

ALINE VASQUES DA COSTA

**EFEITO DO DESMAME PRECOCE SOBRE MARCADORES MOLECULARES E
DESENVOLVIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
Obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2021

ALINE VASQUES DA COSTA

**EFEITO DO DESMAME PRECOCE SOBRE MARCADORES MOLECULARES E
DESENVOLVIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
Obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual
e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Gama

SÃO PAULO

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Vasques da Costa, Aline
/ Aline Vasques da Costa; orientadora Patricia
Gama. -- São Paulo, 2021.
89 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Desmame Precoce. 2. Vias de sinalização. 3.
Nicho de Células-tronco. 4. Mucosa Intestinal. I.
Gama, Patricia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Vasques da Costa

Titulo da Dissertação/Tese: Efeito do desmame precoce sobre marcadores moleculares e desenvolvimento da mucosa intestinal.

Orientador: Patrícia Gama

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Marcadores moleculares na mucosa gastrintestinal: um novo programa após o desmame precoce?*", registrado sob o protocolo nº **115/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **27/10/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Patrícia Gama**

- Departamento: *Biologia Celular e do Desenvolvimento*

- Membros da Equipe: *Aline Vasques da Costa (Pós-graduando), Melissa Teles Silva (Pós-graduando), Kethleen Mesquita da Silva (Pós-graduando), Isadora Campos Rattes (Iniciação científica), Cruz Alberto Mendoza Rigonati (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Molecular markers on gastrointestinal mucosa: a new program after early weaning?*", protocol nº **115/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/27/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Patrícia Gama**

- Team members: *Aline Vasques da Costa (Graduate Student), Melissa Teles Silva (Graduate Student), Kethleen Mesquita da Silva (Graduate Student), Isadora Campos Rattes (Undergraduate Student), Cruz Alberto Mendoza Rigonati (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Fêmea/female	15 dias/days	20
	Wistar	Macho/male	15 dias/days	20
	Wistar	Fêmea/female	18 dias/days	50
	Wistar	Macho/male	18 dias/days	50
	Wistar	Fêmea/female	60 dias/days	65
	Wistar	Macho/male	60 dias/days	57

São Paulo, 31 de outubro de 2017.

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.22 .2020

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **115/2017/CEUA**, aprovado em 27/10/2017, autorizo a inclusão de metodologia ao Protocolo: "**Marcadores moleculares na mucosa gastrintestinal: um novo programa após o desmame precoce?**", de responsabilidade da Profa. Dra. **Patricia Gama**, do Departamento de Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento:

- Avaliação de homeostase da glicose e insulinemia plasmática por kit ELISA nas idades já propostas pelo estudo (18, 60 e 120 dias).
- Teste de GTT - jejum de 6h e após esse período, será ofertada a solução de glicose 10% com a utilização de pipeta Pasteur para que o animal entre em contato com o líquido por meio das gotas.
- Coleta de sangue, que será realizada pela extremidade caudal do animal nos tempos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. O volume de sangue coletado por animal para insulinemia será de 50 microlitros em cada tempo, e a coleta será feita com um capilar de vidro.

E inclusão dos seguintes animais:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Fêmea / female	18 e 60 dias	15
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Macho / male	60 e 120 dias	15

São Paulo, 13 de novembro de 2020.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho a meus filhos, que mesmo pequenos para total entendimento dos meus dias de ausência para estudos, mostraram grande maturidade em me apoiar e entender o significado da dedicação àquilo que se ama fazer e a vontade de crescer na carreira escolhida. Sei da minha responsabilidade em ser exemplo para vocês e reforço todos os dias a gratidão em ter vocês na minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Patrícia Gama**, minha orientadora, que me recebeu prontamente e me ensinou com toda generosidade e paciência os caminhos da pesquisa científica. Durante todos esses anos, sua dedicação e ética profissional contribuíram não só para minha vida profissional como também para meu desenvolvimento pessoal. Sou muito grata por nossos caminhos terem se cruzado e por completar este ciclo com sua ajuda e atenção.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus por toda minha oportunidade nesta vida e por ser presença viva dentro de mim e me dar a força que preciso todos os dias para continuar no meu propósito de vida.

Aos meus pais que mesmo não estando mais entre nós, permanecem vivos em minhas memórias porque foram eles que me ensinaram e me ajudaram a dar os primeiros passos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus tios Beto e Sandra que me apoiam em todos os momentos da minha vida e vibram com cada vitória junto comigo. Vocês acompanham todos os meus passos e me mostram todos os dias o verdadeiro significado da palavra família e amor.

Aos meus filhotes Arthur e Thales por me ensinarem o amor incondicional.

À minha grande família Vasques (minha irmã, sobrinhas e sobrinhos netos, tios, primos e primas) por serem símbolos de união e determinação diante de todos os desafios e conquistas. Por todas as conversas, brincadeiras e principalmente pela característica de resiliência que todos temos.

À Maristela Blanco, que me dá todo carinho e acompanha meu crescimento vibrando e se orgulhando por cada conquista que eu lhe apresento. Obrigada por estar sempre disponível e por toda generosidade e bondade.

Aos meus amigos e amigas que estiveram junto comigo nessa jornada cientificamente comprovada: Isadora por todas as conversas, ajuda e por me aturar no laboratório todos os dias e participar da minha vida dentro e fora da USP. Wagner que apesar de discussões fundamentadas, só tenho a agradecer por toda ajuda e apoio sempre. Will, amigo que o mestrado me deu e está ao meu lado dentro e fora da ciência. Carol Purcell pela super colaboração, disponibilidade e contribuição para meu conhecimento profissional e científico, além de ser um exemplo para mim de pesquisadora apaixonada pela profissão. Luciana Osaki (Lu) pelo grande apoio no momento crucial do meu

trabalho, obrigada pela serenidade e paciência nas explicações sempre que preciso. Raquel, Beatriz, Larissa Honda, Leticia e Kethleen – cada uma em especial colaborou com um pedacinho desse trabalho e me ajudou a crescer com suas contribuições nos meus experimentos e ajuda em cada uma das minhas apresentações. Agradeço também ao Marcelo Santiago por todas as conversas que me mostraram os caminhos dentro da comunidade científica e por ter me ajudado a dar o pontapé inicial na carreira; e a Geruza minha grande amiga pelas conversas tão essenciais nos momentos específicos e pelo apoio e torcida de sempre.

À Profa. Dra. Estela M. Bevilacqua pela generosidade em compartilhar seu laboratório e disponibilizá-lo para parte do meu experimento.

À Profa. Dra. Carla Roberta de O. Carvalho e seu aluno Sandro pela disponibilidade em ceder o material para realização dos experimentos finais.

Ao Cruz Alberto Mendonza Rigonati (Júnior), pelo apoio técnico tão essencial para realização deste trabalho.

A profa. Dra. Marinilce Fagundes, Profa. Dra. Patrícia Castelucci e Felipe Viceli que estiveram presentes em meu exame de qualificação e pelas valiosas contribuições.

Aos funcionários do biotério (José Braz Ferreira de Melo e Cláudio Cabado) por todos os cuidados necessários na manutenção dos nossos animais no biotério e por estarem sempre disponíveis quando precisei de ajuda com a manipulação deles.

Às secretárias do departamento, principalmente à Tania Cacheiro que esteve sempre prontamente a atender todas as minhas solicitações.

Agradecimento às agências de fomento:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradecimento à Fundação de Amparo do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro fundamental para realização e conclusão desse trabalho (Número do processo: 2018/07409-5).

RESUMO

Costa, A.V. **Efeito do desmame precoce sobre marcadores moleculares e desenvolvimento da mucosa intestinal. 2021. Tese** (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

A amamentação é uma importante fonte alimentar na primeira infância e, considerando seu papel na regulação do crescimento e desenvolvimento da mucosa intestinal, o desmame precoce (DP) poderia promover alterações na proliferação e diferenciação celular com comprometimento da função intestinal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores relacionados ao processo de proliferação celular, diferenciação e fatores de crescimento do epitélio intestinal, observando os efeitos imediatos e tardios desencadeados pelo DP. No 15º dia de vida pós-natal, ratos Wistar foram submetidos ao DP, sendo separados de suas mães e mantidos em gaiola isolada, enquanto no grupo controle amamentado, os animais permaneceram com as mães até 21 dias. O intestino delgado foi coletado aos 18, 60 e 120 dias para avaliação de: expressão gênica e proteica; detecção e localização de moléculas para o estabelecimento do nicho de células tronco; efeitos epigenéticos a partir de genes diferencialmente expressos, e marcadores metabólicos. Dentre os parâmetros morfológicos, observamos que a altura das vilosidades foi significativamente diminuída pelo DP aos 18 e 60 dias, enquanto a profundidade da cripta não foi alterada pela alimentação, porém aumentou com o desenvolvimento. O índice proliferativo foi significativamente diminuído pelo DP aos 18 e 60 dias. A partir da contagem de células diferenciadas, verificamos que o número de enterócitos e de células caliciformes (vilo) diminuiu aos 18 dias; aos 60 dias somente o número de células caliciformes/vilo foi reduzido (DP), e aos 120 dias houve um aumento dessa população no eixo cripta-vilo, após o DP. Já a população de células de Paneth, presente somente na cripta, aumentou aos 18 e 60 dias. A partir da avaliação de genes-alvo para marcadores epiteliais, notamos que a expressão de sacarase, mucina 2 e defensina foi elevada pelo DP aos 18 dias, e de forma contrária, o gene *Chga* (célula enteroendócrina) e a expressão de lactase foram diminuídos pelo DP na mesma idade. Dentre os marcadores de fatores de crescimento, o DP causou a redução de *Tgfb1* aos 18 dias, e de *Egfr* aos 60 dias. Destacamos que dentre os marcadores do ciclo celular, houve um aumento da *Cdkn1b* (*p27*) no DP em todas as idades avaliadas. Dentre os marcadores de células tronco, *Lgr5* e *Ascl2* tiveram redução aos 18 dias no DP, e aumento aos 60 dias, sendo que somente *Ascl2* respondeu aos 120 dias, com diminuição após o DP. Avaliamos os marcadores das principais vias de sinalização na cripta e identificamos que *Wnt3A*, *Notch 1* e *Atoh 1* foram reduzidos pelo DP aos 18 dias, enquanto *BMP2* aumentou na mesma idade. Aos 60 dias, verificamos um aumento em

Wnt3A e *Atoh 1*, e redução da expressão de *Notch 1*, *Notch 2* e *BMP2*. Nos animais de 120 dias somente nos níveis de *Atoh1* aumentaram no DP. Em termos de níveis proteicos, Hes1 diminuiu nos animais DP aos 60 dias. As modificações epigenéticas foram estudadas também, sendo inconclusivas após o sequenciamento, porém observamos uma redução da expressão das enzimas *Dnmt 3a* e *Dnmt 3b* aos 18 dias no DP; aos 60 dias essa resposta foi detectada somente na *Dnmt1*, e aos 120 dias, a tanto *Dnmt1* quanto *Dnmt 3b* diminuíram com o DP. Em termos de metabolismo, observamos que nos animais de 18 dias em DP ocorreu uma redução de glicemia sérica, e de forma contrária, aos 60 dias houve uma elevação significativa (teste de tolerância a glicose- GTT). Nossos resultados demonstraram que o desmame precoce comprometeu o processo de proliferação celular no intestino delgado, com efeitos sobre a expressão de genes-alvo marcadores do nicho de células tronco e de diferenciação celular, afetando as populações de enterócitos, células caliciforme e de Paneth, imediatamente após a interrupção do aleitamento, aos 18 dias. Vários efeitos foram mantidos até a idade adulta com modificação fenotípica e metabólica. Sugerimos 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.

Palavras chaves: Amamentação; Diferenciação celular; Célula tronco; Desmame precoce; Mucosa intestinal

ABSTRACT

Effect of early weaning on molecular markers and intestinal mucosal development

Considering breastfeeding as an important food source during babyhood and its role in regulating the growth and development of intestinal mucosa, early weaning (EW) could promote changes in cell proliferation and differentiation processes, with impairment of intestinal function. Therefore, the aim of this study was to evaluate markers of cell proliferation, differentiation, and growth factors in the intestinal epithelium, observing the immediate and late effects triggered by EW. Wistar rats were submitted to EW at 15 postnatal days, when animals were isolated from their dams (control suckling group was weaned at 21 days). Jejunum samples were collected at 18, 60 and 120 d. We evaluated morphological parameters and their correlation with expression of genes and proteins related to growth, stem cell niche, signaling, epigenetic modification and metabolic markers. We observed that the villus height was significantly decreased at 18 and 60 days after EW, whereas the crypt depth was not affected by treatment, but grew throughout development. The proliferative index was significantly reduced at 18 and 60 days. After counting the differentiated cells, we found EW decreased the number of enterocytes and goblet cells (villi) at 18 days; at 60 days the distribution of goblet cells was reduced along villus, and at 120 days this population increased in the crypt-villus axis. Paneth cells, which are solely in the crypt, increased at 18 and 60 days in EW group. Among the target genes, the expression of *sucrase*, *mucin 2* and *defensin* augmented at 18 days in EW and, conversely, *Chga* gene (enteroendocrine cells) and *Lactase* were reduced by EW at 18 days. From growth factor markers, EW triggered the decrease of *Tgfb1* at 18 days, and of *Egfr* at 60 days. Interestingly, among cell cycle markers, *Cdkn1b* (p27) expression was higher in EW vs. control at all ages. From stem cell markers, *Lgr5* and *Ascl2* decreased at 18 days (EW) and augmented at 60 days. Of note, only *Ascl2* was reduced by EW at 120 days. We studied the main signaling pathways in the crypt, and we found that after EW, *Wnt3A*, *Notch 1* and *Atoh1* showed a reduction at 18 days, whereas *BMP2* increased at the same age. At 60 days, we found higher levels of *Wnt3A* and *Atoh1* and a reduced expression of *Notch 1*, *Notch 2* and *BMP2*. As for protein levels, EW decreased Hes1 at 60 days. Epigenetic changes were inconclusive, but we detected decreased expression of *Dnmt 3a* and *Dnmt 3b* enzymes at 18 days in EW. At 60 days these changes were seen only in *Dnmt1* and at 120 days the *Dnmt1* and *Dnmt3b* were reduced in EW. In terms of metabolism, we observed that EW triggered a reduction of serum glycemia at 18 days, and conversely, at 60 days, there was a significant increase after (glucose tolerance test -GTT). Our results demonstrated that early weaning influenced cell proliferation in the small intestine, affecting the expression of target genes in the stem cell niche, and cell differentiation, changing enterocyte, goblet and Paneth cell populations immediately after breastfeeding interruption at 18 days. Part of

the effects were maintained into adulthood with phenotypic and metabolic modifications. We suggest that cellular responses to EW can be permanent in the intestinal mucosa, indicating that breastfeeding is essential to the development of small intestine and its maintenance in adult life.

Keywords: Breastfeeding; Cell differentiation; Stem cell; Early weaning; Intestinal mucosa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do intestino delgado indicando as vilosidades em direção ao lúmen, lâmina própria e as invaginações denominadas criptas	20
Figura 2 – Representação esquemática de células intestinais ao longo do eixo cripta- vilo. Organização do nicho de células tronco na base da cripta entre as células de Paneth.....	28
Figura 3 – Desenho experimental.....	37
Figura 4 – Painel obtido na plataforma Genome Browser.....	44
Figura 5 – Efeito do desmame precoce sobre o índice proliferativo e marcadores de ciclo celular.....	49
Figura 6 - Efeito do desmame precoce sobre o índice proliferativo e marcadores de ciclo celular.....	52
Figura 7 – Avaliação do desmame precoce sobre marcadores de vias de sinalização.....	55
Figura 8 – Avaliação do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento.....	56
Figura 9 – Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de células Paneth e expressão de genes marcadores de células-tronco.....	59
Figura 10 – Efeito do desmame precoce sobre as populações celulares ao longo do eixo cripta-vilo.....	62
Figura 11 - Distribuição de células caliciformes.....	65
Figura 12 - Efeito do desmame precoce sobre marcadores metabólicos.....	68
Figura 13 - Análise do efeito do desmame precoce sobre o comportamento da expressão gênica ao longo do tempo.....	70
Figura 14 - Análise do perfil de metilação de DNA e expressão enzimática.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes avaliados por ensaio TaqMan probe.....	41
Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados para <i>immunoblot</i>	43
Tabela 3 - Primers utilizados para análises de metilação.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amamentado
APC	complexo polipose adenomatosa
Ascl	<i>Achaete-Scute complex like</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea
CBC	Células colunares da base
CCK	Colecistoquinina
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DAB	3,3'tetra-hidrocloro de diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferases
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desmame precoce
DSS	Dextrano de sódio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEC	Enteroendocrina
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GTT	Teste de tolerância a glicose
HE	hematoxilina e eosina
ILA	indol-3-láctico
ITT	Teste de tolerância a insulina
i.p.	Intraperitoneal
IP	Índice proliferativo
LGR	<i>Leucine-rich repeat- containing G-protein coupled receptor</i>
LRP	<i>Receptor de lipoproteína</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NEC	Enterocolite necrosante
OLFM	olfactomedina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico Schiff
PCA	Análise de componentes principais
PCRq	Reação quantitativa de cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	Transcriptase reversa
SI	<i>Sacarase/Isomaltase</i>
sIgA	<i>Imunoglobulina A secretora</i>
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato-EDTA
TBS	Salina tamponada com Tris
TGF	Fator de crescimento transformante
TGFβ _R	Receptor do fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para Infância

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Desenvolvimento do epitélio intestinal.....	20
1.2 Amamentação e desmame.....	22
1.3. Ciclo Celular.....	24
1.4 Linhagens celulares no intestino delgado	25
1.5 Nicho de células-tronco na cripta do intestino delgado.....	28
1.6 Vias de sinalização.....	30
1.7 Epigenética.....	33
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVO.....	35
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Animais.....	36
4.2 Análise morfológica.....	37
4.3. Expressão gênica.....	38
4.3.1 Extração de RNA.....	38
4.3.2 Síntese de cDNA – reação com Transcriptase Reversa (RT).....	39
4.3.3 qPCR.....	39
4.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	42
4.4.1 Índice proliferativo.....	42
4.5 Análise proteica.....	42
4.5.1 Western e immunoblot.....	42
4.6 Análise Epigenética.....	44
4.6.1 Análise in sílico	44
4.6.2 Extração do DNA.....	45
4.6.3 Modificação por bissulfito de sódio.....	45
4.6.4 Amplificação do DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) e purificação.....	45

4.6.5 Transformação de bactérias e seleção dos clones.....	46
4.6.6 Sequenciamento Sanger.....	47
4.7 Teste de Tolerância à Glicose (GTT).....	47
4.8 Análise Estatística.....	47
5.0 RESULTADOS.....	48
5.1 Efeito do desmame precoce sobre o índice proliferativo e marcadores de ciclo Celular.....	48
5.2 Efeito do desmame precoce sobre o índice proliferativo e marcadores de ciclo celular	51
5.3 Avaliação do desmame precoce sobre marcadores de vias de sinalização.....	54
5.4 Avaliação do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento.....	56
5.5 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de células Paneth e expressão de genes marcadores de célula tronco.....	58
5.6 Efeito do desmame precoce sobre as populações celulares ao longo do eixo cripta vilo.....	61
5.6.1 Distribuição Enterócitos.....	61
5.6.2 Expressão gênica de marcadores das populações epiteliais.....	61
5.6.3 Distribuição de células caliciformes.....	64
5.7 Efeito do desmame precoce sobre marcadores metabólicos.....	67
5.8 Análise do efeito do desmame precoce sobre o comportamento da expressão gênica ao longo do tempo.....	70
5.9 Análise do perfil de metilação de DNA e expressão enzimática.....	70
6.0 DISCUSSÃO.....	72
7.0 CONCLUSÃO.....	79
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento do epitélio intestinal

O epitélio do trato gastrointestinal tem como funções primárias a secreção e absorção de nutrientes, além de proteção contra patógenos ambientais. Anatomicamente, a região intestinal se divide em intestino delgado, que se subdivide em duodeno, jejuno e íleo, e intestino grosso composto pelos segmentos do cólon e reto. Nas duas regiões, o tecido epitelial presente na camada mucosa tem alta capacidade de renovação (3 - 5 dias), quando comparado a outros no organismo (HEATH, 1996).

O desenvolvimento do intestino delgado compreende três estágios: morfogênese e proliferação celular, diferenciação celular e maturação funcional (MONTGOMERY et al, 1999). A mucosa do intestino delgado apresenta numerosas protrusões em forma de dedos conhecidos como vilos que se projetam em direção ao lúmen e em sua base estão em associação com invaginações denominadas criptas (figura 1). Vilos e criptas são formados por uma simples camada de células epiteliais colunares, sendo o vilos considerado o compartimento funcional (alta capacidade absorptiva) e a cripta, o compartimento proliferativo do intestino delgado (DUNN, 1967).

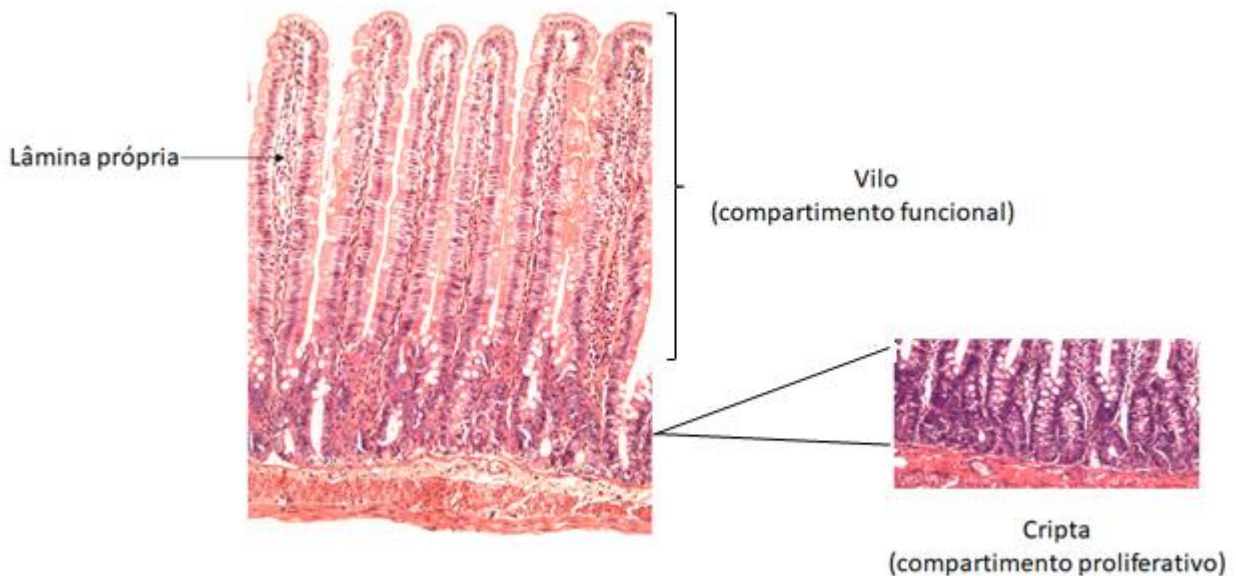


Figura 1. Representação do intestino delgado indicando as vilosidades em direção ao lúmen, lâmina própria e as invaginações denominadas criptas.

