

RENNAN LOPES OLIO

**Proteínas de comunicação e de junções celulares no
epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-
nascidos e bovinos adultos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2022

RENNAN LOPES OLIO

**Proteínas de comunicação e de junções celulares no
epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-
nascidos e bovinos adultos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

Versão original

São Paulo
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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)

Olio, Rennan

Proteínas de comunicação e de junções celulares no epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos / Rennan Olio; orientador Francisco Javier Hernandez Blazquez. -- São Paulo, 2022.

114 p.

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

1. Conexinas. 2. Caderinas. 3. Cateninas. 4. Imuno-histoquímica. 5. Estereologia. I. Javier Hernandez Blazquez, Francisco, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rennan Lopes Olio

Título da tese: Proteínas de comunicação e de junções celulares no epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos.

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

A Comissão Julgadora dos trabalhos de qualificação de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Expressão de proteínas de comunicação e de junções celulares e desenvolvimento do sistema nervoso entérico do retículo de bovinos durante as fases pré e pós-natal.", protocolada sob o CEUA nº 6255060818 (ID 007487), sob a responsabilidade de **Francisco Javier Hernandez Blazquez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/02/2020.

We certify that the proposal "Expression of communication proteins and cellular junctions and development of the enteric nervous system of bovines reticulum during the pre and postnatal phases.", utilizing 20 Bovines (males and females), protocol number CEUA 6255060818 (ID 007487), under the responsibility of **Francisco Javier Hernandez Blazquez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/12/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **01/2021**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **0 a 3 anos** N: **15**
Linhagem: **Nelore** Peso: **05 a 300 kg**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Bovinos** sexo: **Machos** idade: **0 a 24 horas** N: **5**
Linhagem: **holandêsa** Peso: **70 a 85 kg**

Local do experimento: Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-Histoquímica (LAMIH) - FMVZ-USP São Paulo

São Paulo, 17 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 10 de março de 2022
CEUA N 6255060818
(ID 008875)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Francisco Javier Hernandez Blazquez
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Proteínas de comunicação e de junções celulares no epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos."

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 09/fevereiro/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 09/fevereiro/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Vimos por meio desta solicitar a alteração do título do projeto inserido e aprovado na bioética".

Comentário da CEUA: A mudança solicitada não altera a semântica do título do projeto.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



São Paulo, 17 de julho de 2018

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Francisco Javier Hernandez Blazquez**, CPF 855.160.318-34, responsável pelo projeto intitulado: "Expressão de proteínas de comunicação e de junções celulares e desenvolvimento do sistema nervoso entérico do retículo bovinos durante as fases pré e pós-natal", certifico que:

- a) li o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Executante: Rennan Lopes Olio

Assinatura:  _____ Data: 17 / 07 / 2018

Responsável: Francisco Javier Hernandez Blazquez

Assinatura:  _____ Data: 17 / 07 / 2018



São Paulo, 07 de junho de 2022.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo

Prezados Senhores

Declaro que o Sr. Rennan Lopes Olio, aluno deste programa de Pós-graduação, por mim orientado, foi o executor do projeto "Proteínas de comunicação e de junções celulares no epitélio reticular de fetos bovinos, bezerras recém-nascidos e bovinos adultos" o qual submeti à CEUA/VET, por ser docente da FMVZ/USP e também por ser parte de um projeto temático mais amplo já aprovado pela mesma CEUA/VET. O projeto em questão, do qual somos coautores, foi aprovado em 07/08/2018 sob o número de protocolo 6255060818.

Sem mais,

Atenciosamente

Francisco Javier Hernandez Blazquez
Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Dedico aos meus pais, Rosemeire e Reinaldo, que trabalharam constantemente para que eu pudesse estar onde estou. À minha vó Lydia e irmão André, obrigado pela confiança em mim depositada, pelo carinho e pelo amor incondicional. Sempre pude contar com vocês em todos os momentos, obrigado pelos conselhos e apoio em todo caminho até agora, amo vocês. Muito obrigado por tudo, sempre!

Às minhas filhas peludas, Jujuba e Paçoca, que sem perceberem, fazem toda diferença nos meus dias trazendo alegria, mesmo nos dias ruins. Amo vocês peludinhas.

Dedico ao meu amor, Nicolay Serna Fagundes, que me apoiou em todo esse momento de término com muito carinho e amor, muito obrigado. Amo você!

Dedico este momento aos seres especiais que estão sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Oxalá e todos os guias que por muitas vezes me levantaram para que eu pudesse continuar!

Ao Professor Doutor Francisco Javier Hernandez Blazquez, pela dedicação, ensino e paciência durante esse período. Muito obrigado, por ser presente em sua orientação, por estar disposto com todo seu ensinamento, e pela confiança.

