V.; GUSTAFSSON J.K.; BERGSTRÖM J.H.; HANSSON G.C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. **Mucosal Immunol.**, v.8, p. 712-719, 2015.

CASCELLA, M., RAJNIK, M., CUOMO, A., DULEBOHN, S.C., DI NAPOLI, R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19), **StatPearls Publishin**, 2020.

CONE R.A.; Barrier properties of mucus. **Adv Drug Deliv Ver**, v.61, p. 75–85, 2009.

CRISPEL Y. et al. The Effect of Weaning Age on the Small Intestine Mucosa of Rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 44(9), p. 985-989, 2019.

DONOVAN S.M.; ODLE J. Growth factors in milk as mediators of infant development. **Annu Rev. Nutr.**, v. 14, p. 147-167, 1994.

DUNN, J. S. The fine structure of the absorptive epithelial cells of the developing small intestine of the rat. **J. Anat.**, p. 57–68, 1967.

DUNSFORD, B. R.; KNABE, D. A.; HAENSLY, W. E. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pig 1. **J. Anita. Sci.**, 1989.

GERBE, F. and JAY, P. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 6. 2016.

HASNAIN S.Z.; WANG H.; GHIA J.E. et al. Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. **Gastroenterology**, v.138, p. 1763–1771, 2010.

HENNING, S. J. Ontogeny of enzymes in. **Ann. Rev. Physiol**, n. 38, p. 231–245, 1985.

HEUBERGER, J. et al. Shp2 / MAPK signaling controls goblet / paneth cell fate decisions in the intestine. **PNAS**, v. 111, n. 9, 2014.

HIRAI, C. et al. Trophic Effect of Multiple Growth Factors in Amniotic Fluid or Human Milk on Cultured Human Fetal Small Intestinal Cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 34, p. 524–528, 2002.

HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, p. 271–280, 2020.

HUI, D.S., 2017. Epidemic and emerging coronaviruses (severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome). **Clin. Chest Med.**, v. 38, p. 71-86, 2007.

JIA HP, LOOK DC, SHI L, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. **J Virol**, v. 79, p. 14614-14621, 2005.

JOHANSSON M.E.V. Fast Renewal of the Distal Colonic Mucus Layers by the Surface Goblet Cells as Measured by In Vivo Labeling of Mucin Glycoproteins. **PLoS ONE**, v.41009, p. 7, 2012.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO J. C. **Histologia Básica**, 13^a edição, 2017.

KIM Y.S., Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 12 p. 319–33, 2010.

KOLDOVSKÝ O.; DOBIÁŠOVÁ M.; HAHN P.; KOLÍNSKÁ J.; KRAML J.; PÁCHA J. Development of Gastrointestinal Functions. **Physiology**, v. 44, p. 341-348, 1995.

KLAUS M., LUCIA C.F., STEFFEN R. COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 112, p. 383-388, 2020.

LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Early Weanling and Precocious Development of Small Intestine in Rats : Genetic , Dietary or Hormonal Control. **Pediatr. Res**, v. 650, p. 645–650, 1983.

LETTERIO J.J.; GEISER A.G.; KULKARNI A.B.; ROCHE N.S.; SPORN M.B.; ROBERTS A.B. Maternal Rescue of Transforming Growth Factor- β 1 Null Mice. **Science**, v. 264, p. 1936-1938, 1994.

LEUNG WK, TO KF, CHAN PK, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1011-7, 2003.

LIN, C. et al. Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Early Weaning Induces Jejunal Ornithine Decarboxylase and Cell Proliferation in Neonatal Rats 1 , 2. **The Journal of nutrition**, p. 1636–1642, 1998.

LUKASSEN S, CHUA RL, TREFZER T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. **EMBO J**, v. 105114, p.39, 2020.

MAHESHWARI, A. Ontogeny of the intestinal immune system. **Immunology and Infection**, v. 2, n.10, p. 18–26, 2006.

MAY, C. L.; KAESTNER, K. H. Gut Endocrine Cell Development. **Moll Cell Endocrinol.**, v. 323, n. 1, p. 70–75, 2011.

MONTGOMERY, R. K.; MULBERG, A. E.; GRAND, R. J. Development of the Human Gastrointestinal Tract . **Gastroenterology**, p. 702–731, 1999.

MIYATA T, MINAI Y and HAGA M. Impaired Growth of Small Intestinal Epithelium by Adrenalectomy in Weaning Rats. *Acta Histochem.* **Cytochem**, v. 41 (4), p. 83–88, 2008.