Considerando o compartimento proliferativo na cripta intestinal, a proliferação se dá a partir de células-tronco, com capacidade de auto- renovação, e de células em transição em amplificação (TA) progenitoras com alta atividade de enzimas envolvidas com a síntese de DNA, onde se dividem 4 a 5

vezes dando origem à células comprometidas com as diferentes linhagens celulares: enterócitos, células enteroendócrinas, células calciformes, célula de Paneth e *tuft cells* (células de tufo), secretoras de citocinas (HEUBERGER et al., 2014; VAN DER FLIER et al., 2009).

Em humanos, a formação das vilosidades ocorre em cerca de 8 semanas de gestação na região do intestino proximal (MAHESHWARI, 2006). A maturação epitelial continua durante o período pós-natal até a infância. Este processo é 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, formação de lumens secundários (17º dia) e reorganização tecidual para projeção dos vilos primitivos (DUNN, 1967), e do 18º ao 21º dia, as células epiteliais se diferenciam (WILSON, 1989).

Em ratos, a organização do eixo cripta- vilos é visível ao nascimento, e apresenta vilosidades formadas por uma única camada de células colunares epiteliais, que em sua maioria, apresentam as microvilosidades, compondo uma superfície absorptiva bem definida. Durante a terceira semana de vida pós-natal, a mudança de cinética celular leva à uma contínua proliferação de células epiteliais, que ocorre somente na cripta, e à migração de células para o topo do vilos, onde entram em apoptose, mantendo a característica de renovação rápida. Em ratos adultos o tempo de renovação epitelial de células da cripta é de 10h a 14h e o tempo de trânsito ao longo do comprimento do vilos é de 48h (HENNING, 1985).

Para que ocorra crescimento em extensão, é necessário haver a fissão de criptas. Comparativamente, a incidência de fissão de criptas é maior em jovens e o aumento torna-se menos frequente na vida adulta. Como mencionado, a fissão impulsiona o crescimento e a manutenção normal do tecido (PIN C, 2015; METCALFE C, 2014). Dessa forma, a maior incidência de fissão de cripta ocorre durante o desenvolvimento em aproximadamente 40% de todas as criptas na região do jejuno e 60% de todas as criptas na região do cólon médio (ST CLAIR WH, 1985). Por volta de 10 semanas de desenvolvimento pós-natal, a taxa de fissão de cripta é reduzida e se mantém em torno de 5%, variando entre as diferentes regiões do intestino delgado e cólon (LANGLANDS AJ, 2016).

Em termos de populações, as células epiteliais dos vilos dividem-se em absorptivas (enterócitos), calciformes e *tuft cells*, sendo que a primeira população apresenta funções enzimáticas, de forma que ao fazer contato com o lúmen, as células absorptivas participam do processo de digestão e absorção intestinal.

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). A expressão da sacarase-isomaltase (*Si*) é regulada de modo antagônico à lactase no período do desmame, sendo evidenciado seu aumento a partir do 16° ou 17° dia de vida pós-natal no rato, atingindo o pico máximo de expressão na vida adulta (IKO F., TOSHINAO G., 2004).

1.2 Amamentação e desmame

Durante o desenvolvimento pós-natal, a amamentação é um agente importante na programação do crescimento. Nesse período, o colostro e o leite materno são os primeiros alimentos ingeridos pelo neonato (BARAM et al., 1977; KOLDOVSKÝ et al., 1995; LETTERIO et al., 1994; DONAVAN E ODLE, 1994; WADA E LÖNNERDAL, 2014). O leite apresenta em sua composição proteínas, aminoácidos e microrganismos que atuam tanto na maturação intestinal como na função imunoreguladora e contribuem para defesa do bebê contra patógenos bacterianos e virais, contribuindo para redução do grau de virulência, como na infecção por COVID-19 (COSTA et al., 2021). Dentre as moléculas secretadas no leite materno, podemos destacar as proteínas do soro do leite, caseínas, lactoferrina, alfa lactoalbumina, mucina 1, triptofano, imunoglobulina A secretora (sIgA) dentre outras, fornecendo o complemento necessário contra doenças infecciosas e desenvolvimento da criança.

Na primeira infância, o leite humano é a principal fonte de triptofano, um aminoácido precursor de serotonina e niacina. (LIU & NEWBURG, 2013; O'MAHONY et al., 2015) Este aminoácido tem a função de controlar a expressão de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado, atua na regulação da motilidade intestinal, modulação da microbiota intestinal e como agente anti-inflamatório por meio de receptores de hidrocarbonetos aril (AHR) (BORGES et al., 2017; METIDJI et al., 2018). Por outro lado, a ausência ou deficiência de triptofano, por absorção intestinal reduzida ou dietas restritivas em proteína, está relacionado com maior incidência de doença inflamatória intestinal e síndrome do intestino irritável (TALEB, 2019). Em um estudo de coorte, bebês que foram alimentados exclusivamente com leite materno eram menos suscetíveis a enterocolite necrosante (NEC) apresentando redução de 32% a 80% em número de casos, enquanto bebês que tomaram exclusivamente fórmula, apresentaram maior tendência à inflamação. Esta resposta foi devido a expressão de indol-3-láctico (ILA), um metabólito do triptofano que é fornecido pelas bactérias intestinais como *Bifidobacterium*, em cuja proliferação é estimulada pela ingestão de leite materno (GREGORY et al, 2016; MENG et al, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF), a amamentação exclusiva deve ser mantida até os 6 meses de idade e após esse período, a continuidade até os 2 anos deverá ser feita juntamente com alimentação sólida complementar. Estatisticamente, menos de 40% dos bebês no mundo são amamentados exclusivamente durante os primeiros 6 meses de vida. (OMS, 2021).

Durante o rápido crescimento e desenvolvimento da primeira infância, o ferro é um elemento traço vital para as reações metabólicas, síntese de DNA e transporte de oxigênio, sendo sua maior concentração presente no leite materno e a absorção sendo pela camada de muco produzida por células caliciformes do intestino delgado. Apesar das baixas concentrações de ferro presente no leite materno, a absorção é mais eficiente que o ferro presente em leite de fórmula. Além disso, no período de desmame, a proporção de ferro absorvido é reduzida em 10% tanto em humanos quanto em roedores (SHERIDAN, 2019). Já na vida adulta, a absorção de ferro se dá por proteínas presentes na borda em escova. O estudo que analisou níveis gênicos de *Dmt1*, responsável por induzir a absorção do ferro em adultos, demonstrou que os níveis dessa proteína se encontravam aumentados em enterócitos de ratos lactantes quando comparados a ratos desmamados confirmando, que a amamentação exclusiva é suficiente para manutenção de estoques adequados de ferro por pelo menos seis meses (FRAZER, 2007).

Em ratos, o aleitamento é gradativamente substituído pela ingestão de alimento sólido da terceira para a quarta semana de vida pós-natal, fase que caracteriza o desmame natural, 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, 1981). 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.

Estudos publicados por nosso grupo demonstraram que no estômago o desmame precoce aumenta a atividade proliferativa este estímulo é correlacionado com ganho de atividade do receptor de EGF (EGFR) (OSAKI et al., 2011; OSAKI; GAMA, 2013), mudança da atividade da corticosterona (GHIZONI, 2014), e variação dos níveis de TGF β (OGIAS et al., 2010). O EGFR age por diferentes vias de sinalização, mas durante o desmame precoce, a via de MAPK está ativa e controla proteínas do ciclo celular, como p21 e p27 (OSAKI; GAMA, 2013). Recentemente, foi observado que o aumento da atividade proliferativa na mucosa gástrica em animais filhotes de 18 dias podem estar relacionados a redução dos níveis de *T β 2* e p27 (SILVA, 2021). Além disso, o desmame precoce desencadeou a diferenciação de células mucosas do colo (OSAKI; CURI; ALVARES, 2010) e modificação da resposta

ao estresse (GHIZONI, 2014), que em conjunto podem reprogramar todo o processo de crescimento e maturação da mucosa gástrica (ZULIAN et al., 2017; SILVA et al, 2020; SILVA et al 2021).

No intestino, o desmame precoce leva a um aumento da atividade das enzimas sacarase e isomaltase. Em contrapartida, as enzimas lactase e hidrolase lisossomal, que apresentam alta atividade no período de amamentação, são reduzidas após o desmame com a introdução de alimentos sólidos, porém o envolvimento dessas enzimas no processo de diferenciação e proliferação celular ainda é pouco conhecido (BEERS et al., 1995). Além disso, assim como caracterizado no estômago, o desmame precoce também induz a atividade da enzima ornitina descarboxilase importante no processo de adaptação e crescimento da mucosa intestinal (LIN et al., 1998). Evidências demonstram que os processos de maturação intestinal e adaptação enzimática podem ser controlados por hormônios como a corticosterona (KEYSER et al, 1990).

1.3 Ciclo celular

O controle da proliferação celular se dá através da regulação do ciclo celular pela passagem das fases G1, S, G2 e M a fim de garantir a correta replicação do material genético, separação dos cromossomos, senescência e morte celular. Mecanismos intracelulares são responsáveis pela progressão do ciclo celular envolvendo ativação de uma família de proteínas denominadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e sua associação com subunidades reguladoras positivas, pertencentes a família das ciclinas que formam um complexo catalítico ciclina-CDK. Oscilações nos níveis de ciclina, implicam em modificações nas atividades dos complexos, e na duração das fases do ciclo celular. Dentre as proteínas do complexo ciclina-CDK, destacam-se a ciclina E e a CDK2. Os níveis de ciclina E são regulados durante o ciclo celular normal, e a proteína acumula-se na transição G1/S, e sendo completamente degradada até o final da fase S. A ciclina E se liga e ativa CDK2 para controlar entrada e progressão da fase S. A atividade do complexo ciclina E-CDK2 é controlada pela moléculas inibidoras denominadas CKIs, dentre as quais estão a p21 e a p27, capazes de ligar e inativar o complexo ciclina E-CDK2 (TEIXEIRA; REED, 2017). O controle do ciclo celular é essencial para que ocorra um equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação celular, e essa regulação é fundamental para a homeostase da mucosa intestinal ao longo da vida. Em contrapartida, uma falha na proliferação ou a perda dos gatilhos de diferenciação podem levar a várias doenças, dentre as quais estão os tumores.

1.4 Linhagens celulares no intestino delgado

Em torno de 90% do epitélio intestinal é composto por células absortivas, também denominadas enterócitos, que são altamente polarizados, caracterizados pela presença de microvilosidades que formam uma borda em escova, constituindo uma estrutura altamente organizada na superfície apical (KONG et al., 1998). Um dos principais componentes estruturais da célula absortiva é a vilina, presente nas microvilosidades com função de organizar seu eixo principal. Na mucosa intestinal, observou-se que a expressão de vilina aumenta à medida que as células se diferenciam e migram da cripta até o topo do vilão (GEORGE, 2008). As células absortivas que revestem as vilosidades intestinais são responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes, como mencionado anteriormente. Para executar essas funções especializadas, elas adquirem a capacidade de regular a expressão de proteínas relevantes, como enzimas digestivas, receptores, e transportadores de membrana. A regulação desses genes específicos depende do período de desenvolvimento e da região do intestino, de forma que o rápido crescimento coincide com as mudanças na função da membrana da borda em escova. Em mamíferos, é evidente que há uma interação entre a sucção, o crescimento intestinal e a membrana celular na borda em escova. A expressão de cada gene muda sequencialmente durante o período de crescimento do feto, período de amamentação, desmame e idade adulta. Como exemplo, a modificação da dieta de mamíferos desmamados de leite para alimentos sólidos é paralela à mudança de atividade da lactase que, em ratos e camundongos, é elevada na fase fetal, diminui por volta do dia 21 (período do desmame) e permanece na idade adulta em um nível correspondente a 20% do nascimento (TUNG J, 1997). A expressão de sacarase-isomaltase (*Si*) é regulada de maneira contrária. Sua atividade é indetectável durante a sucção e aumenta seus níveis aos 16 ou 17 dias pós-natal (TUNG J, 1997).

Além da linhagem absortiva, as linhagens secretórias compõem as outras populações celulares do epitélio intestinal (figura 2). Considerado como órgão endócrino, o intestino possui células enteroendócrinas (EEC), que embora escassas em relação às outras populações, compreendem aproximadamente 1% de todas as células epiteliais, e são essenciais no processo de regulação da digestão, motilidade intestinal, controle do apetite e do metabolismo (MAY; KAESTNER, 2011). Os hormônios intestinais agem nos níveis de glicose no sangue, indiretamente por via pancreática, como também controlam o fluxo de nutrientes no intestino. Dentre os hormônios liberados pelas EEC, o GLP-1 é liberado no processo pós-prandial, potencializa a liberação da insulina pelas células beta-pancreáticas e controla a adaptação metabólica por meio da modulação do apetite.

Distribuídas em todo epitélio, as células EEC produzem mais de vinte hormônios e são diferenciadas morfológicamente e pelo principal hormônio produzido. Quando diferenciadas e maduras,

as células enteroendócrinas adquirem um número crescente de grânulos citoplasmáticos e perdem a capacidade de se dividir. Dentre as moléculas secretadas, estão também fatores neurotróficos e colecistoquinina (CCK), importante regulador hormonal do processo digestório (KONG et al., 1998).

Estudos desenvolvidos a partir da técnica de sequenciamento de célula única e em organoides demonstraram que há 5 linhagens distintas de EEC capazes de gerar células com perfis hormonais diferentes, responsivas a um gradiente de sinalização ao longo do eixo cripta-vilo. A partir da zona de célula-tronco na região da cripta intestinal, células EEC passam por três estágios de diferenciação até completar sua função secretora de hormônio. O destino secretor é determinado fora da zona de célula-tronco, por ausência da ativação da via de sinalização Notch (BEUMER J, 2020). Um dos principais reguladores da plasticidade das EEC é a via de *bone morphogenetic protein* (BMP). Estudos em organoides demonstraram que a elevada sinalização de BMP no vilo inibe a diferenciação a partir de células-tronco e permite sua expansão. Quando a BMP é ativada em organoides, este muda do estado de cripta para vilo, reduz a expressão de GLP-1 e aumenta a síntese de secretinas, neurotensinas e expressão de PYY. Ou seja, quando ocorre a inibição da sinalização de BMP *in vivo*, há um estímulo na expressão de hormônios restritos à cripta e reprime a expressão de hormônios tipicamente no vilo (BEUMER J, 2018).

O destino das células enteroendócrinas é limitado pelas células progenitoras com baixas taxas de divisão, diferentemente de outras linhagens secretórias como as células caliciformes que são favorecidas por células progenitoras em maior proliferação (BASAK O, 2017).

Dentre as outras linhagens epiteliais intestinais está a população de células caliciformes, que aparece precocemente durante a fase de desenvolvimento. Essas células também são polarizadas, e contêm grânulos de mucina, localizados logo abaixo da região apical da membrana (RADWAN et al, 1990). A mucina secretada reveste a superfície livre e confere proteção contra bactérias patogênicas e produtos bacterianos. Existem duas camadas de muco que recobrem o epitélio intestinal. A primeira camada é estéril de forma compacta, e apresenta lisozimas secretadas pelas células de Paneth, e a segunda camada mais externa, apresenta uma composição mais fluida com a função de facilitar a adesão de bactérias residentes da microbiota intestinal. Ressalta-se que, no intestino delgado, a propriedade viscosa da camada de muco é dada pela mucina 2 (MUC2), principal marcador das células caliciformes intestinais (MCGUCKIN, M. A; 2011). Estudos mostram que mudanças no padrão alimentar podem influenciar na quantidade e proporção do conteúdo de mucina no intestino delgado de ratos, alterando as características funcionais do ambiente intestinal (SHARMA et al., 1995; SHARMA, 1995).

O muco secretado pelas células caliciformes serve como importante barreira para impedir a invasão de patógenos na mucosa, que possam levar à inflamação intestinal. Assim, as células caliciformes são consideradas constituintes ativos no processo de defesa do organismo em conjunto com o sistema de resposta imune. Em um modelo de colite induzida por sulfato de dextrano de sódio (DSS) em camundongos, observou-se que as células linfoides inatas e células T induzem a diferenciação indireta de células caliciformes, e há aumento de transcrição de MUC2 (YANG S, 2021). Outro estudo analisou as consequências das diferentes idades de desmame em porcos, demonstrando que animais desmamados precocemente apresentaram uma redução do número de células caliciformes e eram mais susceptíveis a impactos metabólicos, a partir da redução da função barreira e desequilíbrio do sistema imune (GARCÍA G.R, 2016).

As células de Paneth representam o quarto tipo celular presente no epitélio intestinal, são células secretoras, e podem ser facilmente reconhecidas pelos seus grânulos acidófilos. Essas células não se dividem, estão localizadas somente na base da cripta e originam-se diretamente de células-tronco (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009). Diferente das outras linhagens celulares, à medida que amadurecem, as células de Paneth apresentam um padrão migratório em direção à base da cripta e persistem por pouco menos de 30 dias, permanecendo intercaladas entre as células-tronco, e sendo distinguidas pelas suas formas colunares a piramidais e grânulos acidófilos em seu citoplasma (LUESCHOW SR, 2020).

Funcionalmente, as células de Paneth apresentam grânulos secretórios que contém proteínas específicas como lisozimas, defensinas e peptídeos antimicrobianos liberados em direção ao lúmen com função de permeabilizar e digerir a parede de bactérias patogênicas regulando a microbiota intestinal, além de auxiliar na proliferação e diferenciação do epitélio a partir da secreção de fatores de crescimento (CLEVERS, 2013).

Considerada constituinte essencial da cripta, as células de Paneth compõem o nicho de células-tronco na cripta intestinal e interagem com as células positivas para a proteína G acoplada ao receptor de leucina 5 (Lgr5). (SATO, T. AND CLAVERS, 2013). Estas, são responsáveis pela manutenção e proliferação do nicho de células-tronco Lgr5+ através da expressão de fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF alfa) e Wnt3, assim como ligantes Notch acoplados em sua superfície (KIM et al, 2012; SATO, T. AND CLAVERS, 2013). Experimentos *in vitro* evidenciaram que células de Paneth dão suporte para o crescimento e sobrevivência da população de células-tronco ativas (SATO T, 2011).

O estudo conduzido por Barker e colaboradores (2007) identificou que a molécula $Lgr5^+$ é o principal marcador de células-tronco intestinais, sendo restrito às células colunares na base da cripta que dão origem a todas as outras linhagens epiteliais no órgão. Sua expressão está associada com a auto renovação e diferenciação nas 3 populações descritas acima, assim como a própria linhagem da célula de Paneth. A posição relativa, o número de células de Paneth e de células $Lgr5^+$ são importantes para o processo de fissão de criptas, descrito anteriormente. que dá origem a 2 criptas filhas, fazendo o crescimento em extensão do órgão.

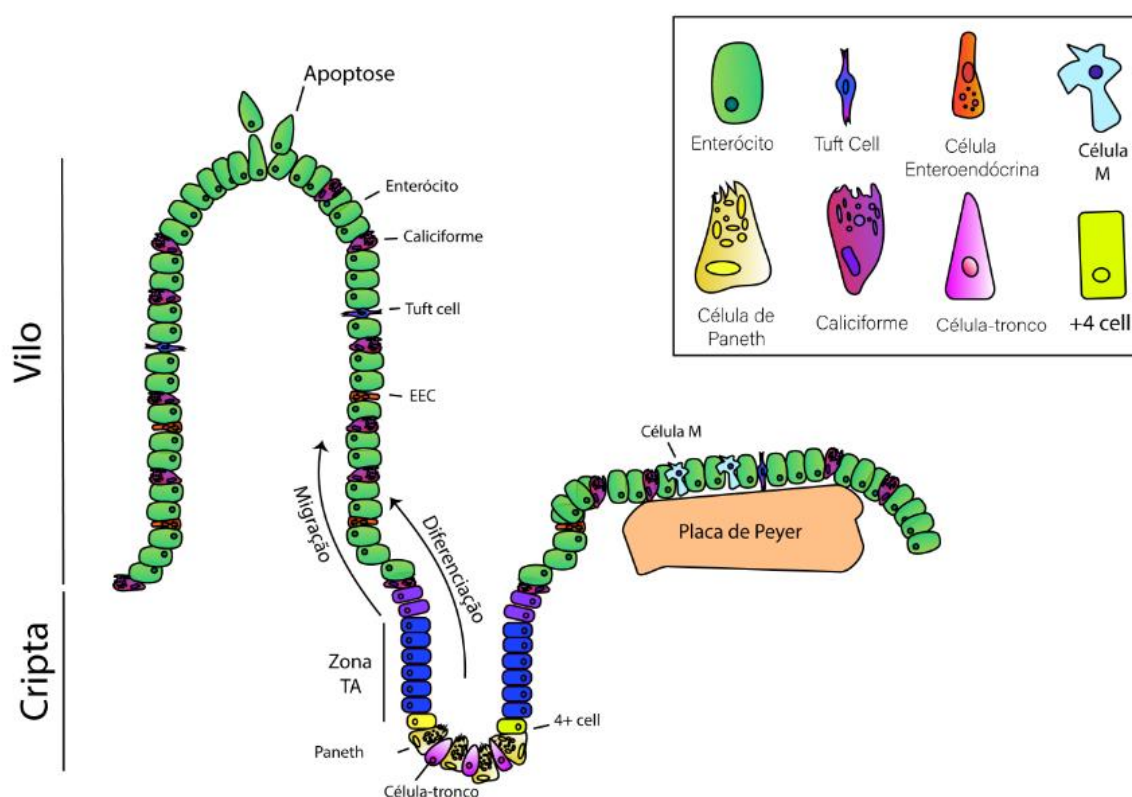


Figura 2. Representação esquemática de células intestinais ao longo do eixo cripta- vilo. Organização do nicho de células-tronco na base da cripta entre as células de Paneth. As células progenitoras na zona de transição em amplificação (TA) a partir da posição +4 e, em seguida em diferenciação para as quatro linhagens, que migram em direção ao topo do vilo onde ocorre a apoptose.

1.5 Nicho de células-tronco na cripta do intestino delgado

Células colunares da base (CBC) (Figura 1) compõem o nicho de células-tronco descrito por Cheng e Leblond em 1974 (CHENG; LEBLOND, 1974). A localização, comportamento e número de células-tronco intestinais foram caracterizados por diversos pesquisadores que identificaram uma zona

a partir das 3 primeiras posições das células de Paneth diferenciadas na base até a quarta posição na cripta. Esses resultados foram comprovados por marcadores de síntese de DNA como a bromodeoxiuridina e a timidina H³, que indicaram a retenção das células nesta região (YEUNG; KUO, 2011). Assim, as CBC, estimadas em 4 a 5 por cripta, são positivas marcadores proliferativos (inclui-se a proteína Ki67) e estão localizadas entre as células de Paneth, em uma zona pós- mitótica a partir da posição +1 (base) até a posição +4 (mais superficial na cripta) (BARKER et al., 2007). Essas CBC entram em ciclo de forma lenta e dão origem às células progenitoras de ciclo rápido com divisão assimétrica. As células TA sobem no eixo da cripta e na diferenciação seguem dois caminhos para linhagens absortivas ou secretoras.