À minha tia Margo e primos Magaly Machado e Márcio Machado, que me me hospedaram no início da pós-graduação e me recebem até os dias de hoje com muito carinho.

À Nicolý e família, Vera Serna, João Fagundes, Cátia Del'acqua e Márcio Serna, pelo carinho, acolhimento e café, ainda mais nos momentos finais da confecção da tese.

Aos meus amigos queridos, Alice Del Colleto, Ariosvaldo, Atlinhas, Diogo N. Palermo, Felipe D. Pereira, Gabriela E. de Paula, Frederico M. de Paula, Lennon de Oliveira Matos, Nivaldo, Pedro S. Karam, Renan P. Alves, Ricardo H. Fornari, Severino Denicio G. de Sousa, Simone Palmeira, Túlio Yoshinaga, Túlio Carvalho Silva e Wilson P. Junior por todo apoio, pela amizade e carinho, pelos conselhos e companheirismo. Muito obrigado.

À equipe do setor de Anatomia da FMVZ - USP, em especial à Ana Paula da Silva por toda a colaboração, ajuda e paciência nestes anos.

À equipe da secretaria do ICB III - USP, em especial à Fabia e Eliane, por toda a colaboração e ajuda.

Ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, ao Dr. Guilherme Gomes da Silva e a todos da equipe do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite da USP de Pirassununga pela paciência, por toda ajuda e trabalho realizado em conjunto.

A todos com os quais convivi durante este período, por todos os momentos compartilhados.

Ao programa Interunidades em Biotecnologia, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Olio, R. L. **Proteínas de comunicação e de junções celulares no epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos**. 2022. 114p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O retículo é um dos pré-estômagos dos ruminantes. Ele se desenvolve somaticamente desde a fase pré-natal até ao fim do período de alimentação do leite. O epitélio reticular e a parede sofrem uma remodelação extensiva durante estas fases. Durante o desmame, o retículo começa a receber estímulos alimentares e finalmente torna-se funcional como órgão digestivo. Este trabalho visou descrever e elucidar alguns processos que contribuem para o remodelamento durante as fases fetais, nos bezerros recém-nascidos e bovinos adultos do epitélio reticular em seu rumo a um estado funcional, principalmente a formação e a caracterização das junções comunicantes 26, 32, 40 e 43. A presença de junções de adesão foi verificada através da identificação de E-cadherin e α - e β -catenins. Como premissa para esta abordagem, estudamos a histologia do órgão durante seu desenvolvimento. Foram utilizadas ferramentas estereológicas para calcular o volume da parede reticular e a densidade relativa do volume das camadas da parede. Foram calculados os índices de proliferação celular e de apoptose utilizando respectivamente marcadores Ki67 e caspase-3 clivados. Estudamos também a presença das conexinas 26, 32, 40 e 43 e proteínas das junções de adesão E-caderina, α e β -cateninas. Os resultados mostram que o volume da parede reticular do adulto é cerca de 37 vezes maior que a do bezerro recém-nascido, contudo, a relação entre o volume da parede em relação ao volume total (volume da parede + volume do lúmen) se mantém constante ao longo do desenvolvimento até a vida adulta. No adulto, a camada muscular compõe quase metade do volume total da parede, em função possivelmente do maior trabalho muscular de contração e motilidade nesta faixa etária. Nos fetos está presente uma estrutura epitelial transitória no interior da qual se desenvolvem as cristas reticulares a qual desaparece após o nascimento. O índice de proliferação pelo Ki67 é maior nos fetos de 110 dias, sendo que o índice de apoptose é maior no bovino adulto. As conexinas estudadas estão sempre presentes no epitélio, seja no citoplasma ou na membrana, mas sua presença na membrana formando junções, isto é, atuando funcionalmente na comunicação celular, varia com a idade e com o estrato epitelial. A Cx43 foi encontrada formando junções na membrana celular em todos os estratos