OSAKI, L. H.; CURI, M. A. F.; ALVARES, E. P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa : Possible role of TGF α / EGFR. **Differentiation**, v. 79, p. 48– 56, 2010.

RADWAN, K. A.; OLIVER, M. G.; SPECIAN, R. D. Cytoarchitectural Reorganization of Rabbit Colonic Goblet Cells During Baseline Secretion. **The American Journal of Anatomy**, v. 376, p. 365–376, 1990.

RATHBONE M.J.; HADGRAFT J. Absorption of drugs from the human oral cavity, **Int. J. Pharm**, v. 74, p.9–24, 1991.

ROGIER E.W.; FRANTZ A.L.; BRUNO M.E.C.; WEDLUND L.; COHEN D.A.; STROMBERG A.J.; KATZEL C. S. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. **PNAS**, v. 111, p. 3074-3079, 2014.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, p. 215–236, 1997.

SATO, T. AND CLAVERS, H. Growing Self-Organizing Mini-Guts. **Science**, v. 340, n. 2013, p. 1190–1194, 2013.

SONG Y, LIU P, SHI XL, et al. SARS-CoV-2 induced diarrhoea as onset symptom in patient with COVID-19. **Gut**, v.69, p. 1143-1144, 2020.

SWIDSINSKI A.; SYDORA B.; DOERFFEL Y.; LOENING-BAUCKE V.; VANEECHOUTTE M.; LUPICKI M. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. **Inflam. Bowel Dis**, v. 13, p. 693–70, 2007.

TO KF, LO AW. Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). **J Pathol**, v.203, p. 740-743, 2004.

VAN DER FLIER, L. G. VAN DER et al. Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. **Cell**, v.136, n. 5, p. 903–912, 2009.

VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem Cells, Self-Renewal and Differentiation in the Intestinal Epithelium. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 71, p. 241–260, 2009.

VAN DER SLUIS M., DE KONING B.A., DE BRUIJN A.C., et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, p. 117–129, 2006.

VASQUES DA COSTA A.; GOES C.P.; GAMA P. Breastfeeding importance and its therapeutic potential Against SARS-CoV-2. **Physiological Reports**, v. 14744 (9), p. 1-11, 2021.

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointest Endosc. Clin. N. Am**, v. 27, p.1–13, 2017.

XIONG, X. et al. Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 309, p. 229–237, 2015.

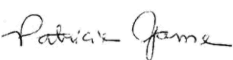
WADA Y.; LÖNNERDAL B. Bioactive peptides derived from human milk proteins: an update. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 23, p. 217-222, 2020.

WEI X., WANG X., ZHANG J., et al. A cluster of health care workers with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, p. 54-60, 2021.

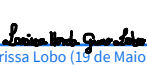
WILSON, J. M. Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum. **Journal of cell science**, p. 133–144, 1989.

YANG, S.; YU, M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. **Journal of Inflammation Research**, v. 15, p. 3171–3183, 2021.

YIN W, CAO W, ZHOU G, et al. Analysis of pathological changes in the epithelium in COVID-19 patient airways. **ERJ Open Res**, v.7, p. 690-2020, 2021.

X 

Prof.(a). Dr(a) Patrícia Gama
Orientador (a)

X 
Larissa Lobo (19 de Maio de 2022 10:46 ADT)

Larissa Honda Greco Lobo
Aluno (a)

TCC revisado final

Relatório de auditoria final

2022-05-19

Criado em:	2022-05-19
Por:	Larissa Lobo (Larissa.Lobo@sanofi.com)
Status:	Assinado
ID da transação:	CBJCHBCAABAAbqoH7A3fvkllolavYOxdVt_zQQNN3Qy0

Histórico de "TCC revisado final"



Documento criado por Larissa Lobo (Larissa.Lobo@sanofi.com)

2022-05-19 - 13:44:37 GMT- Endereço IP: 147.161.129.79



Documento assinado eletronicamente por Larissa Lobo (Larissa.Lobo@sanofi.com)

Data da assinatura: 2022-05-19 - 13:46:11 GMT - Fonte da hora: servidor- Endereço IP: 147.161.129.79



Documento enviado por email para Patrícia Gama (patgama@usp.br) para assinatura

2022-05-19 - 13:46:14 GMT



Email visualizado por Patrícia Gama (patgama@usp.br)

2022-05-19 - 14:32:02 GMT- Endereço IP: 66.249.83.83



Documento assinado eletronicamente por Patrícia Gama (patgama@usp.br)

Data da assinatura: 2022-05-19 - 14:32:43 GMT - Fonte da hora: servidor- Endereço IP: 143.107.20.142



Contrato finalizado.

2022-05-19 - 14:32:43 GMT