As linhagens secretoras são derivadas de células progenitoras que surgem para ocupar a cripta a partir da posição +5 acima do nicho de células-tronco (VAN ES JH, 2012). Um estudo demonstrou que precursores de células de Paneth podem se desdiferenciar para células-tronco Lgr5⁺ após um processo de lesão (BUCZACKI SJA, 2013). Outro grupo de pesquisadores demonstrou que células de Paneth comprometidas podem desdiferenciar em um programa regenerativo para manter a homeostase do epitélio intestinal (CLEVERS H, 2013).

O mapeamento de células-tronco na cripta intestinal demonstra que a maioria se divide simetricamente e que a homeostase é mantida por competição neutra entre duas células filhas (SNIPPERT et al., 2010) O equilíbrio entre a quiescência e a atividade de células-tronco intestinais garante a regulação necessária para a rápida renovação do epitélio, na homeostase do tecido, e reparo dos tecidos lesionados. Durante a morfogênese, esse nicho é influenciado por células epiteliais diferenciadas próximas assim como por células mesenquimais juntamente com a matriz extracelular que permitem a comunicação epitélio-mesênquima (UMAR, 2010).

Estudos demonstraram que a proximidade de células-tronco e células de Paneth evidencia que a função da célula-tronco Lgr5 é promovida por células de Paneth disponível na região. Em experimento *in vivo*, onde foi reduzida parcialmente a população de células de Paneth por mutação de Gfi1 e deleção condicional de Sox9, a redução em número de células-tronco coincidiu com a redução de Paneth (BASAK, O, 2011).

Em processos de lesão ou perda de Lgr5, células precursoras da linhagem secretória e absortiva se desdiferenciam formando novas células Lgr5 para compor as CBC. Estudos investigam que esse *pool* de células-tronco reserva caracterizado na posição +4 é mais resistente à lesão em casos de perda de

Lgr5 e atua como principal fonte de suprimento celular indispensável para regeneração epitelial (METCALFE, 2014).

Assim como Lgr5, outros marcadores de células-tronco como Ascl2 e Olfm4 também foram reconhecidos e se encontram restritos nas criptas intestinais. Ascl2 (*Achaete-Scute complex like 2*) é homólogo dos genes do complexo Achaete- Scute em *Drosophila melanogaster* (ALDERS et al., 1997), que funciona como fator de transcrição e tem sua expressão predominantemente detectada em tecidos extraembrionários. No epitélio intestinal, Ascl2 codifica proteínas reguladoras do destino celular, e é essencial para manutenção de células Lgr5+. Quando superexpresso em outras populações celulares resulta em hiperplasia de cripta e formação de pequenas bolsas (tipo-cripta) hiperproliferativa nos vilos (VAN DER FLIER et al., 2009). Em contrapartida, quando deletado Ascl2 em modelos de organoides, não houve perda de células-tronco, mas houve redução na velocidade de proliferação. Adicionalmente, mostrou-se que a expressão e a resposta de Ascl2 é dependente da via de sinalização Wnt (SCHUIJERS et al., 2015).

Já o gene *Olfm4* (olfactomedina 4), inicialmente caracterizado como hGC-1 (ZHANG et al., 2002), também tem sua função associada com propriedades de célula-tronco intestinal, porém diferentemente dos marcadores Lgr5 e Ascl2, que têm sua expressão regulada pela via Wnt, *Olfm4* tem sua expressão regulada pela via Notch. Em murinos, a glicoproteína foi originalmente identificada como um fator importante na origem de células granulocíticas hematopoiéticas, e posteriormente, a *Olfm4* foi caracterizada na matriz extracelular, com a função de facilitar a adesão celular (ligando-se a caderinas e lectinas de células superficiais) e participar da regulação de ciclo celular (KOBAYASHI et al., 2007; LIU et al., 2006). Além disso, *Olfm4* também é considerado como um alvo transcricional de Notch em células-tronco intestinais. (VANDUSSEN et al., 2012).

Assim, o nicho de células-tronco na cripta do intestino delgado tem a homeostase mantida por meio da expressão de genes como *Lgr5*, *Ascl2* e *Olfm4* com o suporte de um gradiente.

1.6 Vias de sinalização:

Wnt, Notch, EGFR e BMP

A atividade proliferativa e de diferenciação do epitélio intestinal é dependente de um gradiente de sinalização ao longo do eixo cripta-vilo (BEUMER, 2020).

A via de sinalização Wnt desempenha uma importante função no desenvolvimento e renovação do epitélio intestinal. O conjunto de proteínas Wnt forma uma família altamente conservada de

moléculas sinalizadoras de forma autócrina e parácrina. Wnt induz efeitos biológicos por meio de ligação tanto ao receptor Frizzeld como à proteína relacionada ao receptor de lipoproteína (LRP), promovendo um aumento de β -catenina no citoplasma e sua interação com o fator 4 de célula T (TCF4) – fator de transcrição, no núcleo. Em condições normais, a β -catenina forma um complexo de proteínas contendo o complexo polipose adenomatosa (APC), axina e a proteína glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), e seus níveis são rigidamente controlados através da mediação do complexo de degradação ubiquitina/proteasoma (UMAR, 2010).

É evidenciado o envolvimento desta via em diferentes processos como a manutenção de células-tronco e células progenitoras através do controle do ciclo celular, assim como diferenciação, controle da migração e localização de células epiteliais ao longo do eixo cripta- vilosidade, desenvolvimento da linhagem de células secretórias e diferenciação de células de Paneth (RADTKE; CLEVERS, 2005). Como mencionado, o principal componente proteico da via Wnt é a β -catenina que quando translocada para o núcleo da célula é capaz de se ligar a fatores de transcrição e ativar genes alvo para o processo de proliferação celular (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009) (Figura 2). Nesse sentido, para determinar o papel de Wnt e células progenitoras da cripta, dois principais componentes na via (β -catenina e Tcf4) foram deletados, inibindo Wnt ligante e receptor de interação, confirmando a perda de células proliferativas da cripta, o que levou à degeneração intestinal (FEVR; ROBINE; LOUVARD; HUELSKEN, 2007).

Assim como na via Wnt, a função da via de sinalização Notch mediada pelo contato célula-célula é bem estabelecida tanto na regulação do compartimento proliferativo da cripta e proliferação de células progenitoras quanto nos processos de diferenciação de linhagens de células absorptivas em relação às secretoras (ARTAVANIS-TSAKONAS, 1999; RICCIO et al., 2008). Esta via é ativada através de receptores Notch (Notch 1 e Notch 2) e sua família de ligantes DSL (*Delta/Serrate Lag2*) separados em dois subgrupos: *Delta like* (Dll1, Dll3, Dll4) e *Serrate like* (JAGGED1 e JAGGED 2). Dll1 e Dll4 são expressos em células secretoras com expressão proeminente de ligantes DSL por células de Paneth acoplados à membrana que garantem a manutenção da homeostase do ambiente (PELLEGRINET et al., 2012; SASAKI et al., 2016).

O engajamento do receptor Notch e seu ligante, induz a clivagem proteolítica do receptor alfa secretase. O receptor Notch clivado (NCID) se transloca para o núcleo resultando em um ativo complexo transcricional e sua ativação induz a expressão de hairy/enhancer of split (Hes). O fator de transcrição Hes1 ativa a expressão de genes alvo que vai regular a proliferação e diferenciação celular (SCHRODER, 2002).

Para melhor entendimento da função de Notch no intestino, mutações que levam à ativação constitutiva de Notch foram realizadas e resultaram em depleção de células secretórias e aumento da linhagem absorptiva com concomitante aumento da proliferação (FRE et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a sinalização Notch age de forma independente da ação de β -catenina e influencia no controle da proliferação de células progenitoras através da regulação da expressão de p27, proteína que promove a parada do ciclo celular. Ou seja, a sinalização Notch no intestino delgado reprime a expressão da proteína p27 para garantir a manutenção de células proliferativas na cripta (RICCIO et al., 2008).

Outro fator de transcrição, Atoh1 (Math1 para camundongos, Hath1 para humano) é regulado negativamente pela via de sinalização Notch. Atoh1 é expresso em células progenitoras secretoras quiescentes e maduras (Yang, 2001; NOAH; SHROYER, 2013). Consistente com o processo de deleção genética de Hes1 em animais e consequente inibição de Notch, o estudo observou um aumento da ativação de Atoh1 e maior diferenciação de células caliciformes, Paneth e enteroendócrinas no epitélio intestinal. O promotor de Atoh1 tem sido descrito por conter sítios de ligação de Hes, sendo assim, a indução de Hes1 pelo receptor Notch age como um repressor transcricional para silenciar o fator de transcrição Atoh1 e suprimir o destino de células secretórias (DEMITRACK, 2016).

Outro fator regulatório de renovação e reparo tecidual é o fator de crescimento transformante beta (TGF β) e seus receptores T β R1 e T β R2, também pertencentes ao complexo de sinalização da BMP agindo sobre a cascata de sinais intracelulares Smad. Estudos sugerem que a presença da sinalização BMP no topo da vilosidade pode suprimir a sinalização Wnt pela inibição da β -catenina e comprometer o crescimento do vilos (SHYER et al., 2016). Enquanto que a sinalização Wnt estimula a proliferação de células-tronco e células progenitoras na cripta, a sinalização BMP age como um regulador negativo desta proliferação (HE et al., 2004). As atividades de sinalização BMP e Wnt formam gradientes reversos ao longo do eixo cripta vilos para estruturar a autorrenovação e diferenciação das células-tronco intestinais (QI et al, 2017).

Estes gradientes de sinalização também controlam a inter conversão e desdiferenciação de células progenitoras para células-tronco na cripta do intestino delgado, entretanto mecanismos de modificações epigenéticas também estão associados (LINDEMANS et al., 2015).

1.7. Epigenética

Epigenética é o termo que se refere às mudanças na expressão gênica herdadas através de mitose, sem envolver mudanças na sequência do DNA. Mudanças epigenéticas são compreendidas a partir da metilação do DNA, modificação em histonas e cromatinas, além de RNAs não codificantes (JIRTLER, 2007).

Em mamíferos a metilação do DNA se dá por adição covalente de um grupo metil na posição 5' da citosina predominantemente dentro do dinucleotídeo CpG por meio de transferência enzimática pelas DNA metiltransferases (Dnmt). (ROBERTSON, 2001. Os dinucleotídeos CpG podem aparecer em pontos esparsos ou concentrados em regiões conhecidas como ilhas CpG. Estas ilhas são encontradas na região promotora dos genes, responsáveis pela regulação da expressão gênica e são definidas como regiões do DNA maiores que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (LI, 2002). A metilação do DNA é importante no controle de várias funções do genoma. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões, resultando na ausência de transcrição gênica. Essa metilação do DNA é estabelecida por meio da Dnmt *de novo* (Dnmt 3a e Dnmt3b) durante o desenvolvimento e este padrão é mantido após a replicação pela Dnmt1 conhecida como enzima de manutenção que metila citosinas no dinucleotídeo CPG durante a síntese do DNA (FUKUSHIGE, 2009).

O intestino está sujeito às modificações do padrão dietético, como mencionado, e às mudanças morfofuncionais que ocorrem durante o desenvolvimento e se estendem à manutenção até a idade adulta. Em função disso, as células intestinais podem ser alvo de modificações epigenéticas que prosseguem além da infância (KELLERMAYER, 2010). Em mamíferos, o padrão de metilação do DNA muda de uma maneira altamente regulada desde o desenvolvimento do embrião, e as consequências fenotípicas da deleção da Dnmt1 no intestino dependem do estágio de desenvolvimento em que a perturbação ocorre. A metilação aberrante do DNA e a instabilidade do genoma se correlacionam em uma série de patologias, incluindo doença inflamatória intestinal (IBD) e câncer associado à colite (HARTNETT, 2012). Outro estudo realizado em animais, demonstrou que a deleção condicional de Dnmt1 (animais Villin-Cre) causa a hipometilação de regiões regulatórias associadas a vários genes de células-tronco intestinais, em adultos, resultando em expressão gênica inadequada durante a diferenciação e proliferação da zona de cripta. No entanto, nesse modelo, as células da cripta ainda eram capazes de formar novas células para renovar o intestino, e níveis normais de metilação de DNA foram restabelecidos após dois meses de deleção do gene. Ou seja, a redução da metilação não diminui a

capacidade de auto renovação das criptas e causa apenas mudanças modestas na homeostase da cripta intestinal. (SHEAFFER, 2014). Uma análise mais aprofundada revelou que esta recuperação foi devido ao fato de que Dnmt3b tornou-se mais ativo em células deficientes de Dnmt1 e, em seguida, re-metilou o DNA. Deve-se ressaltar que os camundongos que não possuem enzimas Dnmt1 e Dnmt3b morrem antes de nascer. Anteriormente, pensava-se que o gene Dnmt3b agia apenas para estabelecer novos padrões de metilação do DNA, mas essas últimas descobertas sugerem que esta enzima pode atuar também como uma metiltransferase de manutenção. Em resumo, os estudos sugerem que o controle da função da célula-tronco no intestino adulto pode ser influenciado pelo desequilíbrio entre processos epigenéticos maturacionais pós-natais (ELLIOTT, 2016; SHEAFFER, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Sabemos que o desmame e a fase de transição alimentar é um momento crítico e requer adaptações fisiológicas que garantem a saúde e o crescimento do indivíduo, porém pouca informação foi fornecida sobre o impacto duradouro ao longo das idades a partir do desmame precoce.

Entre as funções desempenhadas pelo intestino delgado, a homeostase do tecido epitelial é essencial para a finalização do processo de digestão e metabolismo de nutrientes, além de garantir a função barreira de proteção. Nesse contexto, sabe-se que hormônios, fatores de crescimento, microbiota e a coordenação de transição entre amamentação e desmame também são elementos fundamentais nesse mecanismo de controle metabólico. Considera-se que essas variações podem ter papéis importantes no desenvolvimento de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, alergias alimentares, ulcerações e câncer.

Estudos anteriores evidenciam particular atenção às modificações metabólicas do intestino delgado após o período de desmame natural, porém considerando o desmame precoce uma prática social comum, poucos estudos avaliaram os efeitos da substituição antecipada do leite pelo alimento sólido sobre o intestino delgado e como esses processos de modificação molecular e mecanismos de controle são mantidos até a vida adulta.

Sendo assim, consideramos o aleitamento materno uma importante fonte de nutrientes para o desenvolvimento da criança na primeira infância e entender os potenciais prejuízos da interrupção antes do período recomendado poderá reforçar a conscientização para respeitar os períodos de nutrição e desenvolvimento saudável da criança durante todas as fases da vida.

3. OBJETIVO

O objetivo geral do estudo foi avaliar como o desmame precoce influencia a proliferação celular, a expressão e distribuição de marcadores que caracterizam o nicho de células-tronco, ciclo celular, fatores de crescimento, diferenciação e os impactos metabólicos no epitélio intestinal de ratos. Foram investigados os efeitos imediatos visto em filhotes 3 dias após o desmame e os reflexos na vida adulta.

De forma específica avaliamos:

- ✓ A morfometria do eixo cripta-vilo;
- ✓ O perfil proliferativo de forma aguda até a vida adulta a partir do marcador Ki67;

- ✓ O perfil de expressão de genes marcadores de células epiteliais absorptivas e secretórias, fatores de crescimento; ciclo celular; nicho de células-tronco e vias de sinalização pelo RT-qPCR;
- ✓ Os níveis de expressão proteica dos fatores de transcrição responsáveis pelas vias de sinalização pela técnica de *Western Blot*;
- ✓ Dados metabólicos a partir do teste de tolerância a glicose (GTT);
- ✓ A expressão de genes relacionados as modificações epigenéticas por RT-qPCR;
- ✓ Ensaio de sequenciamento Sanger para identificação das ilhas metiladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Machos e fêmeas de ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) obtidos do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios) foram acasalados e as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB, USP). Os animais tiveram acesso à ração e água *ad libitum*, e foram mantidos sob um ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, com temperatura (22° a 24° C) e exatidão controladas. O protocolo experimental foi aprovado 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 3° 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 dois grupos: amamentado- controle (AM) e desmame precoce (DP) a partir do 15° dia de vida pós-natal. Os animais DP foram separados de suas mães e mantidos em outra gaiola, onde a dieta era 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 21° dia, quando foi realizado o desmame, conforme padrão do biotério. Para que não houvesse ingestão excessiva de leite materno e indução de sobrepeso, controlamos 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 15, 18, 60 e 120 dias de vida pós-natal conforme ilustrado no desenho experimental (figura 3). Em todos os procedimentos foram considerados 3-5 animais/grupo. 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 raspada e conservada em RNAlater® (Ambion) para extração de RNA ou em salina tamponada com Tris (TBS) contendo PMSF pH 7.4 para extração proteica. As amostras obtidas a partir de ambos os procedimentos foram mantidas sob congelamento em freezer -80° C. Outras amostras foram coletadas para fixação em formaldeído 10% para estudo morfológico e imuno-histoquímico em microscopia de luz.

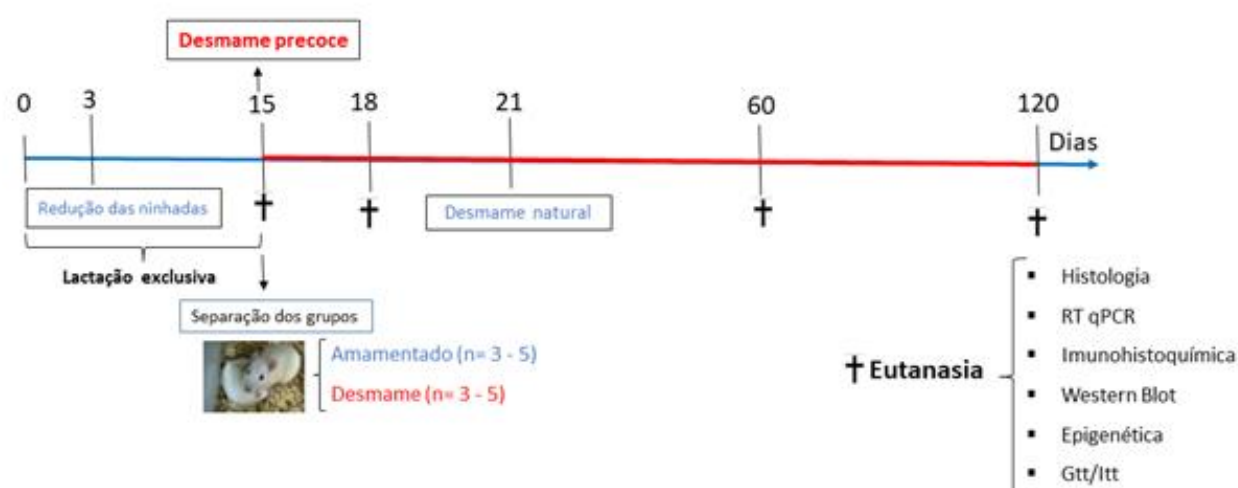


Figura 3. Desenho experimental indicando o tratamento das ninhadas, indução do desmame precoce (15 dias) e idades nas quais foram realizadas as coletas (15, 18, 60 e 120 dias).

4.2 Análise Morfológica

Em cada animal, um segmento do jejuno foi retirado, aberto, acomodado sobre um fragmento de papel cartão, lavado com solução salina 0,9% e mergulhado em solução de formaldeído 10%. Após 4 horas de fixação, cada amostra sobre o papel cartão foi inserida em um cassete plástico, que retornou ao formaldeído para finalização do processo de fixação (12 horas). Ao término deste período, o cassete com o material colocado foi transferido para álcool 70°, onde foi mantido até o momento da desidratação

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

Para análise da morfologia em todas as idades, 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. Células Paneth foram contadas a partir de 10 campos com em média 3 criptas por campo por animal em corte semi fino de 2 micrometros e coradas com HE. Ambas as medidas foram realizadas a partir do software de análise de imagem Image ProPlus v.5.2 (Média Cybernetics, Bethesda, USA).

4.3 Expressão gênica- qPCR

A análise de expressão gênica foi utilizada para detectar os níveis de alguns genes alvos da via de sinalização e ciclo celular, fatores de crescimento e no estabelecimento do nicho de células-tronco. Os ácidos nucleicos totais foram extraídos a partir de cada amostra por homogeneização de tecidos obtidos a partir da raspagem da mucosa do jejuno. Realizamos a extração de RNA segundo o método de Trizol® combinado com o sistema de purificação PureLink® RNA (Kit Ambion) conforme especificações do fabricante.

4.3.1 Extração de RNA

O tecido obtido de cada animal foi acrescido de 1 mL de Trizol® (Invitrogen, Thermo- Fisher) e macerado com homogeneizador elétrico durante 5 minutos para completa dissociação de complexos núcleo-proteicos. Em seguida, às amostras individuais foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Merck), e os tubos foram agitados manualmente 15 segundos, seguido de incubação por 3 minutos em temperatura ambiente (TA). Os tubos foram centrifugados a 12.000 g (15 minutos a 4°C) com a formação de três fases, e 350 μL foram retirados da fase aquosa superior; ao precipitado foram adicionados 350 μL de etanol 70° para extração de RNA; para isolamento do RNA, em seguida agitamos em vórtex para dissolver o precipitado, e o volume total (700 μL) foi passado para o tubo coletor com as membranas (Kit Ambion) e centrifugamos a 12.000 g (30 segundos em temperatura ambiente). Descartamos o filtrado, adicionamos 700 μL de tampão de lavagem I (Kit Ambion) e centrifugamos a 12.000 g (30 segundos em temperatura ambiente). Em seguida descartamos o tubo coletor e colocamos todo conteúdo

em outro tubo com o sistema de membranas para adicionar 500 μL de tampão de lavagem II (Kit) e centrifugar novamente a 12.000 g (30 segundos em temperatura ambiente); depois descartamos o filtrado e centrifugamos por mais 1 minuto a 12.000 g em temperatura ambiente para secar a membrana. Por fim descartamos o tubo coletor e colocamos o sistema de membranas dentro de um tubo com tampa, ao qual adicionamos o volume de 30 μL de água DEPC, incubamos por 1 minuto e centrifugamos a 12.000 g (22 minutos em temperatura ambiente). O RNA total concentrado no volume filtrado foi quantificado no equipamento NanoDrop (ThermoFisher) - (Laboratório da Professora Dra. Patrícia Pereira Coltri - Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento ICB, USP), e posteriormente estocado em *freezer* - 80°C. Para confirmar a integridade do RNA, alíquotas de 1 μL foram separadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (90V, 50 minutos).