epiteliais e todas as faixas etárias, então nas comparações a seguir sua presença fica subentendida. No estrato basal, principal responsável pela renovação das células do epitélio, as Cxs32 e 40 tornam-se funcionais nos fetos e bezerros, mas não no adulto. Neste último apenas a Cx26 se torna funcional, estando presente no citoplasma em “modo de espera” nas outras fases. Nos estratos superiores do epitélio, onde as Cxs podem contribuir para a diferenciação, migração e manutenção celular, além da sincronização dos eventos epiteliais, a Cx32 apenas não é funcional nos adultos, e Cx40 não é funcional nos fetos, não contribuindo para a diferenciação e manutenção epitelial nestas fases. A Cx26 forma junções funcionais em todas as idades. Assim, a Cx43, por apresentar-se sempre funcional, parece ter uma função mais genérica nos processos celulares epiteliais, enquanto as outras parecem contribuir mais especificamente e localizadamente, dependendo da faixa etária e do processo biológico que predomina no estrato analisado. Em suma, para a diferenciação, migração e manutenção celular nos estratos superiores a Cx40 é importante para bezerros e adultos e a Cx32 para os fetos e bezerros. As Cxs26 e 43 são importantes em todas as fases etárias nos estratos superiores. A presença de E-caderina, α e β -cateninas na membrana revelou que a integridade estrutural do epitélio é reforçada pelas junções de adesão, proporcionando um ambiente propício para a formação de junções comunicantes.

Palavras-chave: Conexinas. Caderinas. Cateninas. Imuno-histoquímica. Estereologia.

ABSTRACT

Olio, R. L. **Communication and cell junction proteins in the reticular epithelium of bovine fetuses, newborn calves and adult bovines**. 2022. 114p. These (Ph.D in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The reticulum is one of the ruminant's pre-stomachs. It develops mainly by somatic growth from the prenatal phase until the end of the milk feeding period. The reticular epithelium and wall undergo extensive remodeling during these phases. During weaning the reticulum begins to receive food stimulus and finally becomes functional as a digestive organ. This work focused in the study of some remodeling processes that contribute to the fetal, newborn calf and adult bovine reticular epithelium adaptation to achieve a functional state, mainly the formation and connexins 26, 32, 40 and 43 characterization of the communicating junctions. The presence of adhesion junctions were verified by the identification of E-cadherin and α - and β -catenins. As a premise for this approach we studied the histology of the organ during its development. Stereological tools were employed to calculate the volume of the reticular wall and the relative volume density of the wall layers. The cell proliferation and apoptosis indexes using Ki67 and cleaved caspase-3 markers respectively were calculated. The volume of the adult reticular wall is 37 times larger than that of the newborn calf; however, the ratio of the wall volume to the total volume (wall volume + lumen volume) of the organ remains constant throughout the development into adulthood. In the adult, the muscle layer constitutes almost half of the total volume of the wall, possibly due to the intense muscle work of contraction and motility in this age group. In fetuses, a transient epithelial structure, inside of which the reticular folds develop, is present. After birth this structure disappears. The rate of proliferation by Ki67 is higher in the 110-day-old fetuses, and the rate of apoptosis is higher in the adult bovine. The connexins are always present in the epithelial cells, either in the cytoplasm or in the membrane, but their presence in the membrane forming junctions functionally active in cell communication varies with age and with the epithelial stratum studied. Cx43 forms functional communication junctions in all epithelial strata and all age groups, so in the following comparisons its presence is always implied. In the basal stratum, which is responsible for the renewal of epithelial cells, Cxs32 and 40 become functional in the fetus and calf, but not in the adult. Cx26 only becomes functional in the basal stratum in adults although it is present in the cytoplasm in "standby mode" in all other cases.

In the upper strata of the epithelium, where Cxs can contribute to cell differentiation, migration and maintenance, and synchronization of epithelial events, Cx32 is not functional only in adults, and Cx40 is not functional in the fetuses, not contributing to epithelial differentiation and maintenance at these age groups. Cx26 forms functional junctions in the upper strata at all ages. Cx43 because it is always functional, seems to have a more generic role in epithelial cellular processes, while the others seem to contribute more specifically and locally, depending on the age group and the biological process that predominates in the stratum analyzed. In summary, for cell differentiation, migration and maintenance in the upper strata Cx40 is important for calves and adults and Cx32 for fetuses and calves. Cxs26 and 43 are important at all age stages in the upper strata. The presence of E-cadherin, α - and β -catenins in the membrane revealed that the structural integrity of the epithelium is enhanced by adhesion junctions, providing a favorable environment for the formation of communicating junctions.

