

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

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

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).

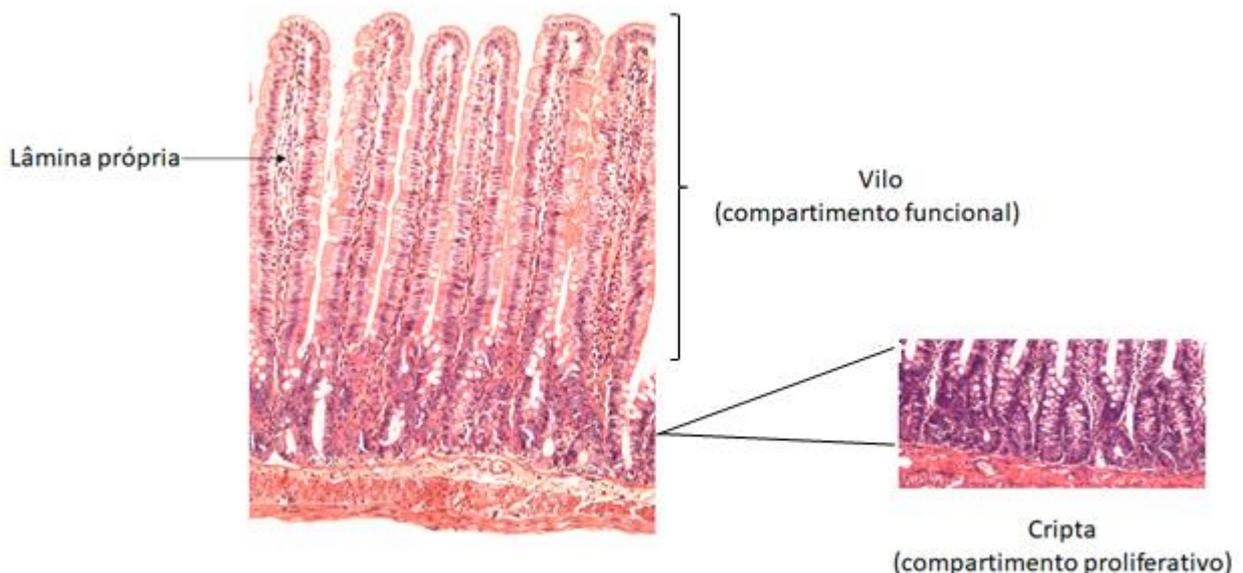


Figura 1. Representação do intestino delgado indicando as vilosidades em direção ao lúmen, lâmina própria e as invaginações denominadas criptas.

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 16º ou 17º 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 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 linfóides 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.

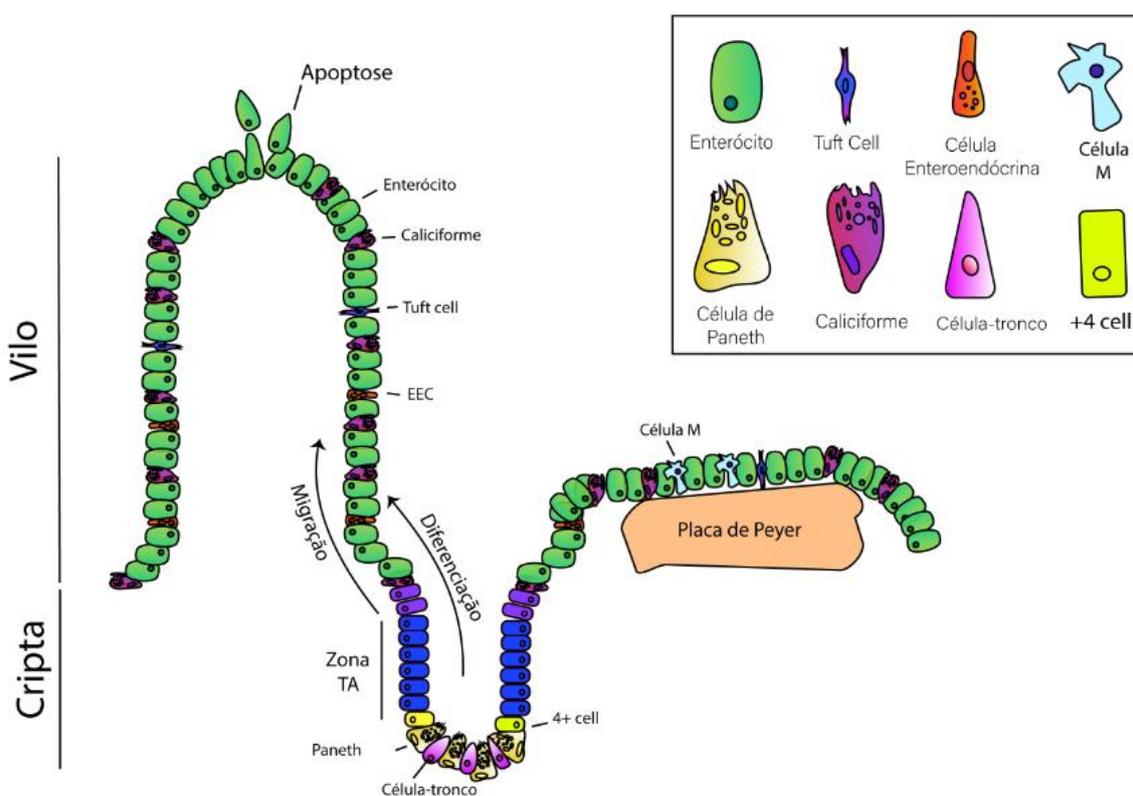


Figura 2. Representação esquemática de células intestinais ao longo do eixo cripta- vilo. Organização do nicho de células-tronco na base da cripta entre as células de Paneth. As células progenitoras na zona de transição em amplificação (TA) a partir da posição +4 e, em seguida em diferenciação para as 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 Leblon 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 absorptivas 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 absorptiva 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- vilão, 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 absortivas 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 vilo (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 vilo 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).

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 2017, 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.; HOOFF, 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.
- OGLIAS, 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 unrestrictive 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 trans genic 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.