4.3.2 Síntese de cDNA – reação com Transcriptase Reversa (RT)

Utilizamos 3 μg de RNA em 0,5 μL de Tampão DNase I 10X, 0,5 μL de DNase I e água DEPC em quantidade suficiente para 9,5 μL . Incubamos a mistura em TA por 15 minutos. Em seguida, adicionamos 0,5 μL de EDTA 25 mM (pH 8,0) e incubamos em termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foi adicionado 1 μL de Oligo (dT) *Primer* e 2 μL de água DEPC para incubação (10 minutos a 70°C). Em cada um dos tubos adicionamos 6 μL de mistura contendo 3 μL de Tampão *First-Strand* 5X, 2 μL de DTT 100 mM e 1 μL de dNTP 10 mM e incubamos por 5 min a 42°C. Em seguida, adicionamos 1 μL de enzima *SuperScript* III (Invitrogen) RT 200 U/ μL e incubamos a 42°C por 50 minutos, e depois a 70°C por 15 minutos. Por fim, adicionamos 1 μL de RNase H 2 U/ μL com incubação a 37°C por 20 minutos. As amostras são mantidas em *freezer* - 20°C.

4.3.3 qPCR

Os genes listados na Tabela 1 foram avaliados com uso de ensaios Taqman *probe* (ThermoFisher). A variação da expressão dos diferentes genes foi comparada entre os grupos experimentais (DP) e os grupos controle (AM).

As reações foram conduzidas em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Utilizamos conforme especificações do fabricante ensaios TaqMan Probe (Thermo Fisher) para um volume final de reação de 20 μL realizadas em duplicata.

Brevemente, 40 ng de cDNA foram amplificados sob as seguintes condições de temperatura e tempo: 50°C por 2 minutos, 95° por 10 minutos, 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, seguidos por 60°

C por 1 minuto. A fluorescência emitida pelo anelamento das amostras aos iniciadores foi medida a um comprimento de onda de 470 nm, e as quantidades relativas calculadas utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os níveis de mRNA para β -actina foram similarmente medidos e utilizados como o gene de referência.

Tabela 1. Genes avaliados por ensaio TaqMan Probe.

Gene	ID de ensaio TaqMan	Proteína codificada
<i>Villin</i>	Rn01447487_m1	Vilina
<i>Lct</i>	Rn01490219_m1	Lactase
<i>Si</i>	Rn00564957_m1	Sacarase/isomaltase
<i>Mucin 2</i>	Rn01498206_m1	Mucina 2
<i>Defa24</i>	Rn02769344_s1	Defensina
<i>Tgfβ1</i>	Rn00572010_m1	TGFβ1
<i>Tgfβr1</i>	Rn00688966_m1	TβRI
<i>Tgfβr2</i>	Rn00579682_m1	TβRII
<i>Lgr5</i>	Rn01509662_m1	LGR5
<i>Olfm4</i>	Rn01465807_m1	OLFM4
<i>Ascl2</i>	Rn00580387_m1	ASCL2
<i>Wnt3A</i>	Rn01471585_m1	Wnt3A
<i>Axin2</i>	Rn00577441_m1	Axina2
<i>Notch1</i>	Rn01758633_m1	NOTCH1
<i>Notch2</i>	Rn01534371_m1	NOTCH2
<i>Atoh1</i>	Rn01425181_s1	ATOH1
<i>Cdkn1b</i>	Rn00582195_m1	P27
<i>Cdk2</i>	Rn01529540_m1	CDK2
<i>Ccne1</i>	Rn01457762_m1	Ciclina E
<i>Egf</i>	Rn00563336_m1	EGF
<i>Egfr</i>	Rn01434447_m1	EGFR
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	Beta-actina

4.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Para o preparo das reações: cortes não seriados de 5 µm foram colocados em lâminas com poli-L-lisina (Sigma) e hidratados em salina tamponada com fosfato (PBS) (0,05 M pH 7,4) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com metanol-H₂O₂ 3% (30 minutos) para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com ácido cítrico 0,01M (pH 6,0) em banho-maria no micro-ondas. Após resfriamento e lavagem em tampão, ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro de cabra 10% e os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de coelho para Ki-67 (Abcam) *overnight* a 4°C. Após lavagem com tampão, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, EUA), seguido de complexo estreptavidina biotina (1 hora, TA) e revelação com diaminobenzidina (DAB) (Sigma) 0,05% + HO₂ 0,15% por 3 minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer 0,1%, diferenciados em solução saturada de carbonato de lítio, montados em Goma de Damar e observados em microscópio de luz. O controle negativo das reações foi obtido pela omissão do anticorpo primário.

4.4.1 Índice proliferativo

A quantificação de células imuno-marcadas para Ki-67 foi realizada na mucosa da região do jejuno em aumento de 100x em microscópio de luz (ocular integradora Zeiss Kpl 1). A ocular integradora apresenta um retículo com linhas que dividem o campo (região quadrangular com 0,52 mm²) em quatro espaços idênticos. Para que se observe toda a mucosa, a lâmina foi cuidadosamente deslocada. O índice proliferativo foi determinado após a contagem de 2.500 células epiteliais (marcadas e não marcadas) por animal, conforme já estabelecido para epitélios de proliferação rápida. O índice foi determinado como total de células epiteliais marcadas/total de células contadas X 100.

4.5 Análise proteica

4.5.1 *Western e immunoblot*

Para a extração proteica, as amostras foram obtidas por raspagem da mucosa da região mediana do jejuno e homogeneizadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM; 1% de NP-40, 1% de ácido deoxicolato de sódio) acrescido de inibidores de protease e fosfatase (leupeptina 100 µg/mL, aprotinina 100 µg/mL, benzamidina 15 mg/mL, ortovanadato de sódio 5 mM e PMSF 0,1 M) e

centrifugadas (12000 g, 5 minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado e submetido à quantificação de proteína total, de acordo com o método de Bradford (1976).

As proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida -SDS. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris 0,5 M, 17% de glicerol, 1,7% de SDS, 0,04% de Bromofenol Blue e 1% de β -mercaptoetanol), aquecidas (5 minutos, 100°C) e distribuídas nos poços do gel (30 μ g proteína total/poço). Após a transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) (2h, 4°C, 100V ou *overnight*, 4°C, 25V) usando tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e 20% de metanol em água), as membranas foram coradas em solução de Ponceau 0,5% (3 minutos) e as colunas com as amostras foram retiradas para *immunoblot*.

As membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS 0,02 M-leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, Brasil) 5% + Tween 20 0,05% ou BSA 5% + Tween 20 0,05% (2 horas, temperatura ambiente), lavadas com TTBS (Tween 20 0,1% em TBS 0,02 M) (10 minutos, temperatura ambiente) e incubadas (*overnight*, 4°C) com anticorpos primários conforme ilustrado na tabela 2. Após lavagens com TBS e TTBS, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (GE Healthcare) (2 h, temperatura ambiente). A revelação foi realizada com kit ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) com registro por captura de imagem em transiluminador GBox (Syngene, Frederick, MD EUA) - Laboratório da Profa. Dra. Estela M. A. F. Bevilacqua, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento ICB, USP. A densidade óptica integrada (IOD) das bandas foram analisadas pelo programa de domínio público Image J (1.37v, National Institute of Health, NIH, EUA). Calculamos a razão entre a IOD obtida para a molécula estudada e a IOD para β -actina, que foi usada como controle interno de carregamento do gel. Determinamos o resultado do grupo controle como 1 e os valores dos outros grupos experimentais foram calculados em relação a ele.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados para *immunoblot*.

Anticorpo	Fabricante	Diluição
p27	Santa Cruz Biotechnology	1:100
Hes1	Thermofisher	1:1000
β -actina	Sigma	1:10000

4.6. Análise Epigenética

Para realizar a avaliação de alterações epigenéticas, optamos por iniciar usando a análise *in silico* que permite observar sequências na região promotora e a presença de ilhas CpG, que caracterizam áreas sujeitas à modificação por metilação. Após a etapa *in silico*, definimos quais seriam as regiões- alvo, e analisamos amostras obtidas de animais adultos de 60 dias nos grupos A e DP para o gene Notch2.

4.6.1. Análise *in silico*

A análise *in silico* buscou inicialmente analisar se a região promotora do gene Notch2 possuía ilhas CpG, região essa passível de metilação, por meio da plataforma Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Os *primers* foram desenhados em regiões que não se sobrepunham às ilhas CpG, sendo possível utilizar os mesmos *primers* em ambas as condições (AM e DP) após o tratamento por bissulfito de sódio. Os primers (tabela 3) foram desenhados com o auxílio do programa MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>) para ensaio BSP (Bisulfite sequencing PCR).

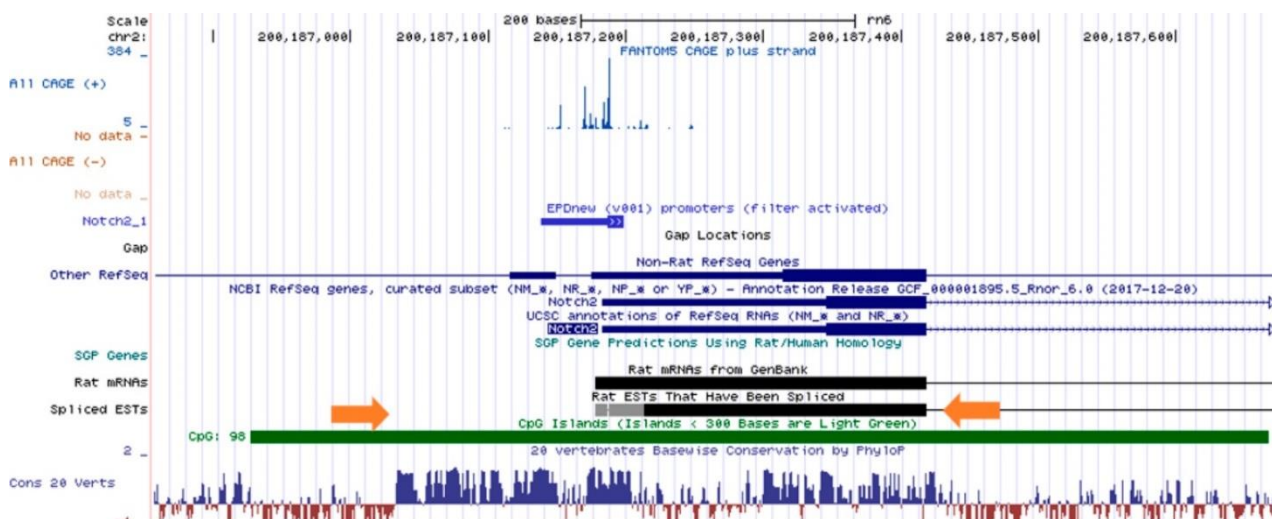


Figura 4: Painel obtido na plataforma Genome Browser demonstrando a região promotora, 5'UTR (barra fina horizontal azul) e os primeiros éxon (barra grossa horizontal azul) e íntron (linha tracejada azul) do gene Notch2. A barra horizontal verde indica a ilha CpG. As setas laranjas indicam a posição dos primers para Notch2.

4.6.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir do tecido de cada amostra de acordo com instruções do *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). Após *scraping* da mucosa do jejuno, 25mg de amostra foram homogeneizados em tampão ATL, adicionados de 20 μ L de proteinase K e cada tubo foi incubado em banho-maria a 56°C, homogeneizando em vortex ocasionalmente até a completa lise do tecido (de 1 hora a 3 hora). Após esse período, foram adicionados 200 μ L de *buffer* AL e 200 μ L de etanol (96 – 100%) e misturado no vortex. A mistura foi colocada em um tubo com coluna, e os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm (1 minuto) com descarte do sobrenadante. As colunas foram colocadas em um novo tubo e foi realizado o processo de lavagem e centrifugação das amostras com os tampões Aw1 e AW2, com centrifugação de 1 minuto (8.000 rpm) e 3 minutos (14.000) respectivamente. O DNA foi eluído em 200 μ L de tampão AE, incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm e armazenado o conteúdo em *freezer* a -20°C. Após quantificação no equipamento NanoDrop (Thermofisher), alíquotas de 1 μ L (300 ng) de DNA foram separadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (90V, 50 minutos) para confirmação de integridade.

4.6.3 Modificação por bissulfito de sódio

Na reação de tratamento do DNA por bissulfito de sódio, todas as citosinas são convertidas em timina e aquelas que estão metiladas (5-metilcitosinas), resistem à modificação, permanecendo como citosinas. Para essa reação, foi utilizado o *kit EpiTect Fast DNA Bissulfit* (Qiagen). Após extração do gDNA, a cada tubo adicionou-se 2 μ L de amostra de DNA com 18 μ L de água livre de RNase, 120 μ L da solução reagente de conversão (solução bissulfito e DNA *protect buffer*) e o conteúdo homogeneizado manualmente. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador para realização das seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 5 minutos, incubação a 60°C por 20 minutos, desnaturação a 95°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 20 minutos. Após esse período, foi realizada a purificação das amostras convertidas seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O material resultante foi utilizado para reação de amplificação da região de interesse por PCR e clonado para ser posteriormente sequenciado.

4.6.4 Amplificação do DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e purificação

Após conversão do DNA por bissulfito de sódio, as ilhas CpGs contidas nos promotores do gene *Notch2* foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* descritos na tabela 2 abaixo. Devido ao

tamanho das ilhas (>1000pb) e fragilidade do material após a conversão por bissulfito de sódio, as regiões alvo foram subdivididas, gerando dois pontos de amplificação e análise em cada uma das regiões promotoras dos genes mencionados.

Para realização do PCR, alíquotas de 3 µL de DNA de cada uma das amostras (controle AM x desmame DP) foram adicionadas a uma mistura previamente preparada contendo 12,5 de HotStar Taq Mix, 1 µL de *primer forward*, 1 µL de *primer reverse* (Tabela x) e 7,5 µL de água MiliQ autoclavada. Em seguida, as amostras foram submetidas ao termociclador com os seguintes parâmetros: 95° por 15 minutos, 35 ciclos de 94° por 40 segundos, 55° por 40 segundos, 72° por 1 minuto e extensão final de 72° por 10 minutos.

Em seguida, os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 120v até a visualização do fragmento de interesse. Os fragmentos foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e para serem clonados no vetor pGEM-T (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito a seguir. Toda a etapa de clonagem foi realizada no laboratório da Profa Dra. Chao Irene Yun Yan sob a supervisão da Dra. Carolina Purcell Goes.

Tabela 3. Primers utilizados para análises de metilação

Gene	Primers
Notch2.1 met-F	AAGGAGTGTGTGGGTGTGTGGGG
Notch2.1 met-R	AGTTTGGtTGAAAGTTTtTGGtTGAG
Notch2.2 met-F	GGGGtAGGGTAGAGtA
Notch2.2 met-R	tAttTtTtAAGAttTAAGtttt

4.6.5 Transformação de bactérias e seleção dos clones

O DNA (vetor+inserto) e 50 µL de bactérias (*E. coli*) foram descongelados em gelo. Foram adicionados 2 µL do DNA à suspensão de bactérias e incubado por 30 minutos em gelo. Para introduzir o DNA nas bactérias, aplicamos um choque térmico de 42 °C por 1 minuto, seguido de imersão em gelo por 1 minuto. Posteriormente, adicionamos 450 µL de SOB (*Super Optimal Broth* – 20g Triptona, 5g de extrato de leveduras, 5M NaCl, 1M KCl, 1M MgCl₂, 1M MgSO₄) sem antibiótico, e os frascos foram incubados no agitador a 37 °C por 1 hora a 180 rpm. Após esse intervalo, distribuimos o material em placa de Petri contendo LB-ágar e o antibiótico de seleção (Ampicilina 100mg/ml). No dia seguinte,

verificamos as colônias positivas por PCR de colônia e eletroforese em gel de agarose 1%. As colônias positivas foram cultivadas em tubos de ensaio com 3 mL de LB com antibiótico de seleção *overnight*. Em seguida, os plasmídeos contendo o fragmento de interesse foram purificados com o kit PureLink HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen, Waltham, MA, USA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

4.6.6 Sequenciamento Sanger

O sequenciamento bidirecional do gene Notch 2 usado para identificação de metilação do DNA, foi realizado nos sequenciadores automáticos ABI Prism Genetic analyser ABI3500XL (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, Carlsbad, California, EUA) do centro de sequenciamento do ICESP (instituto do Câncer do Estado de São Paulo). Foram desenhados e sequenciados primers para região de interesse. Em seguida foi realizada amplificação por PCR convencional, reação de sequenciamento com BigDye Terminator (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, Carlsbad, California, EUA) e em sequência a purificação final em coluna de sílica e aplicação do produto no sequenciador.

4.7 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Após um jejum prévio de 8 horas, os testes foram realizados nos períodos experimentais de 15, 18, 60 e 120 dias, e foram realizados com a administração de glicose 10%, via intraperitoneal, ao longo de 120 minutos na proporção de 1g glicose/kg de peso corpóreo. A glicemia capilar caudal foi analisada com medidor manual de glicemia (Accu-Chek / Active /Roche® Diagnostic/ Mannheim – Alemanha) nos tempos: 0 (pré-injeção), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

4.8 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 teste *t* de Student não pareado para análises entre os grupos da mesma idade, ou ANOVA *one way* seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey em caso de significância. Para investigar as relações entre os variáveis e para visualizar padrões significativos nos dados de expressão gênica, realizamos também a análise de componentes principais (PCA). O gráfico de heatmap foi construído para verificar

os efeitos do desmame precoce (DP). A área sob a curva (AUC) foi calculada para GTT. As comparações de progressão entre as idades foram feitas usando o *RStudio* software 1.0.153 (RStudio: Integrated Development Environment for R, Inc., Boston, MA, USA). Foi adotado grau de significância $P < 0,05$ e valores até 0,07 foram considerados tendência.

5. RESULTADOS

Para melhor entendimento dos resultados obtidos neste estudo, os dados estão apresentados em subitens de forma sequencial (a numeração das figuras é indicada sequencialmente ao texto introdutório). Inicialmente apresentamos os resultados do efeito do DP sobre a morfologia, índice proliferativo, células diferenciadas e expressão dos principais genes envolvidos nas diferentes idades (18, 60 e 120 dias). Além disso, avaliamos as implicações fisiológicas do DP sobre o metabolismo de glicose através do teste de tolerância à glicose. A partir dos resultados obtidos através da expressão gênica, verificamos se essas alterações poderiam ter sido comprometidas por modificações epigenéticas.

5.1 Análise morfológica do jejuno de animais submetidos ao desmame precoce

Observamos que aos 18 e 60 dias houve uma redução da altura da vilosidade no grupo submetido ao DP em relação ao grupo amamentado (AM) ($P < 0,05$) (Figuras 5A e 5C). Essa diferença não foi vista aos 120 dias. Já no compartimento da cripta, observamos diferença somente entre os mesmos grupos em relação ao desenvolvimento da idade ($P < 0,05$) (Figuras 5B e 5D). Ao fazermos uma análise comparativa da altura do vilo e profundidade da cripta ao longo das idades nos respectivos grupos, AM e DP, podemos notar que enquanto os animais AM mantêm o tamanho da vilosidade até os 60 dias, e apresentam uma redução aos 120 dias, nos ratos em DP houve um crescimento entre 18 e 60 dias, e uma diminuição aos 120 dias (Figura 5E). Para esse compartimento funcional, notamos também que a altura do vilo após o DP foi sempre menor em relação aos grupos que foram amamentados normalmente.

Já a profundidade de cripta manteve-se mais estável, quando comparada entre as idades em AM e em DP (Figura 5F).

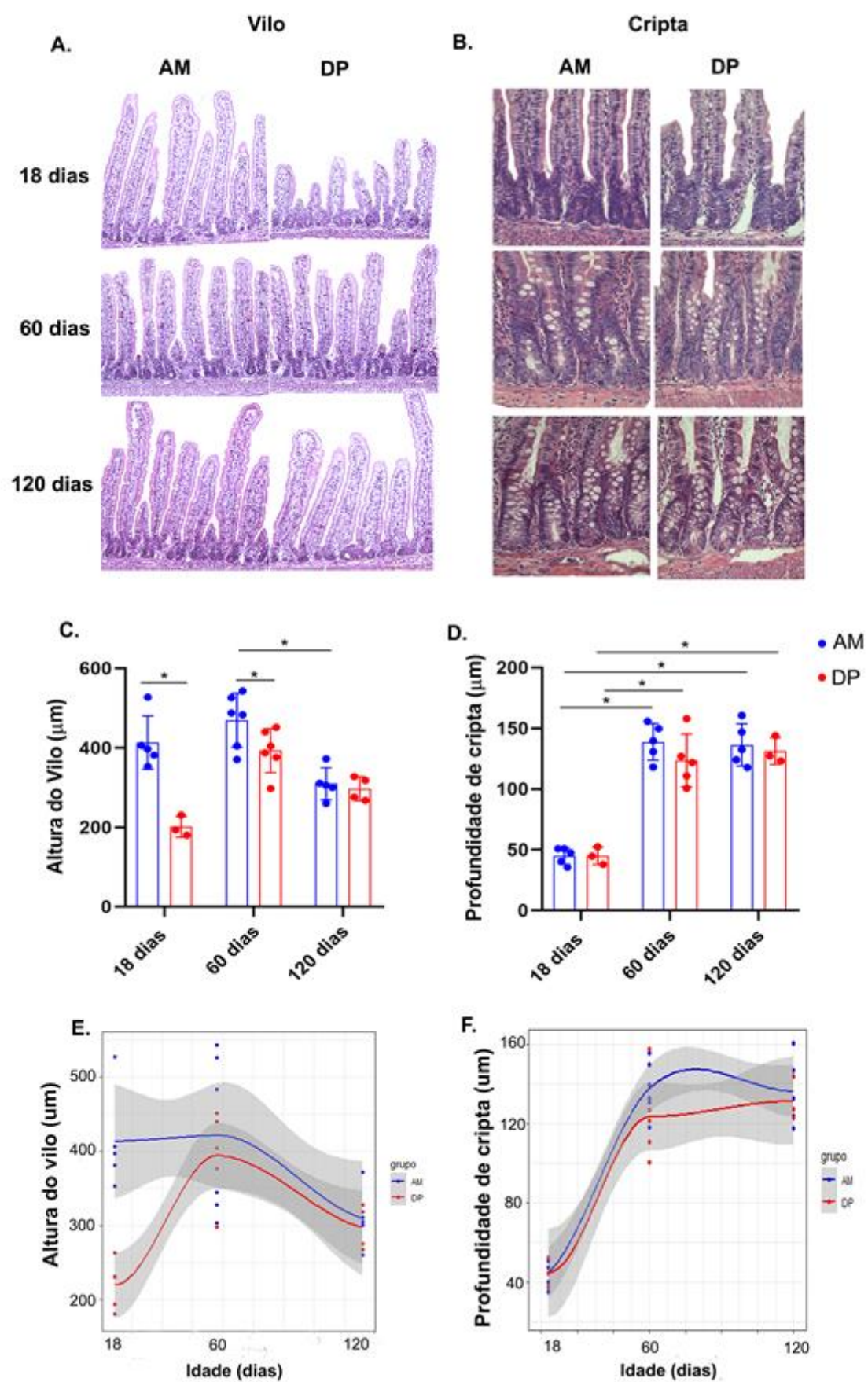


Figura 5. Análise morfológica do jejuno de ratos submetidos ao desmame precoce aos 18, 60 e 120 dias de vida pós-natal. A-B. imagens representativas da mucosa intestinal (vilo e cripta) nos grupos amamentado (AM) e desmame precoce (DP) nas diferentes idades. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). **C-D.** Análise morfométrica da altura do vilo e profundidade de cripta comparado entre AM e DP nas diferentes idades. Cada ponto representa um animal e as barras indicam a média \pm DP. **E-F.** Análise comparativa da altura do vilo e profundidade da cripta ao longo das idades. Foram analisados 10 campos por animal. Aumento original de 20x para o vilo e 40x para a cripta. Análise por ANOVA seguida por teste de Tukey. A comparação de progressão entre as idades foi feita por *RStudio* * $P < 0,05$.