Keywords: Connexins. Cadherins. Catenins. Immunohistochemistry. Stereology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotografia de feto de aproximadamente 150 dias gestacionais com as regiões da medida céfalo-caudal.....	34
Figura 2 – Esquema do estômago bovino.....	34
Figura 3 – Fotografia do retículo feto 150 dias gestacionais em região dorsal e ventral.....	35
Figura 4 – Etapas para contagem de pontos para estimar o volume da parede do retículo de fetos 150 dias através do método de Cavalieri.....	36
Figura 5 – Fotografia do corte histológico corado com hematoxilina e eosina com o sistema de pontos para contagem das túnicas mucosa, submucosa e muscular.....	37
Figura 6 – Média do volume (cm ³) da parede reticular (PR).....	44
Figura 7 – Porcentagem (%) da parede reticular (PR) de fetos de 110 dias, 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos em relação ao volume da PR do bovino adulto.....	45
Figura 8 – Porcentagem (%) da parede reticular (PR) de fetos de 110 dias, 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos e bovino adulto em relação ao volume total do retículo (VTR, Volume da parede + lúmen do retículo).....	45
Figura 9 – Cortes teciduais de retículo bovinos de fetos de 110 dias gestacionais (A e B) e fetos de 150 dias gestacionais (C e D).....	48
Figura 10 – Cortes teciduais de retículos bovinos de bezerros recém-nascidos (A e B) e bovinos adultos (C e D).....	49
Figura 11 – Média do volume (cm ³) das camadas teciduais mucosa, submucosa e muscular da parede reticular (PR) nas diferentes idades estudadas pré-ruminante (fetos 110 dias, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos de aproximadamente 275 dias e Bovinos adultos).....	51
Figura 12 – Porcentagem (%) do volume (cm ³) de cada camada tecidual (mucosa, submucosa e camada muscular) em relação ao volume total da parede reticular (VPR) dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias).....	53
Figura 13 – Quantificação do índice de proliferação celular (IPC) pelo Ki67 nos cortes teciduais de retículos fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo).....	55
Figura 14 – Quantificação da reação imuno-histoquímica de Caspase-3 nos cortes teciduais de retículos fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo).....	57
Figura 15 – Comparação entre o índice de proliferação celular (IPC) pela Ki67 e o índice de apoptose (IA) pela Caspase-3 dos retículos bovinos entre as regiões dorsal (A) e ventral (B) de cada idade, feto 110 dias gestacionais, feto 150 dias gestacionais, bezerro recém-nascido e bovinos adultos (5 animais por grupo).	59
Figura 16 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 26 na camada basal do epitélio reticular.....	62
Figura 17 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 26 no epitélio reticular.....	64
Figura 18 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 32 na camada basal do epitélio reticular.....	66
Figura 19 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 32 no epitélio reticular.....	68

Figura 20 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 40 na camada basal do epitélio reticular.....	70
Figura 21 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 40 no epitélio reticular.....	72
Figura 22 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 43 na camada basal do epitélio reticular.....	74
Figura 23 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 43 no epitélio reticular.....	76
Figura 24 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da E-caderina na camada basal do epitélio reticular.....	78
Figura 25 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da E-caderina no epitélio reticular.....	80
Figura 26 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Alfa-catenina na camada basal do epitélio reticular.....	82
Figura 27 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Alfa-catenina no epitélio reticular.....	84
Figura 28 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Beta-catenina na camada basal do epitélio reticular.....	86
Figura 29 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Beta-catenina no epitélio reticular.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa da idade gestacional dos bovinos segundo (NODEN; LAHUNTA, 1990).....	33
Tabela 2 – Idade gestacional e desenvolvimento fetal (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; NODEN; LAHUNTA, 1990)	33
Tabela 3 – Anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica no epitélio reticular.....	39
Tabela 4 – Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica de fluorescência de alta sensibilidade no epitélio reticular.....	41
Tabela 5 – Quantificação do aumento de volume (cm ³) da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos.....	44
Tabela 6 – Quantificação do volume (cm ³) das camadas teciduais da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos.....	50
Tabela 7 – Porcentagem (%) do volume (cm ³) de cada camada tecidual (mucosa, submucosa e camada muscular) em relação ao volume total da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos.....	52
Tabela 8 – Valores com as médias da porcentagem (%) do índice de proliferação celular da camada basal do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo), através da marcação por ki67.....	55
Tabela 9 – Valores com as médias da porcentagem (%) e desvio padrão da média do índice de apoptose (IA) da camada basal do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo), através da marcação por caspase-3.....	56
Tabela 10 – Valores para comparação entre o índice de proliferação celular (IPC) pelo Ki67 e o índice de apoptose (IA) pela Caspase-3 dos retículos bovinos entre as regiões dorsal (A) e ventral (B) de cada idade, feto 110 dias gestacionais, feto 150 dias gestacionais, bezerro recém-nascido e bovinos adultos (5 animais por grupo).....	58
Tabela 11 – Relação da presença das diferentes conexinas (26, 32, 40 e 43), E-caderina, α e β -cateninas nas diferentes idades estudadas.....	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 <i>Evolução dos ruminantes</i>	25
2.2 <i>Estômago dos bovinos</i>	26
2.3 <i>Desenvolvimento do estômago</i>	27
2.4 <i>Retículo</i>	28
2.5 <i>Pele e retículo</i>	28
2.6 <i>Proteínas de comunicação e adesão</i>	29
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 <i>Delineamento experimental</i>	32
4.2 <i>Volume da parede do retículo</i>	35
4.3 <i>Histologia - Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)</i>	36
4.4 <i>Densidade De Volume (Vv) Das Túnicas Muscular (Vvmus), Submucosa (Vvsub) E Mucosa (Vvmuc)</i>	36
4.5 <i>Imuno-histoquímica e quantificação do índice de proliferação celular pelo Ki67 e de índice de apoptose pela Caspase-3</i>	38
4.6 <i>Imunofluorescência</i>	40
4.6.1 <i>Imuno-Histoquímica de Fluorescência de Alta Sensibilidade (Tiramida-Fluoresceína)</i>	40
4.7 <i>Análise estatística</i>	42
5 RESULTADOS	43
5.1 <i>Volume da parede reticular pelo princípio de Cavalieri</i>	43
5.2 <i>Morfologia reticular por Hematoxila e Eosina (HE)</i>	46
5.2.1 <i>Fetos 110 dias gestacionais</i>	46
5.2.2 <i>Fetos 150 dias gestacionais</i>	47
5.2.3 <i>Bezerros recém-nascidos</i>	47
5.2.4 <i>Bovinos adultos</i>	47
5.3 <i>Volume das camadas teciduais da parede reticular</i>	50
5.4 <i>Quantificação do índice de proliferação (IPC) e de apoptose (IA)</i>	54
5.4.1 <i>Anti-Ki67</i>	54
5.4.2 <i>Anti-Caspase-3 clivada</i>	56
5.4.3 <i>Proliferação (ki67) x apoptose (caspase-3)</i>	58
5.5 <i>Estudo de proteínas das junções celulares por imunofluorescência</i>	60
5.5.1 <i>Conexina 26</i>	60
5.5.1.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	60

5.5.1.2 – Bezerros recém-nascidos	60
5.5.1.3 – Bovinos adultos	61
5.5.2 Conexina 32	65
5.5.2.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	65
5.5.2.2 – Bezerros recém-nascidos	65
5.5.2.3 – Bovinos adultos	65
5.5.3 Conexina 40	69
5.5.3.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	69
5.5.3.2 – Bezerros recém-nascidos	69
5.5.3.3 – Bovinos adultos	69
5.5.4 Conexina 43	73
5.5.4.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	73
5.5.4.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos	73
5.5.5 E-Caderina.....	77
5.5.5.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	77
5.5.5.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos	77
5.5.6 Alfa-Catenina.....	81
5.5.6.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	81
5.5.6.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos	81
5.5.7 Beta-catenina	85
5.5.7.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais	85
5.5.7.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos	85
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÕES	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes, pertencentes a Ordem Artiodactyla e Subordem Ruminantia, se alimentam de forragem, um alimento que possui baixo valor nutritivo, que é constituída de celulose e outros carboidratos complexos, os quais não são suscetíveis à ação de enzimas digestivas de mamíferos, sendo decompostos por micro-organismos simbiotes. Para isso, os animais ruminantes possuem um estômago diferenciado, são animais que possuem um estômago complexo ou pluricavitário, composto por rúmen, retículo, omaso e abomaso. Além dessa particularidade, há ausência de incisivos superiores, caninos inferiores são incisiformes e ossos társicos navicular e cuboide fundidos (DYCE; WENSING; SACK, 2010; GENTRY, 2000; HACKMANN; SPAIN, 2010; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

O retículo, assim como os outros pré-estômagos (rúmen e omaso), passam por desenvolvimento desde neonato até o desmame do animal, tendo formação ainda das câmaras pré-gástricas pós-natal, no entanto, a medida que o animal passa pela transição alimentar de líquido (leite materno) para alimentos sólidos (forragens) o processo de digestão da celulose pelos micro-organismos passa a ser necessário (CHURCH, 1993; REECE, 2006).

O retículo possui um epitélio morfologicamente semelhante ao da pele, constituído de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, embora não possua melanócitos como a pele, possui células proliferativas na camada basal que por sua vez se diferenciam em estratos até a queratinização do epitélio (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007; KOBIELAK; BODDUPALLY, 2014; SCOTT *et al.*, 2012). A mucosa do retículo possui uma vasta rede de pregas primárias conectadas como uma rede, tal particularidade do retículo, faz com que ele se pareça com um favo de mel. A partir das dobras que se projetam verticalmente surgem papilas secundárias e terciárias. No ápice dessas pregas primárias ou reticulares há um aglomerado isolado de músculo liso na camada muscular da mucosa, e quando há contração reticular esse músculo faz com que as células se fechem e ocorre retenção das partículas nas células reticulares, selecionando assim as a ingesta que passará para o omaso, sendo então uma câmara de seleção de partículas (BANKS, 1992; KITAMURA *et al.*, 2003; REECE, 2006). Como parte do estudo da evolução do retículo na fase intra-uterina e após o nascimento, também estudamos a evolução das camadas da parede reticular, a mucosa, a submucosa e a camadas muscular