5.2 Efeito do desmame precoce sobre o índice proliferativo e marcadores de ciclo celular

Posteriormente, verificamos se o DP influencia a proliferação celular no jejuno e se o efeito seria compatível com modificações na expressão de genes marcadores do ciclo celular. Para isso, determinamos o índice proliferativo usando a imuno-marcação para Ki-67 aos 18, 60 e 120 dias (Figura 6A), assim como, analisamos a expressão de *Cdkn1b* que codifica a p27, proteína pertencente ao grupo de quinases inibidoras de cdk (CKI) e regula os complexos ciclina-cdk. As mesmas análises foram feitas para os genes *Ccne1* e *cdk2* que atuam no final da fase G1 auxiliando nos processos de replicação do DNA.

Podemos observar uma redução significativa do índice proliferativo aos 18 dias nos animais DP quando comparados aos filhotes em AM ($P < 0,05$), e esse efeito se manteve aos 60 dias de vida pós-natal ($P < 0,05$) (Figura 6B). Aos 120 dias, não detectamos variação. Em relação ao ciclo celular, verificamos que os níveis de expressão de *Cdkn1b* apresentaram um significativo aumento no grupo DP aos 18 e 120 dias ($P < 0,05$) e uma elevação aos 60 dias quando comparado ao grupo AM ($P = 0,06$; Figura 6C). Em relação à expressão do gene *cdk2*, não observamos diferenças, e os níveis de *Ccne1* só apresentaram uma variação, de aumento discreto, aos 60 dias ($P = 0,06$) (Figuras 6D -E).

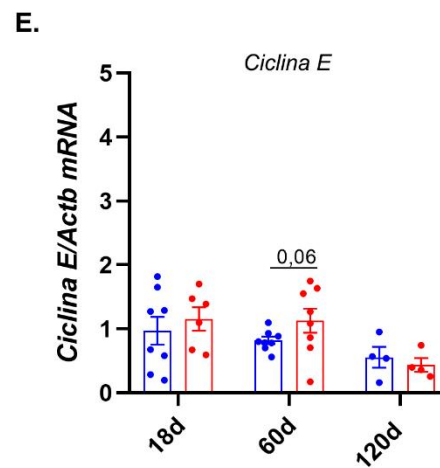
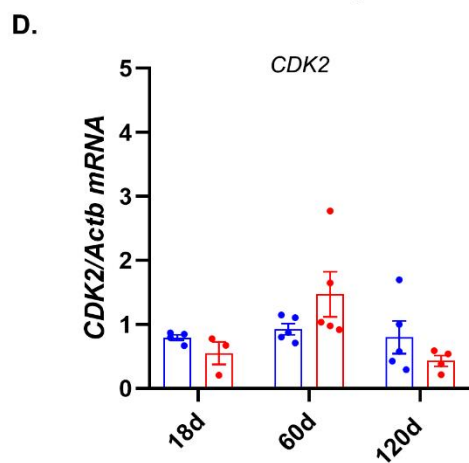
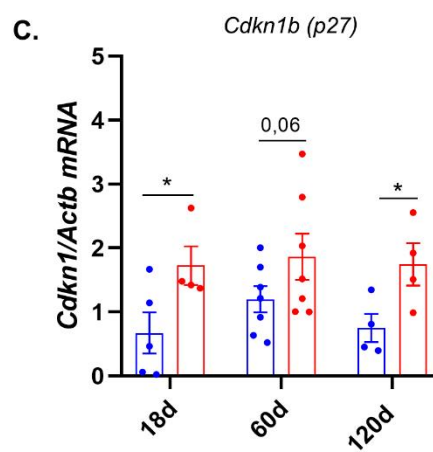
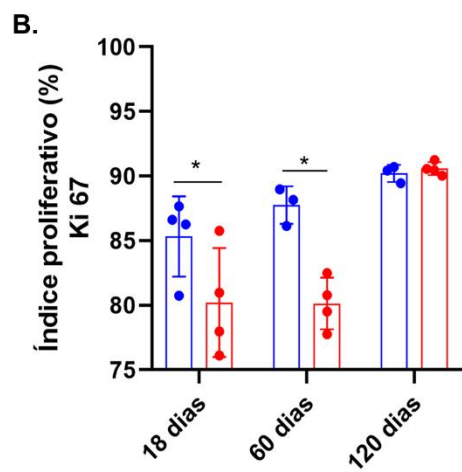
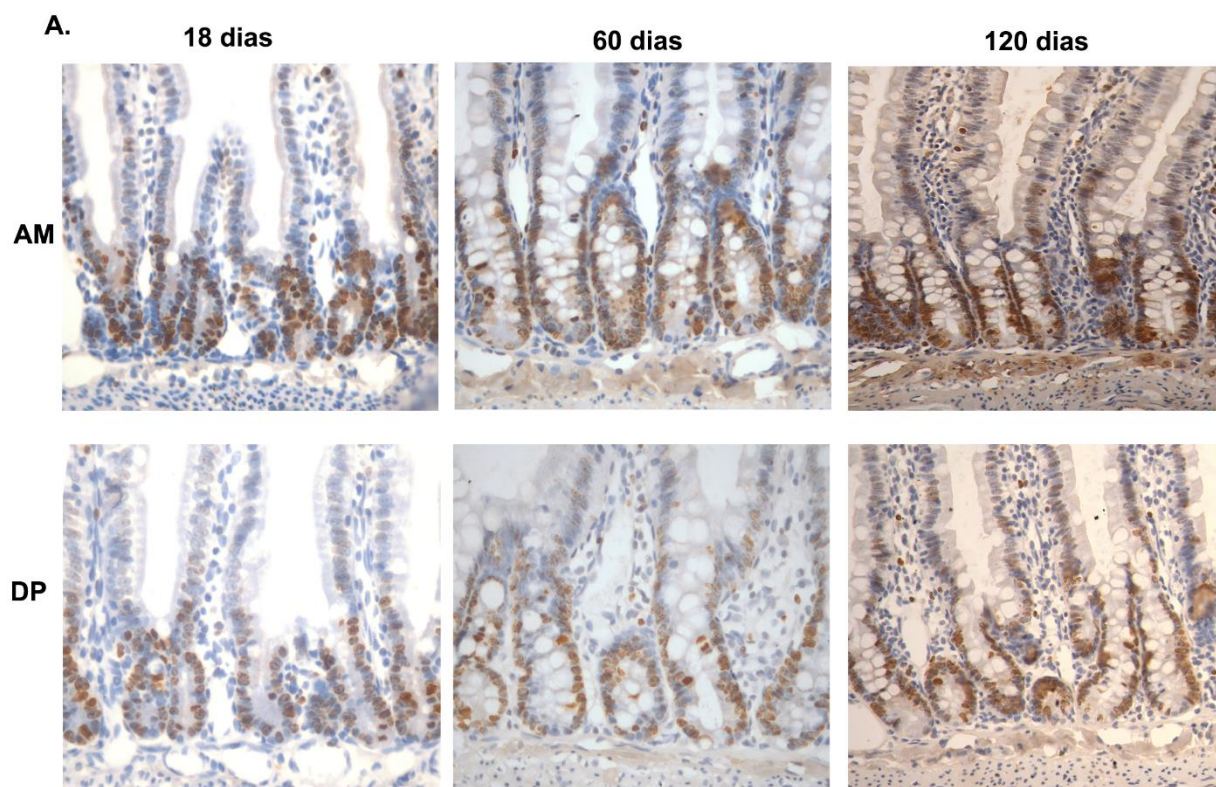


Figura 6. Índice proliferativo no jejuno de animais com 18 e 60 dias de vida pós-natal submetidos ao desmame precoce. **A.** imagem representativa de imuno-histoquímica para Ki-67. Revelação com DAB-H₂O₂ e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. **B.** Índice proliferativo (%). Cada ponto no gráfico representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam a média \pm DP. Imagens capturadas em aumento original de 40x. **C, D, E.** Expressão de *Cdkn1b*, *cdk2* e *Ccne1* (ciclina E). Comparação relativa entre grupos AM – amamentado e DP – desmame precoce. O gene β -actina foi usado como controle interno. Os resultados foram realizados por análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey. * $P < 0,05$.

5.3 Avaliação do desmame precoce sobre marcadores de vias de sinalização

Com intuito de verificarmos como desmame precoce afeta as vias de sinalização atuam nas diferentes mudanças do processo de proliferação e diferenciação celular, avaliamos a expressão dos principais genes marcadores das vias de Wnt, Notch e BMP.

Os níveis de *Wnt3A* foram reduzidos pelo DP aos 18 dias ($P < 0,05$), ao passo que apresentaram um aumento significativo no grupo DP aos 60 dias ($P < 0,05$) (Figura 7A), e não foram alterados aos 120 dias. Já o gene *Axin2*, que codifica a proteína axina, parte do complexo Wnt/ β -catenina, apresentou uma diminuição aos 18 dias nos animais DP em relação ao seu controle AM (Figura 7A), e aos 60 e 120 dias, não detectamos alterações.

Através da mesma abordagem, analisamos os genes que expressam os receptores Notch1 e Notch2 e seu alvo *Atoh1* que age de forma antagônica aos receptores. O DP diminuiu os níveis de expressão de *Notch1* aos 18 ($P = 0,054$) e 60 dias ($P < 0,05$), e não causou alterações aos 120 dias (Figura 7B). A expressão do gene *Notch2* não foi afetada pelo desmame precoce aos 18 e 120 dias, porém foi reduzida significativamente aos 60 dias ($P < 0,05$) (Figura 7B). Em relação ao gene *Atoh1*, antagonista de Notch e ativador transcricional induzido por células progenitoras secretoras, observamos uma redução significativa aos 18 dias no grupo DP ($P < 0,05$), porém em contrapartida, houve um efeito contrário nos animais adultos com um aumento significativo aos 60 e 120 dias em animais em DP em relação ao controle AM ($P < 0,05$) (Figura 7B).

Quanto ao regulador negativo da proliferação, a expressão do gene *BMP2* aumentou de modo significativo aos 18 dias após o DP ($P < 0,05$), e foi regulada de forma oposta aos 60 dias, com uma diminuição em animais em DP ($P < 0,05$). Aos 120 dias, não houve alteração para esse gene (Figura 7C).

A partir do resultado da expressão gênica reduzida de *Notch1* e *Notch2* aos 60 dias, optamos por analisar a expressão proteica do fator de transcrição Hes1 que apresentou uma redução significativa após o DP nessa idade ($P < 0,05$) (Figura 7D).

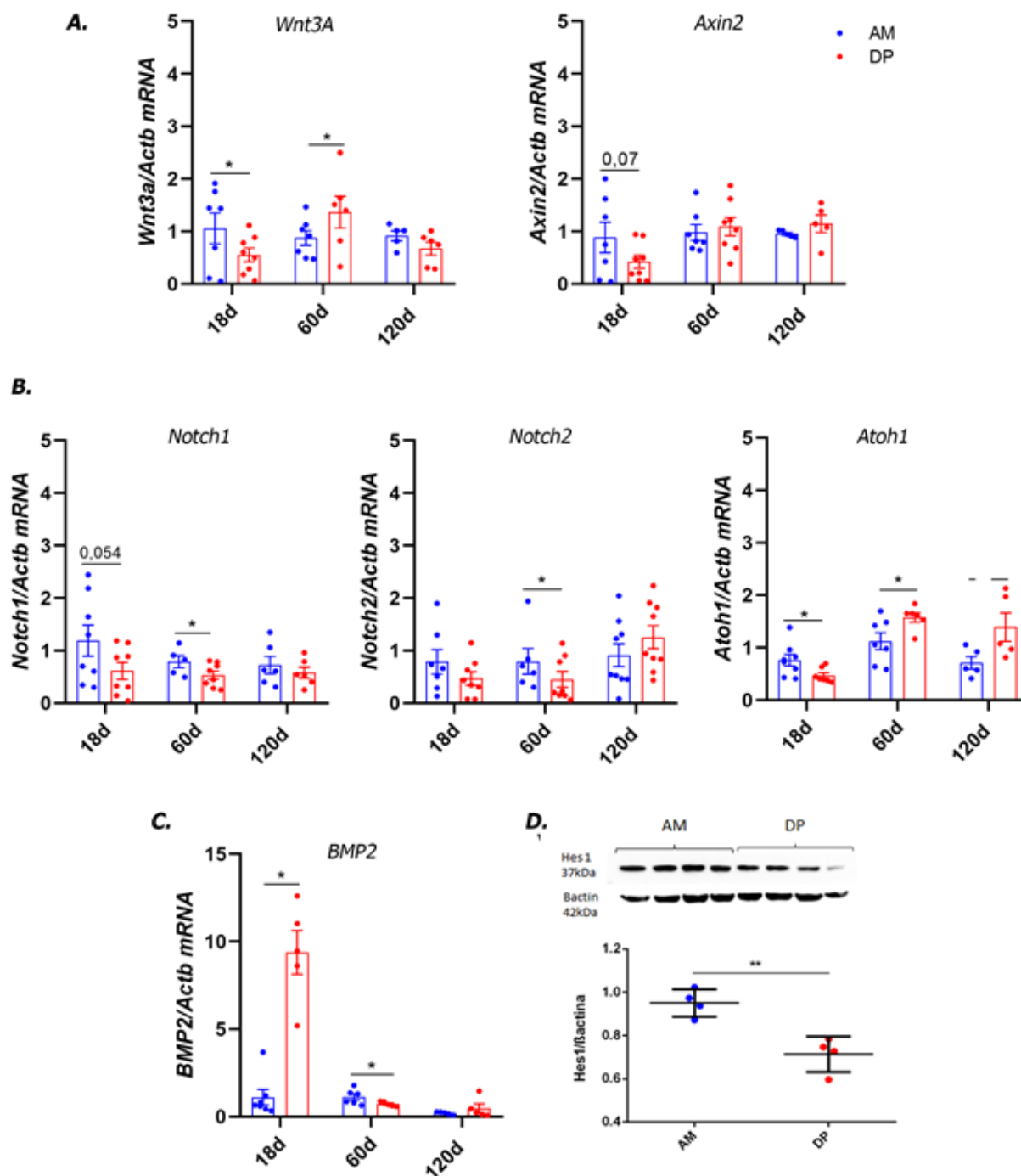


Figura 7. Efeito do desmame sobre marcadores de expressão gênica e proteica das principais vias de sinalização da mucosa intestinal. A, B, C. Expressão gênica após análise por RT-qPCR. O gene β -actina foi usado como controle interno. **D.** *Immunoblot* representativo para o fator de transcrição Hes1. Foi realizada duplicata técnica da corrida e do *blot*. A leitura das bandas foi normalizada com a leitura de β -actina em cada corrida. Cada banda e cada ponto representa o resultado obtido em um animal e as linhas indicam média \pm DP. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas considerando $*P < 0,05$. Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey e teste *t* de *Student* para análise proteica após o *immunoblot*.

5.4. Avaliação do desmame precoce sobre a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento

Em seguida, avaliamos se o DP influencia a expressão de genes marcadores de fatores de crescimento como *EGF* e *Tgf β* . Verificamos que não houve alteração nos níveis de *EGF* ao longo das idades (Figura 8A), enquanto seu receptor *EGFR* teve uma diminuição somente nos animais DP aos 60 dias ($P < 0,05$) (Figura 8A).

Através da mesma abordagem, observamos que aos 18 dias, os animais DP apresentaram uma redução significativa nos níveis de mRNA de *Tgf β 1* quando comparados ao grupo AM ($P < 0,05$) sem alteração dos níveis de seus receptores *Tgf β 1* e *Tgf β 2* na mesma idade (Figura 8B). Já na vida adulta, não observamos diferenças nos níveis de expressão gênica para esses marcadores aos 60 e 120 dias de idade.

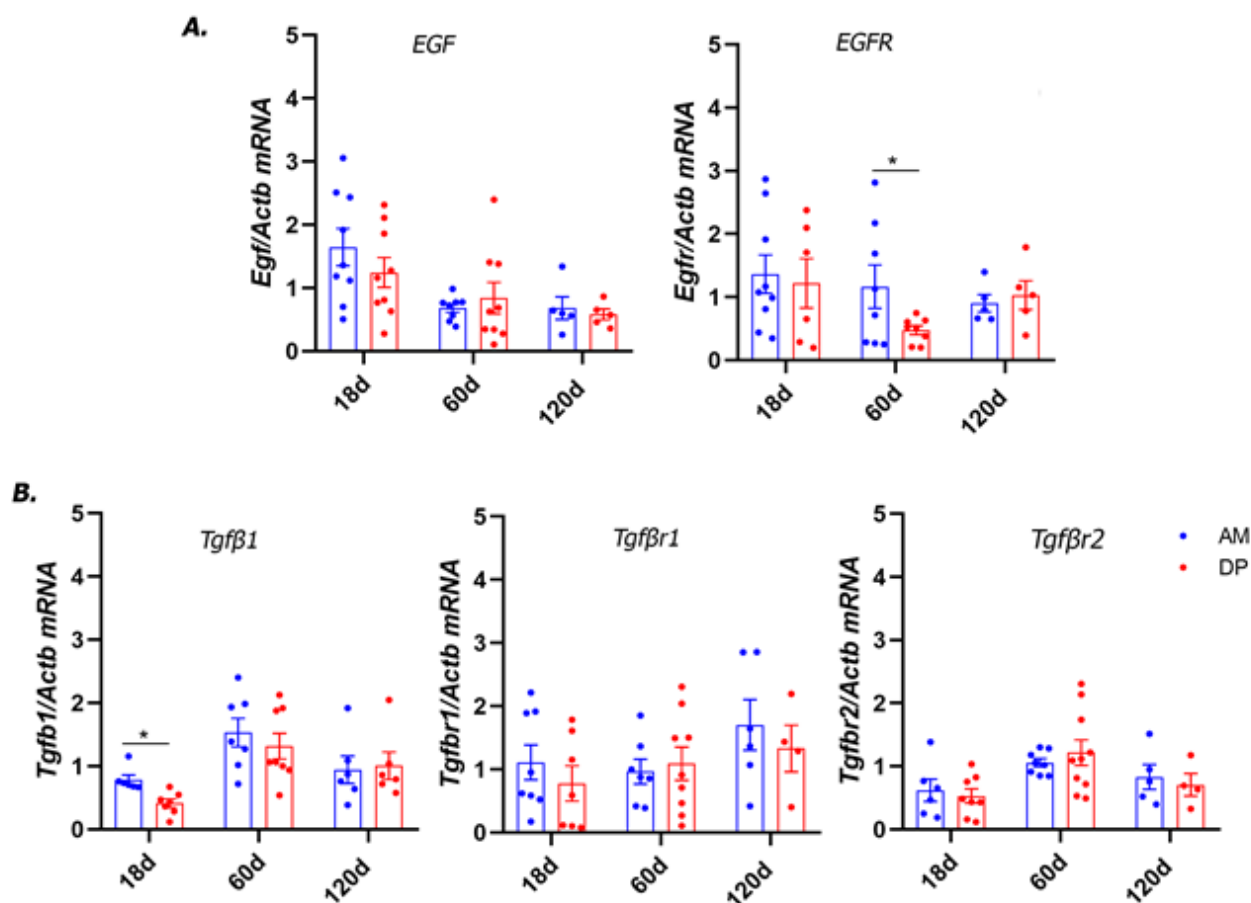


Figura 8. Efeito do desmame precoce sobre a expressão de genes marcadores de fatores de crescimento. A–B. Expressão gênica após análise realizada por RT-qPCR. Comparação relativa entre grupos AM e DP. O gene β -actina foi usado como controle interno. Cada ponto representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam média \pm desvio padrão. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas considerando Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey. * $P < 0,05$

5.5 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de células Paneth e expressão de genes marcadores de células-tronco

Mecanismos que afetam o desenvolvimento em número e função das células Paneth estão associados às mudanças da homeostase intestinal. Essas células, em intestino de ratos, se diferenciam em torno de 14 dias de vida pós-natal. A partir da quantificação, observamos que o número de células Paneth aumentou aos 18 dias e se manteve mais alto nos animais de 60 dias em DP em relação ao AM ($P < 0,05$) (Figuras 9A e 9B). Aos 120 dias não houve diferença entre os grupos (Figura 9B). Comparativamente ao longo do tempo, aos 120 dias, a distribuição foi maior em relação aos 18 e 60 dias. As células de Paneth têm a defensina como um de seus produtos, como uma proteína antimicrobiana secretada no lúmen intestinal para modulação da resposta imunológica local. Observamos que o DP induziu um aumento significativo da expressão do gene aos 18 dias ($P < 0,05$) (Figura 9C), e aos 60 dias, o resultado foi semelhante ($P = 0,07$). Aos 120 dias não houve diferença entre AM e DP (Figura 9C).

Sabe-se que o compartimento de células-tronco presente na cripta intestinal é responsável por garantir a contínua proliferação e auto renovação celular, assim como a manutenção da integridade do epitélio intestinal. Avaliamos as respostas do desmame precoce sobre diferentes marcadores moleculares de célula-tronco e suas alterações até a vida adulta.

Em filhotes, verificamos que houve uma redução dos níveis de *Lgr5* nos animais DP quando comparado aos animais AM ($P < 0,05$). Em contrapartida nos animais adultos com 60 dias esses valores se inverteram e os animais DP apresentaram um aumento do mRNA de *Lgr5* ($P < 0,05$) em relação ao controle AM. Essas diferenças não foram observadas aos 120 dias de vida (Figura 9D).

Já o gene *Ascl2*, que tem sido proposto como um gene regulador de células *Lgr5*⁺, apresentou comportamento semelhante ao gene *Lgr5*, com níveis reduzidos ($P < 0,05$) na sua expressão aos 18 dias em animais DP. De forma inversa, aos 60 dias, verificamos um aumento ($P < 0,05$) no grupo DP em relação ao grupo controle amamentado (Figura 9D) e aos 120 dias os níveis mantiveram reduzidos ($P < 0,05$). O gene *Olfm4*, estudado como um potencial marcador de célula-tronco, não apresentou alterações nas idades estudadas (Figura 9D).