comparando a proporção volumétrica de cada camada e seu volume real durante estas fases e na fase adulta usando a estereologia como ferramenta de estudo, para entender que alterações de volume cada estrato sofre na vida intra-uterina e após o nascimento comparadas com a fase adulta, já com um retículo plenamente funcional. O objetivo deste estudo também foi o de testar e adaptar a metodologia estereológica, mais usada para estruturas de pequenas dimensões, para o cálculo de volume de macroestruturas como o retículo de um animal adulto. Como não há estudo semelhante feito até o momento, deixamos as hipóteses do que se poderia encontrar em aberto, com exceção da hipótese de que seria possível aplicar a metodologia em estruturas muito grandes.

Em relação ao epitélio reticular, é interessante descrever mecanismos de adaptação que suas células possuem, uma vez que esse órgão passa por um remodelamento e desenvolvimento tecidual ainda pós-natal até o desmame, que perdura aproximadamente 8 semanas (REECE, 2006). Dito isso, um dos mecanismos celulares são as junções comunicantes, elas conectam uma célula a outra e são muito importantes, uma vez que sincronizam funções celulares e regulam a coordenação metabólica através da passagens de moléculas como ATP, íons e fatores de proliferação e morte celular no epitélio reticular ao longo da formação e remodelamento tecidual. As conexinas, são as subunidades proteicas das junções comunicantes que conferem a comunicação direta entre as células vizinhas (BODENDIEK; RAMAN, 2010).

Além disso, o estudo das proteínas de comunicação, junção e adesão celulares (caderinas, cateninas e conexinas) são consideradas de grande importância na interação celular e manutenção da organização tecidual. Tendo em vista que ocorrem adaptações teciduais durante o desenvolvimento do retículo, com modificação do fenótipo e fisiologia do epitélio reticular, esse órgão apresenta oportunidade única de verificar se as mesmas conexinas e proteínas de junção celular respondem diferentemente durante algumas fases do desenvolvimento do órgão. Desse modo, as proteínas de junção célula-célula são importantes, uma vez que a disfunção das mesmas não permite a continuidade da homeostase da célula em relação à sua aderência, proliferação, diferenciação, migração e comportamento, deixando de manter a estrutura tecidual (MESNIL; PICCOLI; YAMASAKI, 1997; TAKEICHI, 1991). Como o epitélio do retículo é pavimentoso estratificado queratinizado, sendo semelhante ao epitélio encontrado na pele (BANKS, 1992) onde estas proteínas foram

mais estudadas (GARCIA-VEGA *et al.*, 2021; KOBIELAK; BODDUPALLY, 2014; NIESSEN, 2007; SCOTT *et al.*, 2012), selecionamos caderina (E), cateninas (Alfa e Beta) e conexinas (26, 32, 40 e 43) expressas neste tecido e que devem ser importantes para o tecido que compõe o retículo. As caderinas e as cateninas formam os complexos de adesão celular chamados junções estreitas na epiderme. A presença desta junções e, conseqüentemente, das moléculas que estabilizam a membrana celular, Esta estabilização, por sua vez, é pré-requisito para a formação das junções do tipo “gap” ou “junções comunicantes” formadas pelas conexinas na membrana celular, embora a formação de junções estreitas ou de adesão não seja pré-requisito para a mera presença de conexinas no epitélio, estas podem, ainda assim, se acumular no citoplasma, apenas não formam junções comunicantes na membrana celular. A literatura demonstra que podem ocorrer as seguintes situações: a) presença de junções de adesão e de junções de comunicação; b) presença de junções de adesão e presença de conexinas, mas estas apenas no citoplasma e não na membrana; c) presença de junções de adesão e ausência total de conexinas e d) ausência de junções de adesão, mas presença de conexinas apenas no citoplasma (HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001). Além disso, o complexo de adesão formado pelas caderinas e cateninas mantém a homeostase celular das células epiteliais, uma vez que as junções aderentes mantem a arquitetura celular e mantém o formato celular, além de manter o crescimento e proliferação epitelial (BRAGA, 2000; HUBER; BIERKAMP; KEMLER, 1996; IZAGUIRRE *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2008). Por isso é importante estudar estes dois grupos de proteínas em conjunto quando se estuda a presença de junções comunicantes em epitélios, para saber se a presença de conexinas apenas no citoplasma se deve à ausência de junções de adesão, ou na presença destas, a alguma estratégia metabólica momentânea do epitélio.