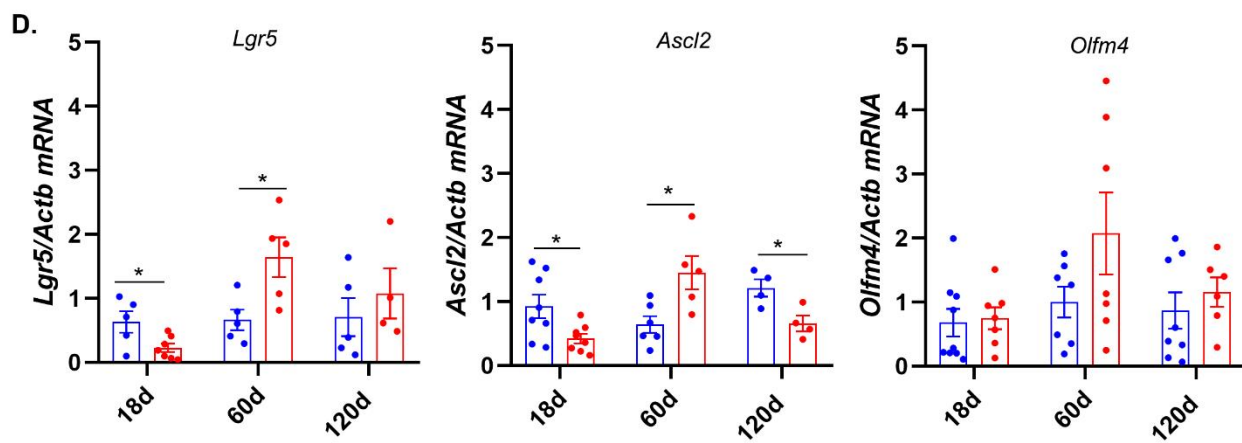
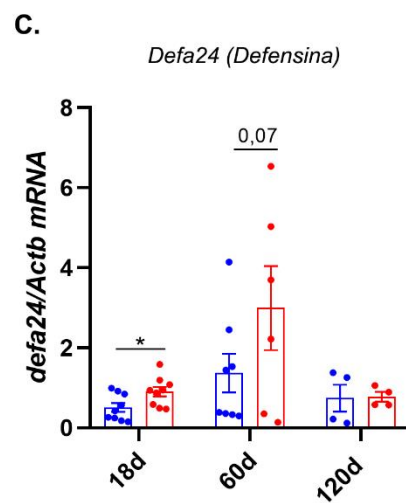
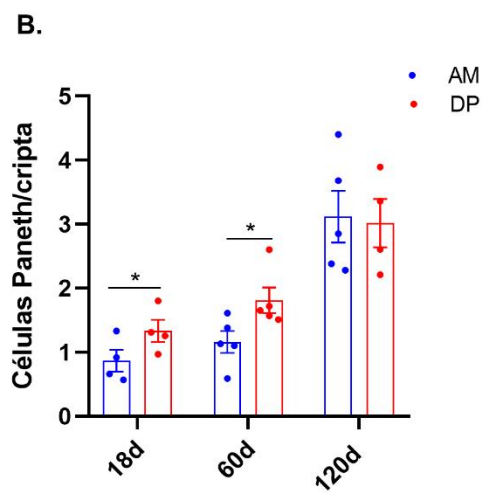
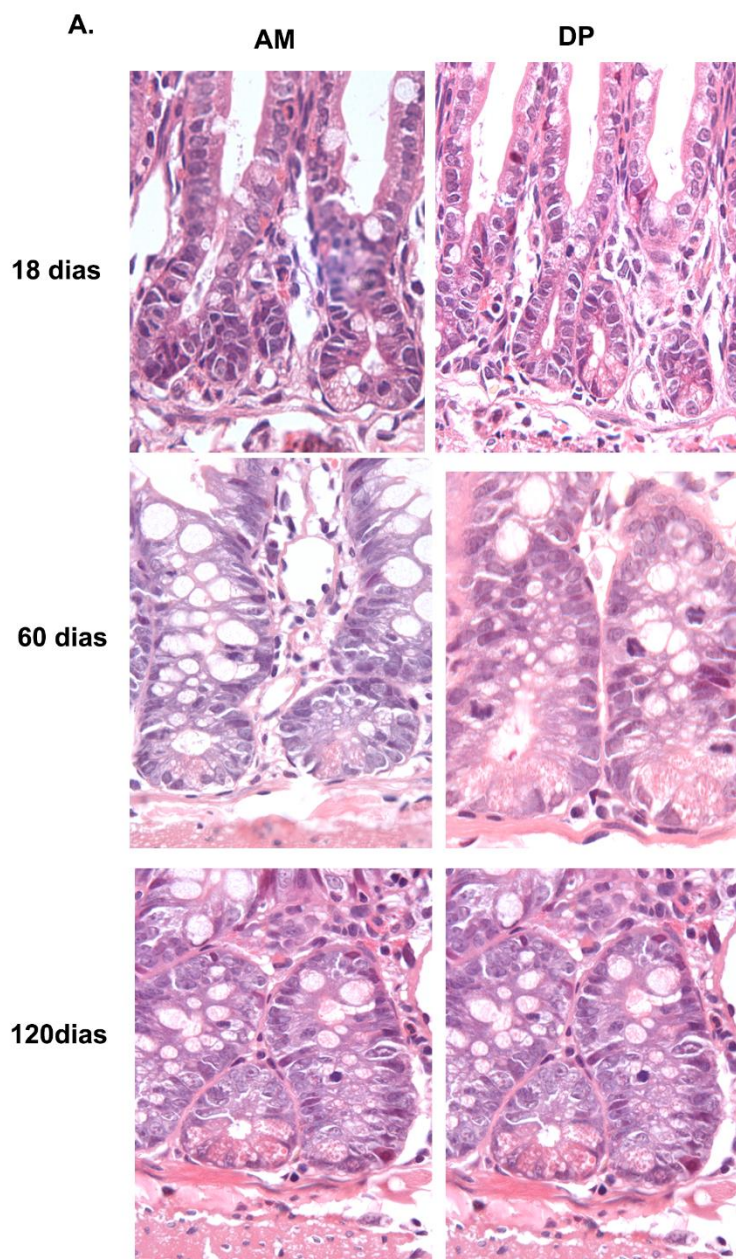


Figura 9. Efeito do desmame sobre a distribuição de células de Paneth e sobre os marcadores gênicos do nicho de célula-tronco intestinal na mucosa intestinal de ratos em diferentes idades. A. Imagem representativa da cripta intestinal onde se observam as células de Paneth (setas) nas diferentes idades, comparação entre grupos AM e DP. **B.** Quantificação de células Paneth por cripta. Cada ponto no gráfico representa o resultado obtido em um animal. **C.** Expressão gênica de *Defa24* (defensina), um dos marcadores da célula de Paneth. Análise realizada por RT-qPCR. **D.** Comparação relativa entre grupos amamentado (AM) e desmame precoce (DP). O gene β -actina foi usado como controle interno. Cada ponto representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam média \pm DP. Os resultados foram analisados por análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey. * $P < 0,05$.

5.6 Efeito do desmame precoce sobre as populações celulares ao longo do eixo cripta-vilo

A fim de analisar se a redução morfológica do epitélio do jejuno alterou o tamanho das populações celulares no eixo cripta-vilo, realizamos a quantificação de células absortivas e secretórias. Além disso, avaliamos o perfil gênico dos principais marcadores das células epiteliais.

5.6.1 Distribuição de enterócitos

Sabemos que o epitélio intestinal é composto em sua maior parte por células absortivas também denominadas enterócitos, e em função das alterações observadas nos compartimentos proliferativo e funcional em diferentes idades, após o DP analisamos o número de células absortivas, correlacionando essa distribuição com o tamanho do vilo.

Os resultados mostraram que o DP induziu uma redução do número de enterócitos somente em animais de 18 dias ($P < 0,05$), sem alteração significativa nas idades de 60 e 120 dias (Figura 10A). Quando os grupos AM e DP foram comparados entre as diferentes idades, notamos uma diminuição significativa do número de células entre 60 e 120 dias ($P < 0,05$) (Figura 10A). Na Figura 10B demonstramos que a variação do tamanho do vilo acompanhou a variação da população de enterócitos em animais AM e DP, de forma que houve um pico no número de células/campo aos 60 dias (Figura 10B). Porém se comparada a Figura 5C, observamos que o efeito do DP foi significativo sobre a altura dos vilos aos 60 dias (Figuras 5A e 5C), mas não se repetiu sobre o número de enterócitos/campo (Figura 10A).

5.6.2 Expressão gênica de marcadores das populações epiteliais

Sabemos que após a terceira de semana de vida pós-natal, ocorrem mudanças na expressão de enzimas no epitélio intestinal, entretanto com intuito de verificar se a mudança do padrão alimentar alteraria a expressão gênica de enzimas específicas para o processo de absorção e digestão de nutrientes, realizamos ensaios de RT-qPCR.

Iniciamos a avaliação pela observação da expressão de *villin* que codifica a vilina, proteína acessória do citoesqueleto que compõe as microvilosidades nos enterócitos. Não observamos diferenças entre grupos (Figura 10C). Em seguida, comparamos a expressão de *Si* (sacarase) e *Lct* (lactase) que estão diretamente ligadas à transição de dieta no desmame. Observamos que a enzima *sacarase/isomaltase*, responsável pela digestão de carboidratos da ração, teve seus níveis aumentados nos animais DP somente aos 18 dias ($P < 0,05$) (Figura 10C), enquanto a *Lct* teve seus níveis diminuídos

aos 18 dias nos animais DP em relação ao AM ($P < 0,05$). Esses efeitos não foram detectados aos 60 e 120 dias, quando a expressão de ambas as enzimas foi semelhante entre AM e DP.

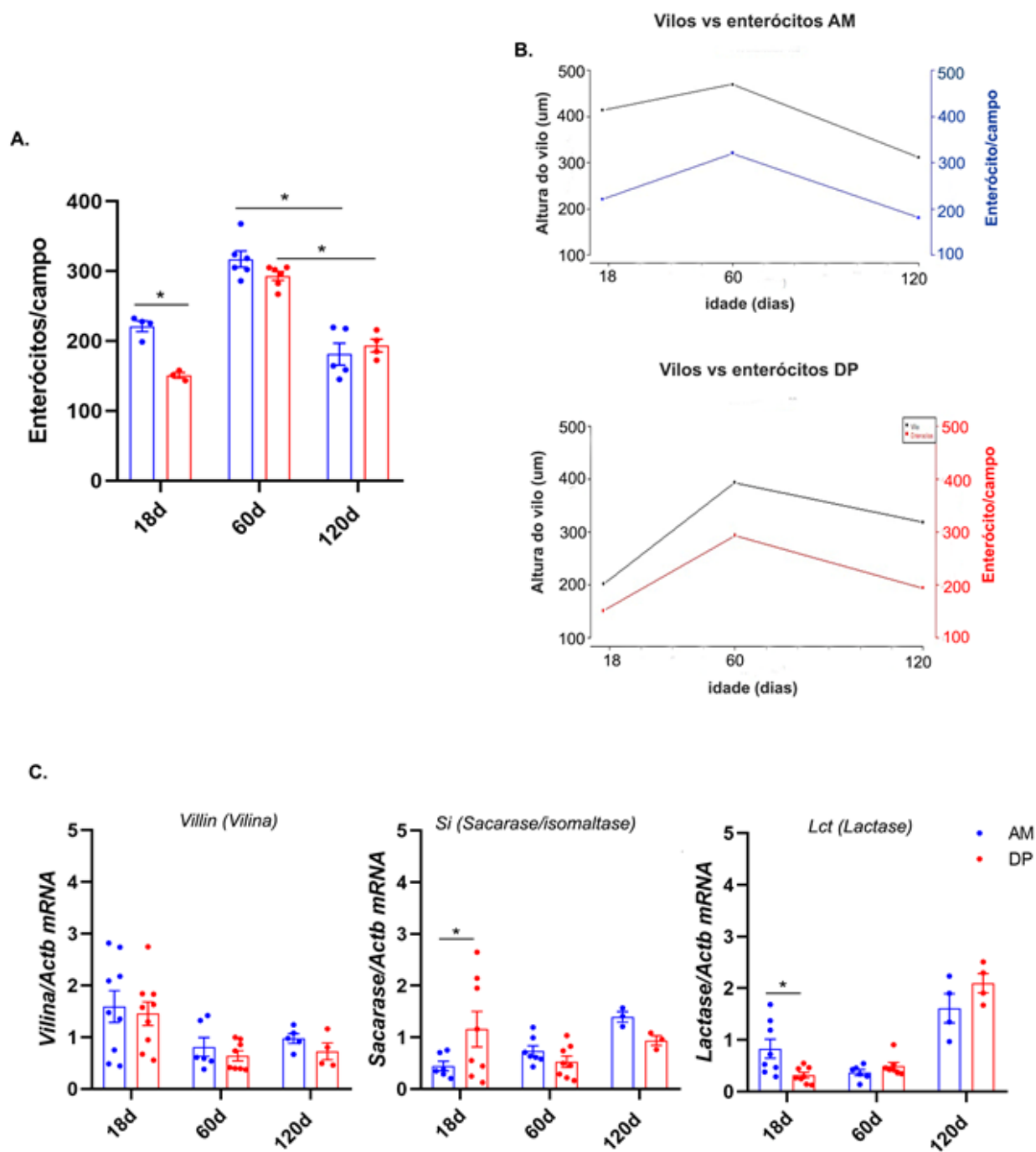


Figura 10. Efeito do desmame precoce sobre a distribuição de enterócitos no compartimento do vilo e marcadores epiteliais ao longo do desenvolvimento. **A.** Distribuição de enterócitos/campo nos vilos. Cada ponto representa um animal e as barras indicam a média \pm DP. Foram contados 10 campos/animal e para cada um foi obtido um número médio de células/campo. **B.** Análise comparativa do número de enterócitos/ campo em relação à média do comprimento do vilo nos dois grupos. **C.** Expressão de genes que identificam os enterócitos. O gene β -actina foi usado como controle interno do RT-qPCR. Cada ponto representa o resultado obtido em um animal e as barras indicam média \pm DP. Dados analisados por ANOVA seguida por teste de Tukey. Comparação de vilo vs enterócitos entre as idades foram feitas por *RStudio* * $P < 0,05$.

5.6.3 Distribuição de células caliciformes

Após o desmame precoce, avaliamos também o número de células caliciformes positivas para a reação com PAS distribuídas ao longo do eixo cripta-vilo (Figuras 11A e 11B).

Observamos que o desmame precoce diminuiu de forma significativa o número de células caliciformes PAS-positivas/campo no vilo aos 18 dias e essa redução foi mantida até 60 dias no grupo DP comparado ao controle AM ($P < 0,05$) (Figura 11A e 11C). De forma inversa aos resultados apresentados nas outras idades, aos 120 dias houve um aumento significativo de células caliciformes positivas/campo no grupo DP em relação ao AM ($P < 0,05$) (Figuras 11A e 11C). Já na cripta, observamos que aos 18 e 60 dias o DP não alterou a distribuição de células caliciformes (Figuras 11B e 11C), porém de forma interessante, aos 120 dias essa distribuição aumentou também no compartimento da cripta ($P < 0,05$) (Figura 11B e 11C), como ocorreu no vilo. Além de observar as células caliciformes contendo grânulos secretórios positivos para o PAS, avaliamos os níveis de expressão de *muc2*, que apresentaram um aumento significativo no grupo DP aos 18 ($P < 0,01$), que foi seguido por uma redução aos 60 dias ($P = 0,07$) (figura 11D).

Quando os resultados obtidos foram comparados com a análise morfométrica da altura do vilo e profundidade da cripta ao longo do tempo, notamos que a distribuição das células caliciformes foi paralela à variação do tamanho do vilo, havendo assim um pico aos 60 dias (Figura 11E). Por outro lado, embora a profundidade da cripta tenha se mantido estável ao longo do tempo, o número de células caliciformes/campo também atingiu um pico aos 60 dias em ambas as dietas (Figura 11E).

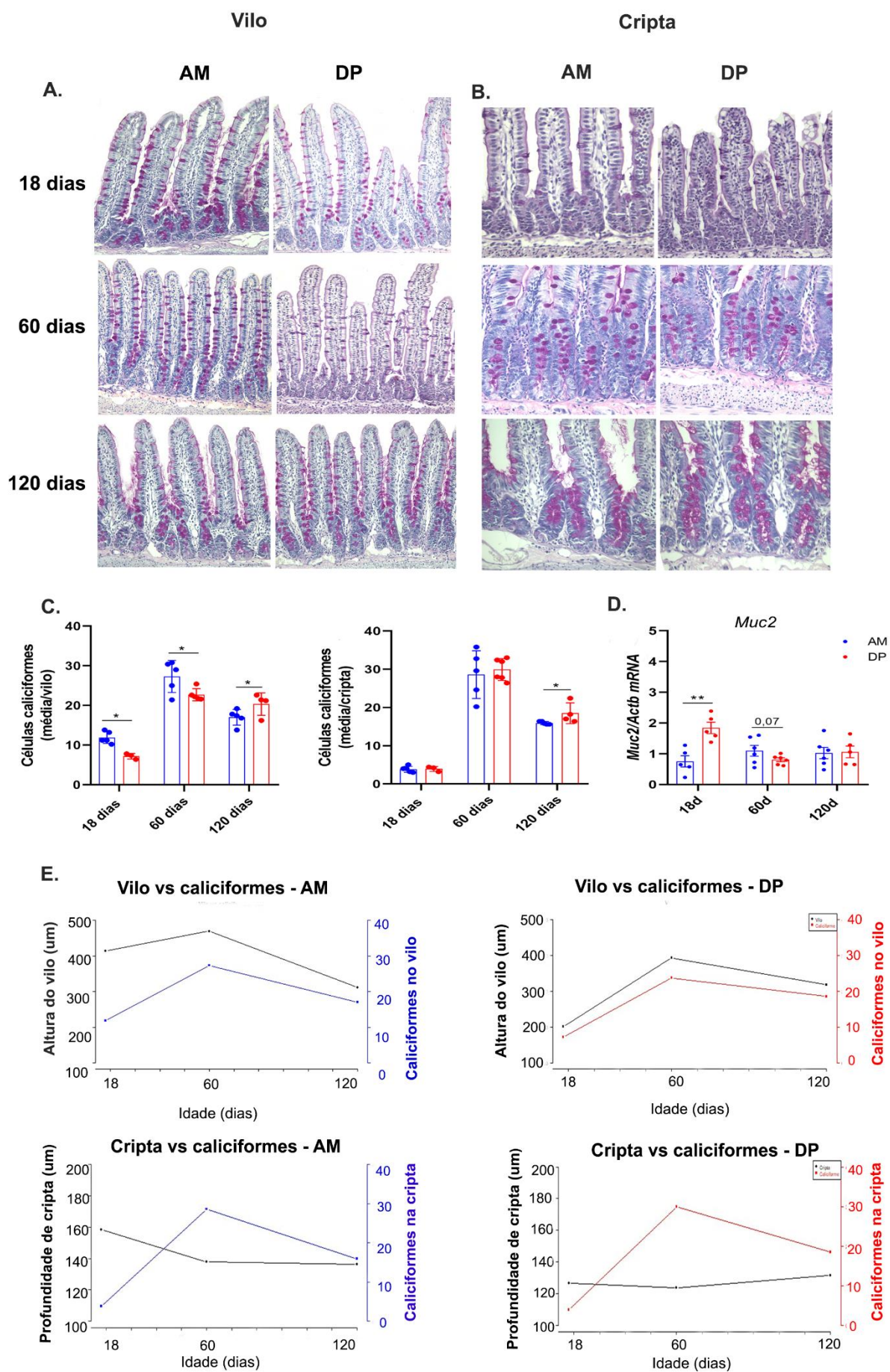


Figura 11. Efeito do desmame precoce sobre a distribuição das células caliciformes no eixo cripta-vilo. A-B. Imagem representativa da mucosa do jejuno após reação histoquímica com PAS e contra-coloração com hematoxilina. Estão evidenciadas as células caliciformes ao longo do vilo (aumento original de 20x) e sua distribuição ao longo da cripta (aumento original 40x). **C-D.** 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. **E.** Análise comparativa da quantificação de caliciforme em relação no vilo e na cripta em animais AM e DP. Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey para análise dos grupos nos diferentes tempos. Comparação de vilo e cripta vs caliciformes entre as idades foram feitas por *RStudio* * $P < 0,05$.

5.7 Efeito do desmame precoce sobre marcadores metabólicos

Verificamos se o desmame precoce foi capaz de alterar a expressão de marcadores de célula enteroendócrina e possíveis alterações fisiológicas vistas a partir do teste de tolerância a glicose.

Observamos na figura 12A uma menor expressão do gene cromagranina A (*Chga*) em todas as idades, sendo de forma significativa aos 18 e 120 dias ($P < 0,05$). Já as células que expressam *Glp1* não apresentaram alterações relevantes. O teste intraperitoneal de tolerância a glicose (figura 12B, C, D) apresentou uma redução da resposta a glicose vista aos 18 dias e um significativo aumento aos 60 dias nos animais DP comparado com o grupo AM ($P < 0,05$).

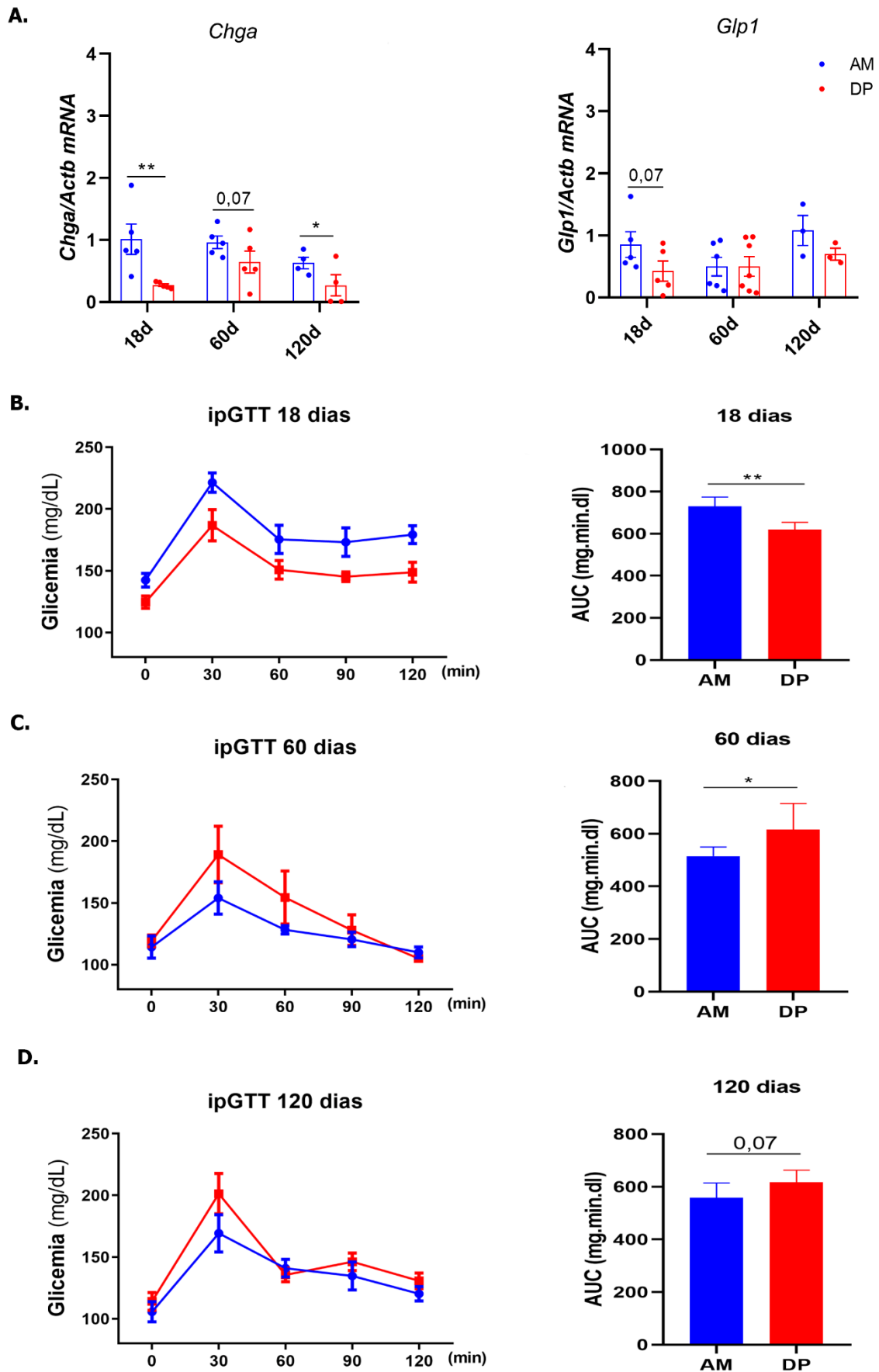


Figura 12. A. Efeito do desmame precoce sobre marcadores metabólicos. Expressão gênica após análise realizada por RT-qPCR para *Chga* e *Glp1*. O gene β -actina foi usado como controle interno. **B, C, D.** Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT) e respectivas áreas sobre curva (AUC). Todas as amostras foram realizadas em duplicatas e os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para área sobre a curva e PCR por ANOVA seguida de teste de Tukey. * $P < 0,05$.