Como o epitélio reticular é muito semelhante ao da epiderme, testaremos inicialmente a hipótese de que elas também estarão presentes no retículo. Como pode ser visto, as conexinas tem papel importante na a) comunicação celular b) diferenciação celular c) queratinização da epiderme d) crescimento celular e) proliferação e morte celular através de mensageiros secundários f) migração celular g) manutenção e homeostase tecidual h) sincronização das funções celulares e coordenação metabólica de estruturas avasculares, como é o caso do epitélio i) troca de íons e pequenas moléculas como ATP e glicose entre as células de modo direto (BODENDIEK; RAMAN, 2010; CHURKO; LAIRD, 2013; KARDAMI *et al.*, 2007; MEŞE;

RICHARD; WHITE, 2007). A epiderme foi utilizada como nosso principal ponto de referência, tendo em vista que não há nenhum estudo sobre as junções epiteliais e suas proteínas no retículo de qualquer ruminante. Entretanto, algumas informações importantes a respeito destas proteínas já foram elucidadas no rúmen, como a expressão das mesmas proteínas de comunicação, junção e adesão celular, durante a adaptação tecidual pela qual os pré-estômagos passam durante seu desenvolvimento (FERRÃO, 2018).

Além disso, no retículo ocorre adaptação tecidual nas diferentes fases desenvolvimento, é interessante avaliar a atividade celular proliferativa e apoptótica, com os respectivos anticorpos, anti-Ki-67, que é um marcador da proliferação celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000), e a Caspase-3, que cliva e ativa as Caspases -6, -7 e -9, participando, assim, da apoptose celular (BOATRIGT; SALVESEN, 2003; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Como nas fases intrauterinas estudadas o epitélio reticular sofre várias adaptações e mudanças de forma, o estudo das moléculas indicativas de proliferação e apoptose podem nos dar importantes informações sobre a dinâmica de transformação desta estrutura. Dessa maneira, podemos inferir a presença das conexinas e sua relação com a proliferação e morte celular, uma vez que a presença de diferentes conexinas se dá ao longo do desenvolvimento e uma das funções das junções comunicantes é a passagem de marcadores secundários para proliferação e apoptose, até o momento nada foi descrito no epitélio reticular, razão pela qual vale a pena elucidar as diferentes conexinas, bem como o índice de proliferação celular e apoptose.

Em relação às conexinas, a hipótese do trabalho é que as diferentes conexinas no epitélio reticular são importantes durante os eventos naturais intrínsecos como proliferação, diferenciação, manutenção e renovação tecidual e que cada fase se caracteriza pela predominância da presença de uma ou mais conexinas diferentes. O epitélio reticular é uma estrutura avascular, como todos os epitélios, as conexinas tem papel muito importante durante o desenvolvimento tecidual embrio/fetal e bovino adulto, uma vez que as junções comunicantes oferecem canais para que as células troquem íons e pequenas moléculas que sincronizam funções celulares e regulam coordenações metabólicas. Na literatura não há registros de proteínas de comunicação no retículo bovino, um órgão muito importante durante o processo de ruminação, sendo um seletor de partículas que continuarão no processo de fermentação ou que seguirão para digestão química. Sendo um órgão que na vida

adulta tem um epitélio que sofre constante efeito abrasivo da dieta fibrosa, é interessante elucidar como este epitélio se prepara para esta função e como as conexinas contribuem para que o epitélio desempenha sua função, inclusive nos animais adultos, uma vez que este grupo também foi introduzido nos estudos realizados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Evolução dos ruminantes*

Ao longo das eras, a terra passou por diversas alterações climáticas e ambientais drásticas, isso resultou na seleção de indivíduos mais adaptados para se alimentar, reproduzir, enfim, perpetuar a espécie em cada um dos habitats. Os grandes mamíferos herbívoros mais abundantes durante o fim do Cretáceo e o início do Eoceno eram os Ungulados (termo não mais usado para classificação, atualmente foi dividido em Artiodáctilos, Perissodáctilos, Cetáceos, Proboscídeos, etc.), que passaram também por grandes mudanças climáticas e ambientais, além da alteração na vegetação (GORDON; PRINS, 2008, 2019; HACKMANN; SPAIN, 2010; JANIS, 1993). Essas alterações, resultaram em estratégias na maneira de se alimentar dos indivíduos, dentre esses animais, haviam grupos que se alimentavam de plantas, cascas de árvores, raízes, etc. são os chamados browsing, e outros se alimentavam de pastagem, chamados de grazer (CLAUSS; HUME; HUMMEL, 2010; GORDON; PRINS, 2008, 2019; JANIS, 1993). No fim do cenozoico, após o resfriamento climático global e a ascensão das pastagens, os grupos de animais que se alimentavam de pastagem aumentou. As espécies de ruminantes que pastoreiam, como os bovinos, tiveram mais sucesso na obtenção de alimento (GARCÍA-YUSTE, 2020; GORDON; PRINS, 2019).