5.8 Análise do efeito do desmame precoce sobre o comportamento da expressão gênica ao longo do tempo

Na figura 13A, utilizamos o método estatístico de componentes principais (PCA) para correlacionar os resultados de expressão de genes e idade. Não encontramos significativa expressão de distinção de *clusters* analisados entre os componentes principais Dim1 e Dim2. Na figura 13B, realizamos uma análise exploratória, e observamos o perfil dos marcadores moleculares de acordo com o crescimento e mudança de dieta. A partir dos genes do painel estudados, destacamos o gene *Ascl2* que teve um aumento de expressão no DP alcançando as pontuações mais altas.

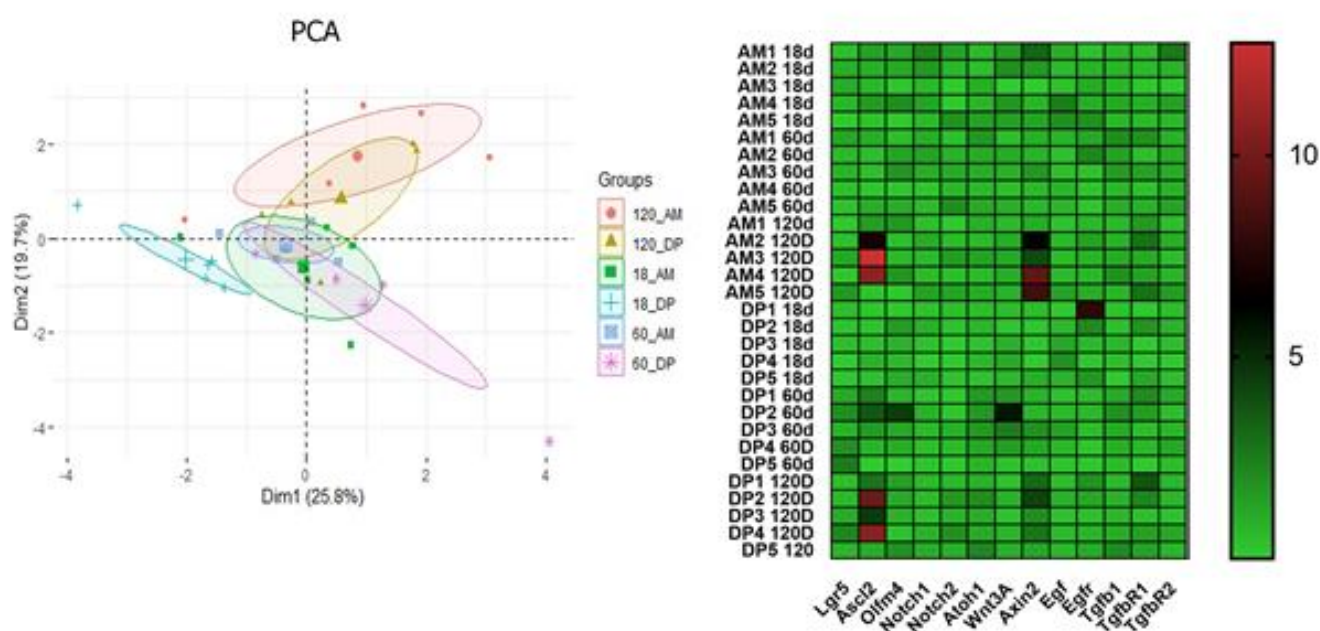


Figura 13. **A.** Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando os dois grupos AM e DP nas diferentes idades (18, 60 e 120 dias). **B.** Análise de *heatmap* de genes agrupados por idade e por grupos (AM e DP).

5.9 Análise do perfil de metilação de DNA e expressão enzimática

A partir do sequenciamento do fragmento do DNA para identificação de regiões metiladas do gene *Notch2* nos animais de 60 dias, observamos que as citocinas metiladas encontram-se distribuídas aleatoriamente não mantendo um padrão de metilação nas mesmas ilhas CpG analisadas (Figura 14A).

A partir dos resultados obtidos na avaliação da expressão gênica, analisamos os níveis de expressão das enzimas DNA metiltransferases (*Dnmt*), responsáveis pela adição do grupamento metila na base citosina do DNA. A expressão de *Dnmt1* não foi alterada aos 18 dias, mas apresentou significativa redução nos animais adultos aos 60 e 120 dias em DP ($P < 0,05$) (Figura 14B). Já a *Dnmt3a* reduziu somente aos 18 dias no grupo DP comparado ao controle AM, e os níveis de *Dnmt3b* apresentaram redução significativa aos 18 e 120 dias ($P < 0,05$), sem variação aos 60 dias (Figura 14B).

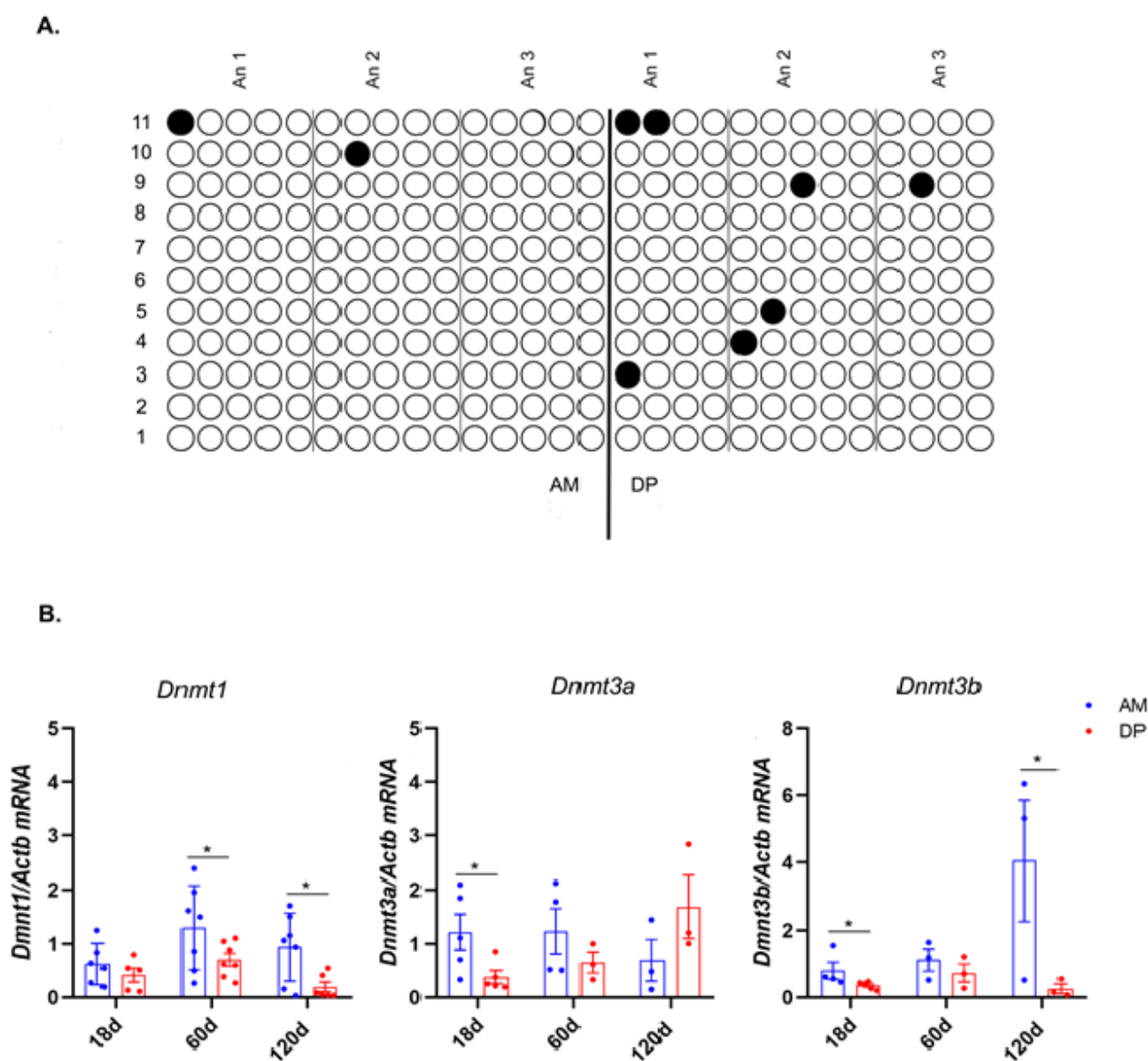


Figura 14. Perfil de metilação no promotor Notch1 e expressão de DNMTs. **A.** Sequenciamento por método de bissulfito. Cada coluna indica um clone obtido de um mesmo animal (animais de 1 a 3 em AM e DP). A região analisada possui 11 ilhas CpG (1 a 11). Cada ponto representa uma única ilha CpG, sendo pontos pretos para metiladas e brancos para não-metiladas. **B.** Expressão de Dnmts 1, 3A e 3b. Análise realizada por RT-qPCR. Comparação relativa entre grupos AM – amamentado e DP – desmame precoce. Análise comparativa por ANOVA seguida de teste de Tukey. * $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O processo de maturação do epitélio intestinal assim como crescimento do vilosidade e profundidade de cripta são modulados por hormônios, fatores de crescimento presentes na circulação sistêmica, citocinas, no líquido amniótico deglutido e leite materno. Além desses elementos que são exógenos ao epitélio, existe uma programação gênica intrínseca do tecido que regula temporalmente todo o processo morfogenético e fisiológico.

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 marcadores de proliferação e diferenciação celular e sua correlação com o metabolismo, além de possíveis mudanças estruturais do epitélio intestinal.

Em relação ao crescimento do epitélio intestinal, podemos observar que a significativa atrofia do vilosidade a partir do terceiro dia após o desmame precoce se manteve até a vida adulta. De forma contrária, em estudo com porcos desmamados aos 21 dias, no qual foi medido o tempo de recuperação da altura do vilosidade após o desmame, demonstrou-se que a altura encurtada das vilosidades teve um período de duração de 8 a 12 dias após o desmame, com redução do número de enterócitos maduros (DUNSFORD; KNABE; HAENSLY, 1989) e diminuição da atividade das enzimas da borda em escova. Em outro estudo com camundongos desmamados aos 16 dias, foi retirado todo o intestino delgado e dividido em segmentos. Os autores demonstraram que o encurtamento do vilosidade em animais DP ocorreu na porção mais proximal e distal do intestino (TSUKAHARA, 2010), enquanto em nosso estudo avaliamos a região mediana do jejuno, onde encontramos a alteração. Poucos estudos demonstraram de forma clara na literatura o efeito do desmame precoce sobre a morfologia intestinal nas idades que estudamos. Outras evidências, relacionam a resposta de estresse causada pelo DP, induzindo o encurtamento do vilosidade de forma imediata e posteriormente, uma recuperação do tamanho correlacionado com o crescimento do animal, que seria uma adaptação necessária para o processo de digestão e absorção (LEE; LEBENTHAL, 1983).

Sabe-se que em termos de crescimento em comprimento e regeneração, o intestino delgado depende do aumento do número de criptas, que aumenta por fissão, e acaba por constituir um número

maior de vilos. Porém, estudos demonstram que o número de fissões diminui à medida que os animais envelhecem, sem alterações na proliferação celular (CLAIRT; OSBORNE, 1985). Esse fato explicaria a mudança estrutural vista em nosso estudo pela diminuição da altura da vilosidade observada aos 120 dias nos dois grupos em relação aos animais de 60 dias.

Outro aspecto importante para a dinâmica de crescimento da mucosa intestinal refere-se ao tamanho da cripta. Uma maior profundidade de cripta pode indicar a atividade proliferativa aumentada (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), mas também pode estar associada à cinética de alteração do eixo cripta-vilo, como um todo. A única diferença significativa observada foi em relação ao aumento da profundidade de cripta ao longo da idade que poderia ser associado ao crescimento e desenvolvimento do animal. Estudos anteriores, realizados em nosso laboratório em estômago de ratos, demonstraram que o desmame precoce aumenta a proliferação e antecipa a maturação da mucosa gástrica com o aumento da diferenciação de células mucosa do colo e células zimogênicas nos filhotes (GHIZONI et al., 2014; OSAKI; CURI; ALVARES, 2010). No intestino, o mesmo foi observado por Lin et al. (1998) que demonstraram o aumento da proliferação (células marcadas com BrDU) em animais até os 21 dias de vida pós-natal (LIN et al., 1998). Diante disso, optamos por verificar se o desmame precoce influencia o índice proliferativo dos animais, e de forma contrária aos achados anteriores, nossos resultados mostraram que o DP diminuiu a proliferação em filhotes e sobretudo, essa resposta foi sustentada até a vida adulta (60 dias). Já aos 120 dias, não encontramos diferença entre grupos, porém de forma interessante, os animais DP apresentaram um significativo aumento de proliferação comparado ao seu mesmo grupo aos 60 dias (os mecanismos que induziram este aumento não foram compreendidos).

Para entendermos melhor a cinética de proliferação na cripta bem como a regulação e integridade estrutural de crescimento do epitélio, analisamos marcadores gênicos reguladores do ciclo celular e identificamos uma maior variação da expressão de *Cdkn1b* (p27). Com a função bem estabelecida como inibidores de CDKs para controle e progressão do ciclo em G1, níveis aumentados de p27 podem indicar a provável influência desta proteína nesse processo, sugerindo que o desmame precoce possa promover a redução de atividade no ciclo celular e consequente inibição da proliferação no jejuno independente de uma tendência de aumento da *Ccne1* (ciclina E) que não se sustentou ao longo da vida adulta. Achados semelhantes foram encontrados no estudo feito em porcos desmamados aos 14 dias analisando somente o compartimento proliferativo da cripta. Os autores também salientam a possível influência no metabolismo energético dessas células epiteliais (YANG et al., 2016). Ao avaliarmos a família TGF β , verificamos que apesar de níveis gênicos de *Tgfb1* reduzidos no filhote DP, a expressão dos receptores estudados não foi modificada.

Além disso, o desmame precoce pode levar a uma alteração na expressão de outros fatores de crescimento que comprometem também o desenvolvimento do vilão (CUMMINS; THOMPSON, 2002). A literatura é bem caracterizada quanto à presença de altas concentrações de EGF em glândulas salivares, no leite materno de diferentes espécies, assim como no lúmen, epitélio e lâmina própria. Sabe-se que o EGF está envolvido na regulação pós-natal do desenvolvimento do trato gastrointestinal, e no intestino delgado, age na maturação funcional dos enterócitos e enzimas da borda em escova (BERSETH, 1987; CHARLOTTE et al, 1993; LEE et al., 2008). A ação do EGF é mediada pelo seu receptor EGFR localizado na região apical e basolateral dos enterócitos. O EGFR pode ter diferentes ligantes, e quando ativo fosforila as subunidades de tirosina kinase, que agem sobre substratos celulares em vias de sinalização, levando a um aumento da proliferação e diferenciação para reparo e desenvolvimento da mucosa. Apesar de não observarmos alterações nos níveis de EGF, a significativa redução da expressão de *EGFR* nos animais de 60 dias adultos poderia estar ligada à resposta proliferativa e crescimento do vilão, já discutidos anteriormente, visto que estudos demonstraram que a suplementação de EGF nas dietas de leitões desmamados facilita o desenvolvimento intestinal ao estimular a proliferação de enterócitos (KANG, 2010). Entretanto a dificuldade de avaliação dos níveis proteicos para melhor análise de função do sistema EGF-EGFR é uma limitação do nosso estudo.

Os processos proliferativos da cripta intestinal são dependentes de uma cascata de sinalização em resposta aos estímulos dados ao nicho de célula-tronco. Notamos que o desmame precoce desencadeou uma redução da expressão do gene *Lgr5* de forma imediata no filhote e um aumento na vida adulta, caracterizando respostas inversas nas duas fases como uma possível reação compensatória. O mesmo ocorreu com o gene *Ascl2*, sendo que aos 120 dias, este gene se mostrou novamente reduzido. Ambos alvos da via Wnt, e a expressão de *Ascl2*, descrita em animais geneticamente modificados, é essencial para a manutenção do nicho de células-tronco *Lgr5+* no epitélio intestinal adulto, sendo sua perda associada à hiperplasia de cripta e projeções tipo bolsas nas vilosidades (FLIER et al., 2009). Em um estudo inicial, o grupo de Hans Clevers (Universidade de Utrecht) demonstrou que a atividade de Wnt é encontrada nas regiões entre vilos, estimulando a proliferação, e a inibição da via induzida pela deleção do Tcf4 (molécula sinalizadora que forma um complexo nuclear com a β -catenina) leva à perda de células-tronco e redução da atividade proliferativa, com maior diferenciação de enterócitos (KORINEK et al., 1998). Comparativamente, em nossos achados em ratos de 18 e 60 dias, a redução e o aumento de expressão respectivamente às idades, acompanharam as respostas dos marcadores de célula-tronco (*Lgr5* e *Ascl2*), demonstrando que o DP comprometeu o perfil de expressão gênica responsável pelo desenvolvimento do vilão. Estudos demonstram que células-tronco intestinais respondem de forma diferente aos mesmos sinais de Wnt (DAVID, 2008), ou seja, outros caminhos

podem coordenar com a sinalização Wnt e distinguir diferentes respostas, o que poderia justificar a queda na expressão do marcador *Ascl2* aos 120 dias em nosso estudo.

No estudo de Fevr et al. (2007), usando modelos de camundongos modificados, demonstrou-se que a perda de β -catenina dentro do epitélio intestinal resultou em ausência de proliferação de células em 2 dias, perda de cripta em 4 dias e morte por falência intestinal em 6 dias. Eles também demonstraram que dentro das mesmas condições, células-tronco adultas quiescentes marcadas com timidinaH³ por um longo prazo podem gerar enterócitos dentro de alguns dias. Porém, curiosamente neste mesmo estudo, os autores encontraram a sinalização Wnt ativa ao avaliarem os níveis de axina 2, que estavam aumentados em células Paneth, e no nicho de células-tronco, e de forma menos proeminente na região das células progenitoras amplificadoras (FEVR, 2007). Esses resultados sugerem que a via Wnt mantém o estado indiferenciado das células-tronco intestinais, além de estimular a auto renovação e proliferação de células progenitoras. Em nosso estudo, apesar das modificações gênicas observadas em *Wnt3A*, o gene *Axin2* apresentou somente uma tendência à diminuição de expressão nos filhotes.

Níveis de BMP aumentados nos filhotes e reduzidos em adultos de 60 dias, como os que encontramos, confirmam sua ação de forma antagonista à via Wnt. Dentro desse mesmo contexto, a via de sinalização Notch em células-tronco da base da cripta também é necessária para o processo de proliferação e sobrevivência das células nesta região. Entretanto, conforme colocado anteriormente, Notch e seu antagonista *Atoh1* em conjunto com a via canônica de Wnt atuam na regulação de células progenitoras e são responsáveis pela diferenciação e destino das populações celulares (ES et al., 2005). A regulação dos genes *Notch1* e *Notch2* em animais DP, em nosso estudo, teve um comportamento semelhante ao longo do tempo, sendo que nos filhotes somente *Notch1* apresentou redução, e nos adultos houve uma diminuição em *Notch1* e *Notch2* e consequente aumento do gene *Atoh1* na mesma idade, permanecendo assim aos 120 dias. Ao contrário do esperado, animais DP aos 18 dias apresentaram redução do gene *Atoh1*, porém de acordo com a literatura, a regulação do nicho de células-tronco da base é independente de *Atoh1*, enquanto a regulação de *Notch* no destino da célula epitelial é *Atoh1*-dependente, sugerindo que *Notch* tem alvos distintos para regulação de células-tronco e progenitoras. (VANDUSSEN et al., 2012). A redução da expressão proteica de Hes1 na vida adulta (60 dias) é proporcional à redução dos níveis gênicos de *Notch*, e consequente aumento de *Atoh1*. Um estudo com camundongos nocautes para Hes1, Hes3 e Hes5 verificou a redução do número de células proliferativas e a mudança de posição com ligeira expansão e migração de células progenitoras para base da cripta. A migração anormal e expansão de cripta com má localização de células-tronco e progenitoras pode levar a uma diferenciação celular prejudicada (Ueo, 2012).

O período de desmame, também promove mudanças na atividade de algumas enzimas intestinais como a ornitina descarboxilase que está envolvida na renovação e crescimento da mucosa, e como funcionalmente também se conhece alterações nos níveis de enzimas ligadas à digestão. Ao analisarmos a expressão gênica da *Si* (sacarase/isomaltase) e *Lct* (lactase), verificamos que o DP desencadeou efeitos antagônicos sobre essas enzimas em concordância com a literatura. O estudo de Lin et al (1998) analisaram a expressão da *Si*, encontraram atividade aumentada após o DP assim como nossos achados nos níveis gênicos da *Si* aos 18 dias com redução da *Lct* na mesma idade.

Estudos realizados em linhagens de células epiteliais e animais nocaute demonstraram que a vilina tem a função de regular a dinâmica da actina no córtex celular, que afeta a morfologia, migração e sobrevivência da célula (HALL et al., 1994; KUMAR et al., 2004; WANG et al., 2007). Apesar de não observarmos alteração na expressão gênica de *vilin*, avaliamos também se o processo de alteração enzimática poderia estar correlacionado com a diferenciação celular de enterócitos, já que o tamanho do vilão no animal DP adulto também sofreu alteração. Sugerimos que a atrofia das vilosidades juntamente com a redução da proliferação, alterou o número de células absortivas no DP de forma imediata aos 18 dias e apesar de não haver diferença significativa entre grupos nos animais adultos, a redução aos 120 dias em comparação aos adultos jovens de 60 dias poderia ser explicada pela diminuição do processo de fissão de criptas ao longo do envelhecimento, conforme estudos anteriores (CLAIRT; OSBORNE, 1985).

Sabemos que a camada de muco formada por células caliciformes garante um papel importante no processo de defesa, formando uma barreira protetora que impede o contato dos microrganismos com o epitélio. A maioria das células caliciformes produz mucinas neutras e em regiões de maior concentração bacteriana, células com produção de mucina ácida estão aumentadas (GASKINS, 2001). O estudo com porcos desmamados aos 14 dias apresentou redução das células caliciformes e um impacto negativo na imunidade inata do animal (CRISPEL, 2019). Da mesma forma, verificamos que o número de células caliciformes, reativas para o PAS, foi reduzido nas vilosidades aos 18 e 60 dias. O aumento de *Muc2* nos filhotes poderia ocorrer por estímulo da capacidade protetora após a transição abrupta de dieta com a retirada do leite materno. A redução das células caliciformes PAS-positivas juntamente com a diminuição do crescimento do vilão pode afetar também a eficiência da capacidade absortiva ao longo do desenvolvimento, visto que a camada de muco intestinal é responsável pela absorção do ferro bio-disponível (CONRAD, 1993). Se associarmos às análises em humanos, podemos justificar o fato de bebês desmamados precocemente (antes do período recomendado) terem maior incidência de anemia ferropriva. Em contrapartida, ao longo do envelhecimento, o aumento observado no vilão e na cripta de

120 dias pode ser gerado pelo aumento da diferenciação celular como efeito compensatório para garantir a proteção da mucosa. Conforme descrito em um estudo, a inativação simultânea de ligantes de Notch (Dll1 e Dll4) resulta na conversão de células progenitoras proliferativas em células caliciformes pós-mitótica concomitante com a perda de células-tronco $Lgr5^+$, $Olfm4^+$ e $Ascl2^+$ (FARIN, 2016). Este pode ser outro fator na redução de *Ascl2* aos 120 dias visto em nosso estudo.

Em continuidade com às análises de células diferenciadas, células de Paneth têm sua função bem caracterizada sobre o nicho de células-tronco, manutenção da microbiota intestinal e como barreira física altamente organizada com interface imunológica. Mecanismos moleculares que levam a alterações em células Paneth secretórias foram relacionados a doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn e a enterocolite necrosante (WEHKAMP, 2010). Fica evidente, de acordo com a literatura, que a mudança de destino da célula Paneth para um estado de desdiferenciação e um caráter de célula-tronco é dependente da ativação constitutiva da via Notch (YU, 2018) no epitélio intestinal e de seu alvo (*Hes1*), que em nosso estudo se mostraram reduzidos. Sugerimos então, que após o desmame precoce, o número de células Paneth aumentado aos 18 e 60 dias e a concomitante elevação de *Defa24* (defensina) podem indicar um comportamento mais protetor do epitélio com a mudança da dieta, mesmo sem haver uma injúria caracterizada morfológicamente.

Para melhor compreensão e entendimento do comportamento das linhagens diferenciadas no intestino após o desmame precoce, avaliamos também marcadores de células enteroendócrinas e suas possíveis consequenciais metabólicas. A capacidade de produção de diferentes hormônios ao longo da vida, confere ao intestino sua característica de plasticidade hormonal. Os hormônios pós prandiais ou hormônios liberados durante o jejum tem influência direta sobre a homeostase da glicose. Entretanto, hormônios intestinais agem não só indiretamente através do pâncreas sobre os níveis de glicose no sangue, mas também controlando o fluxo de nutrientes através do intestino e adaptação metabólica pela modulação do apetite.

Baixos níveis gênicos de cromagranina A (*Chga*) foram encontrados após o DP em todas as idades avaliadas, sugerindo um significativo comprometimento desta molécula. A redução da proliferação celular demonstrada pode ser um dos fatores que influenciou esse processo, já que a perda do receptor Notch leva a uma redução da expressão de neurogenina 3 (*Ngr3*), com uma diminuição relevante de células enteroendócrina (MELLITZER, 2010).

Já a expressão de *Glp1*, que age em células beta no pâncreas e potencializa sua liberação de insulina em resposta à glicose, não apresentou grandes variações a partir do desmame precoce.

Entretanto, para avaliar o impacto desses marcadores no sangue, analisamos as concentrações de glicose a partir do teste de tolerância a glicose, e vimos que nos animais 18 dias DP a curva glicêmica apresentou níveis significativamente mais baixos que nos animais AM, enquanto nos animais adultos notamos o aumento significativo dos níveis aos 60 dias. Com a mudança do padrão alimentar e a introdução de ração com maior concentração de carboidrato, a liberação de insulina pode ter sido aumentada para compensar a carga glicêmica aos 18 dias, porém esse possível aumento insulinêmico (não avaliado) não foi adequado para manter o controle glicêmico nos adultos de 60 dias, que apresentaram uma intolerância à glicose de caráter transitório (aos 120 dias essa resposta foi atenuada mostrando somente uma tendência aumentada).

Os resultados obtidos para expressão gênica comparando os efeitos do DP foram adicionados ao *heatmap* e as análises de componentes principais foram adicionadas a fim de avaliar o perfil dos marcadores moleculares intestinais de acordo com o desenvolvimento e mudança na dieta. Observamos no painel que o gene *Ascl2* apresentou um aumento com o envelhecimento no DP conforme pontuações mais altas registradas aos 120 dias. Já pela análise de PCA, no qual correlacionamos os dados com os mesmos marcadores gênicos vistos no *heatmap*, não encontramos diferenças significantes, porém o DP desencadeou uma pequena variação no grupo 60 dias identificado por um *cluster* mais à direita ao longo de Dim1.

O constante equilíbrio entre destino absortivo e secretório induzido pela sinalização Notch nos levou a investigar se as modificações gênicas observadas nesta via poderiam estar relacionadas a alterações epigenéticas, já que o período de amamentação é fundamental para o desenvolvimento do intestino. Observamos que não houve modificações significativas derivadas de metilação do DNA, porém o número amostral pode ser um fator de interferência no resultado obtido. O estudo em amostras derivadas de animais é complexo e a dificuldade alia-se ao fato da mucosa ter sido utilizada como um todo, sem separação da área das criptas para esta análise. Sabemos também que as principais metiltransferases de DNA são reguladores críticos de alterações epigenéticas pós-natais em células-tronco intestinais com implicações para saúde. Diante de nossos achados gênicos de alteração dos principais marcadores de células-tronco, buscamos entender também se os genes responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da metilação estariam alterados no desmame precoce. A enzima Dnmt1, considerada uma metiltransferase de manutenção para estabelecer padrões de metilação em células filha durante a mitose, encontrou-se reduzida nos adultos (60 dias) e esses níveis foram mantidos até os 120 dias. Em contrapartida, as Dnmt3a e Dnmt3b, conhecidas como metiltransferases *de novo* para estabelecer padrões de metilação durante o desenvolvimento, apresentaram redução aos 18 dias em DP,

e os baixos níveis da Dnmt3b foram encontrados somente aos 120 dias. No estudo que avaliou mudanças epigenéticas em dois períodos da vida (nascimento e desmame) associadas à maturação e à diferenciação de células-tronco intestinais, foi demonstrado que a deleção de Dnmt1 resultou em alterações morfológicas após 7 dias. Esse quadro foi caracterizado pela atrofia das vilosidades e redução de células proliferativas positivas para Ki67 no intestino delgado, e de células caliciformes na região do cólon. Nesse mesmo estudo, a deleção condicional da Dnmt3a resultou em pequenas mudanças em fatores transcricionais de genes associados ao desenvolvimento intestinal, indicando que outros genes de Dnmt *de novo* podem compensar essa deleção (YU, 2015). Curiosamente em outro estudo, modificações epigenéticas também foram vistas em histonas (H3K4me2 e H3K27ac) em células-tronco intestinais de adultos e suas progenitoras (KIM, 2014). Diante disso, podemos sugerir que as possíveis variações encontradas em nosso estudo, nos animais DP durante o processo de proliferação e diferenciação celular, podem ser associadas aos padrões de modificações das enzimas de metilação e essa regulação epigenética pós-natal prossegue além da infância.

7. CONCLUSÃO

Ao finalizarmos nosso projeto, foi possível demonstrar que o desmame precoce induzido em ratos foi capaz de promover alterações morfológicas e moleculares com impactos metabólicos tais como:

- ✓ Atrofia das vilosidades até a vida adulta;
- ✓ Redução da proliferação em filhotes e adultos de 60 dias;
- ✓ Modificação do perfil gênico das principais vias de sinalização envolvidas no processo proliferativo e de diferenciação celular;
- ✓ Alteração de níveis gênicos de marcadores do nicho de células-tronco;
- ✓ Aumento da expressão gênica da p27;
- ✓ Redução do número de células absorptivas (enterócitos) e secretora (caliciforme) com aumento de células Paneth como possível ação compensatória da capacidade protetora do epitélio;
- ✓ Redução da expressão do marcador de célula enteroendócrina;
- ✓ Alteração transitória do metabolismo de glicose;

- ✓ Redução da expressão da Dnmt1 em animais adultos de 60 e 120 dias;
- ✓ Redução da expressão da Dnmt3a e Dnmt3b nos filhotes e aumento da Dnmt3b em adultos de 120 dias.

Sugerimos 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.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERS, M. et al. The human Achaete-Scute homologue 2 to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 6, p. 859–867, 1997.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. **Science**, v. 284, n. May 1999, 1999.
- BARKER, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v. 449, n. March 2007, 2007.
- BASAK, O., VAN DE BORN, M., KORVING, J., BEUMER, J., VAN DER ELST, S., VAN ES, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**. 469, 415–418. 2011.
- BASAK, O. et al. Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. **Cell Stem Cell** 20, 177–190.e4. 2017.
- BEUMER J, GEHART H, CLEVERS H. Enteroendocrine dynamics – New tools reveal hormonal plasticity in the gut. **Endocr Rev**. 1;41(5):695-706. doi: 10.1210/endrev/bnaa018. 2020.
- BEUMER, J. et al. Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signaling gradient. **Nat Cell Biol**. 20, 2018.
- BEERS, E. H. V. A. N. et al. Lactase and sucraseisomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. **Biochem. J.**, v. 775, p. 769–775, 1995.
- BERSETH, C. L. Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. **American journal of physiology.**, 1987.

- BJERKNES, M.; CHENG, H. The Stem-Cell Zone of the Small Intestinal Epithelium . 1 . Evidence From Paneth Cells in the Adult Mouse. **The american journal of anatomy**, v. 63, p. 51–63, 1981.
- BUCZACKI SJA, ZECCHINI HI, NICHOLSON AM, RUSSELL R, VERMEULEN L, KEMP R, WINTON DJ. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. **Nature**. 495:65–9. 2013
- CASTILLO-AZOFEIFA, D. et al. capacity independent of Lgr 5 + cells during colonic regeneration. **The EMBO Journal**, p. 1–16, 2019.
- CHARLOTTE FOLTZER-JOURDAINNE, J.-C. G.; EDOUARD NSI-EMVO, A. F. R. Epidermal growth factor and the maturation of intestinal sucrase in suckling rats. **American journal of physiology.**, 1993.
- CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin , Differentiation and Renewal o f the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine. **Am. J. Anat**, 1974.
- CLAIRT, W. H. S.; OSBORNE, J. W. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats *. **Cell Tissue Kinet**, p. 255–262, 1985.
- CLEVERS H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. **Cell**.154:274–84. 2013.
- CONRAD ME, UMBREIT IN A concise review: iron absorption - the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. **Am Hemato** 142: 67-73. 1993.
- CRISPEL Y. et al. The Effect of Weaning Age on the Small Intestine Mucosa of Rats. **Appl Physiol Nutr Metab**. 44(9):985-989. 2019.
- CUMMINS, A. G.; THOMPSON, F. M. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. **Gut**, p. 748–754, 2002.
- DAVID H. SCOVILLE, TOSHIRO SATO, XI C. HE, and LINHENG LI. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**. 134:849 – 864. 2008.
- 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.

ELLIOTT E.N, SHEAFFER K.L, KAESTNER K.H. The ‘de novo’ DNA methyltransferase Dnmt3b compensates the Dnmt1- deficient intestinal epithelium. **eLife**;5:e12975. DOI: 10.7554/eLife.12975. 2016.

ES, J. H. VAN et al. Notch / g -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature**, v. 435, n. June, p. 959–963, 2005.

FARIN HF, JORDENS I, MOSA MH, BASAK O, KORVING J, et al. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. **Nature**. 530(7590):340–3. 2016.

FEVR T, ROBINE S. et al. Wnt/Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. **Molecular and cellular biology**, Nov. p. 7551–7559. 2007

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.

FRAZER D. M, SARAH J. et al. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 293: G525–G531, 2007.

FRE, S. et al. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. **Nature**, v. 435, n. June, 2005.

GARCÍA G.R et al. Effect of breastfeeding time on physiological, immunological and microbial parameters of weaned piglets in an intensive breeding farm. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 176. 44–49. 2016.

GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense : goblet cells and the. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. April 2000, 2001.

GEORGE, S. K. AND S. P. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin’s perspective. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 2128–2139, 2008.

HALL, P. A. et al. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract : the importance of apoptosis. **Journal of Cell Science**, v. 3577, p. 3569–3577, 1994.

- HE, X. C. et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt – b-catenin signaling. **Nature genetic**, v. 36, n. 10, p. 1117–1121, 2004.
- HEATH, J. P. Epithelial cell migration in the intestine. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 139–146, 1996.
- HENNING, S. J. Ontogeny of enzymes in. **Ann. Rev. Physiol**, n. 38, p. 231–245, 1985.
- HERNANDO, C. L.; MEGAN, L.; VASUNDHARA, S. S. Original Paper : Gastric Disorders Induction of Gastric Ornithine Decarboxylase in Early Weaning Rats. **Digestion**, v. 48201, p. 214–219, 2001.
- 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, n. May, p. 524–528, 2002.
- IKO FUKUSHIMA, TOSHINAO GODA, Y. M. AND K. S. The Specific Expression Patterns of Lactase, Sucrase and Calbindin D9k in Weaning Rats Are Regulated at the Transcriptional Level. **Nutr Sci Vitamirrol**, v. 50, n. 7, p. 265–271, 2004.
- JIRTLER R.L, SKINNER M.K. Environmental Epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genetic**, v.4. p 253-262. 2007
- KANG P, TOMS DY, CHEUNG Q, GONG J, DE LK AND LI J. Epidermal growthfactor-expressingLactococcus lactisenhances intestinal development of early-weaned pigs. **Journal of Nutrition**. 140, 806–811. 2010.
- KELLERMAYER R, BALASA A, ZHANG W, LEE S, MIRZA S, CHAKRAVARTY A, et al. Epigenetic maturation in colonic mucosa continues beyond infancy in mice. **Hum Mol Genet**. 19:2168.2010.
- KEYSER, N. D. E.; KOLANOWSKI, J.; HOOF, F. V. A. N. Hormonal Regulation of the Rat Small Intestine : Responsiveness of Villus and Crypt Cells to Insulin during the Suckling Period and. **Pediatric Research**, v. 27, n. 2, 1990.
- KIM, T.; ESCUDERO, S.; SHIVDASANI, R. A. Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. **PNAS**, v. 109, n. 10, p. 1–6, 2012.

- KIM T.H, LI F, FERREIRO-NEIRA I, HO L.L, LUYTEN A. et al. Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. **Nature**. 506:511–5. 2014.
- KOBAYASHI, D. et al. proliferation of pancreatic cancer cells. **Cancer Sci**, v. 98, n. 3, 2007.
- KONG, S. et al. The Role of Enterocytes in Gut Dysfunction. **Pathology, research and practice**, v. 194, n. 11, p. 741–751, 1998.
- KORINEK, V. et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nature**, v. 19, n. august, p. 379–383, 1998.
- KUMAR, N. et al. Association of Villin with Phosphatidylinositol 4 , 5-Bisphosphate Regulates the Actin Cytoskeleton *. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 4, p. 3096–3110, 2004.
- LANGLANDS AJ, ALMET AA, et al. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. **PLoS Biol** 14(6): e1002491. 2016.
- LEE, D. N. et al. Effects of Diets Supplemented with Recombinant Epidermal Growth Factor and Glutamine on Gastrointestinal Tract Development of Early-weaned Piglets *. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 21, n. 4, p. 582–589, 2008.
- 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.
- 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.
- LINDEMANS, C. A. et al. Interleukin-22 Promotes Intestinal Stem Cell-Mediated Epithelial Regeneration. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 560–564, 2015.
- LIU, W. et al. The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. **Experimental cell research**, v. 2, 2006.
- LUESCHOW SR AND MCELROY SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine Shiloh. **Front. Immunol.** <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>. 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.

MELLITZER G., BEUCHER A et al. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. **The Journal of Clinical Investigation**. Volume 120, número 5. 2010.

METCALFE C, KLJAVIN NM, YBARRA R, DE SAUVAGE FJ. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell*; 14(2):149–59. PMID: 24332836. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.008. 2014.

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

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

MS, HELOISA GHIZONI, P. et al. Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. **Nutrition**, v. 30, p. 343–349, 2014.

NOAH, T. K.; SHROYER, N. F. Notch in the Intestine : Regulation of Homeostasis and Pathogenesis. **Annu. Rev. Physiol**, 2013.

OGIAS, D. et al. Opposite effects of fasting on TGF- b 3 and T b RI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. **Nutrition**, v. 26, p. 224–229, 2010.

OSAKI, L. H. et al. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. **Cell Proliferation**, n. 5, p. 174–182, 2011.

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 a / EGFR. **Differentiation**, v. 79, p. 48–56, 2010.

OSAKI, L. H.; GAMA, P. MAPK Signaling Pathway Regulates p27 Phosphorylation at Threonin 187 as Part of the Mechanism Triggered by Early-Weaning to Induce Cell Proliferation in Rat Gastric Mucosa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

- PIN C, PARKER A, GUNNING AP, OHTA Y, JOHNSON IT, CARDING SR, et al. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. **Integr Biol (Camb)**.; 7(2):213–2. 2015.
- PELLEGRINET, L. et al. Dll1- and Dll4-mediated Notch signaling is required for homeostasis of intestinal stem cells. **Gastroenterology**, v. 140, n. 4, p. 1230–1240, 2012.
- 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.
- RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-Renewal and Cancer of the Gut : Two Sides of a Coin. **Science**, v. 307, 2005.
- 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.
- RICCIO, O. et al. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. **scientific report**, v. 9, n. 4, 2008.
- SASAKI, N. et al. Reg4 + deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5 + stem cells in colon. **PNAS**, p. 5399–5407, 2016.
- SATO, T. AND CLAVERS, H. Growing Self-Organizing Mini-Guts. **Science**, v. 340, n. 2013, p. 1190–1194, 2013.
- SATO T, VAN ES JH, SNIPPERT HJ, STANGE DE, VRIES RG, VAN DEN BORN M, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**. 469:415–8. doi: 10.1038/nature09637. 2011.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nat Med**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SCHUIJERS, J. et al. Ascl2 Acts as an R-spondin / Wnt-Responsive Switch to Control Stemness in Intestinal Crypts Article Ascl2 Acts as an R-spondin / Wnt-Responsive Switch to Control Stemness in Intestinal Crypts. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 2, p. 158–170, 2015.

SHARMA, R. et al. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. **Gut**, p. 209–214, 1995.

SHARMA, R. A. M. Morphometric Analysis of Intestinal Mucins Under Different Dietary Conditions and Gut Flora in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 2, n. 12, p. 2532–2539, 1995.

SCHRODER N, GOSSLER A. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. **Gene Expr Patterns**; 2:247–250. 2002.

SHERIDAN L. HELMAN . GREGORY J. ANDERSON . DAVID M. FRAZER. Dietary iron absorption during early postnatal life. **Biometals** 32:385–393 (2019).

SHYER, A. E. et al. Bending gradients: How the intestinal stem cell gets its home. **Cell**, v. 161, n. 3, p. 569–580, 2016.

SILVA KM; RATTES, IC; PEREIRA, GMA; GAMA, P. Lifelong Adaptation of Gastric Cell Proliferation and Mucosa Structure to Early Weaning-Induced Effects. **Frontiers in Physiology** v. 12, p. 1-14, 2021.

SNIPPERT, H. J. et al. Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. **Cell**, v. 143, n. 1, p. 134–144, 2010.

ST CLAIR WH, OSBORNE JW. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats. **Cell and tissue kinetics.**; 18(3):255–62. 1985.

TEIXEIRA, L. K.; REED, S. I. Cyclin E Deregulation and Genomic Instability. **DNA Replication**, p. 527–547, 2017.

TELES S.M. et al. Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES**. v. 21, p. 196, 2020.

TSUKAHARA T. et al. A Mouse Model Study for the Villous Atrophy of the Early Weaning Piglets. **J. Vet. Med. Sci.** 72(2): 241–244, 2010.

TUNG J, MARKOWITZ AJ, SILBERG DG, TRABER PG. Developmental expression of SI is regulated in transgenic mice by an evolutionarily conserved promoter. **Am J Physiol** 273: G83-G92. 1997.

UEO T. et al. The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. **Development** 139, 1071-1082. doi:10.1242/dev.069070 (2012).

- UMAR, S. Intestinal Stem Cells. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 12, n. 5, p. 340–348, 2010.
- 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 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.
- VANDUSSEN, K. L. et al. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. **DEVELOPMENT AND STEM CELLS**, v. 497, p. 488–497, 2012.
- VAN ES JH, et al. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol.* 14(10):1099–104. 2012.
- WANG, Y. et al. Obligatory role for phospholipase C- α 1 in villin-induced epithelial cell migration. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 38163, p. 1775–1786, 2007.
- WEHKAMP J, STANGE EF. Paneth's disease. **J Crohns Colitis.**; 523-531 DOI: 10.1016/j.crohns.2010.05.010]. 2010.
- 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.
- 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.
- YANG, H. et al. Effects of weaning on intestinal crypt epithelial cells in piglets. **Nature**, n. November, p. 1–11, 2016.
- YANG Q, BERMINGHAM NA, FINEGOLD MJ, et al. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. **Science**; 294:2155–2158. 2001
- YANG S., YU M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. **Journal of Inflammation Research**:14 3171–3183. 2021.
- YEUNG, T. M.; KUO, C. J. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 15, p. 2513–2523, 2011.

YU D.H. et al. Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. **Genome Biology**. 16:211. 2015.

YU S, TONG K, ZHAO Y, et al. Paneth Cell Multipotency Induced by Notch activation following Injury. **Cell Stem Cell**, 23 46-59. 2018.

ZHANG, J. et al. Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family , hGC-1 , expressed during myeloid lineage development. **Gene**, v. 283, p. 83–93, 2002.

ZULIAN, J. G. et al. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **scientific report**, p. 1–13, 2017.