Há cerca de 10.000 mil anos atrás, os ruminantes foram animais importantes no desenvolvimento humano, isso se dá pelo fato de que as ovelhas foram domesticadas a fim de se obter carne e leite diminuindo assim, as caças para obtenção de alimentos. Dessa maneira, houve um desenvolvimento econômico através de uma transição da caça para um modelo de produção animal. Os bovinos por sua vez, foram domesticados cerca de 2,5 mil anos atrás, e desde então impactam o mercado econômico (HACKMANN; SPAIN, 2010).

2.2 Estômago dos bovinos

Os bovinos pertencem a Ordem Artiodáctila, Subordem Ruminantia, os ruminantes são animais que possuem um estômago complexo ou pluricavitário, composto por rúmen, retículo, omaso e abomaso. Além dessa particularidade, há ausência de incisivos superiores, caninos inferiores incisiformes e ossos társicos navicular e cuboide fundidos (DYCE; WENSING; SACK, 2010; GENTRY, 2000; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

A estrutura do estômago é determinada pelo hábito alimentar, assim, o equino, o suíno e os carnívoros possuem estômago simples e os ruminantes estômagos complexos (GETTY, 1986). O estômago dos animais difere quanto a sua forma e a constituição do tipo de mucosa. Logo, classifica-se como estômago simples ou composto (DYCE; WENSING; SACK, 2010; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011; GARCÍA-YUSTE, 2020; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

O sistema digestivo consiste de um tubo muscular revestido por uma membrana mucosa. Ele reduz os componentes nutritivos dos alimentos à compostos moleculares que são pequenos o suficiente para serem absorvidos e usados para a energia e para a construção de outros compostos, para incorporação em tecidos do corpo. Os compostos são quebrados no estômago mecanicamente, quimicamente e por processo biológico (microbiano) no caso dos ruminantes (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

No estômago de ruminantes é característica a divisão em câmaras ou estômago pluricavitário, três delas são pré-estômagos (rúmen, retículo e omaso), e a quarta câmara é o estômago verdadeiro (abomaso), apresentando características parecidas ao estômago unicavitário de carnívoros (DYCE; WENSING; SACK, 2010; GETTY, 1986; KÖNIG; LIEBICH, 2011). Em relação à sua posição anatômica nos ruminantes adultos, o estômago situa-se em quase todo o antímero esquerdo da cavidade abdominal e uma pequena parte dele está no antímero direito. O rúmen situa-se à esquerda na cavidade abdominal, enquanto o retículo é mais cranial e ventral em relação ao rúmen, o omaso, à direita e ventral, e o abomaso caudo-ventralmente ao rúmen (DYCE; WENSING; SACK, 2010; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

2.3 Desenvolvimento do estômago

Uma vez que há o desenvolvimento das câmaras pré-gástricas desde a fase pré-natal até o desmame do animal, uma invaginação que ocorre na parede do retículo, desde o cárdia até o orifício reticulo-omasal, chamada sulco reticular (goteira esofágica), faz com que o alimento ingerido, basicamente leite materno, não entre nas câmaras pré-gástricas durante o processo de desenvolvimento dos pré-estômagos. Quando o leite entra no esfíncter cárdia é direcionado para o omaso, mas 10% ou menos entram no rúmen. Isso acontece quando a goteira está contraída, e esse desvio é importante para o rúmen, fazendo com que o órgão se desenvolva adequadamente. A passagem pelo omaso é rápida e o leite segue em direção ao abomaso (CUNNINGHAM; KLEIN, 2011; DYCE; WENSING; SACK, 2010; REECE, 2006)

É interessante destacar esse evento de desenvolvimento somático do estômago dos ruminantes (rúmen, retículo, omaso e abomaso) que ocorre desde a fase pré-natal até o nascimento. Logo após o nascimento e no início do processo de desmame, o animal entra na fase de pré-ruminante, ingerindo alimentos sólidos, mas ainda tendo como alimentação principal o leite. Esse período é muito importante, pois o ato de mamada promove a secreção salivar, contendo esterase pré-gástrica, que inicia a hidrólise dos lipídeos do leite e, como consequência, a ingestão de leite e o ato de mamar promovem secreções abomasais. A ingestão de contaminantes proveniente do alimento e do ambiente no qual o animal se encontra, desde os primeiros dias após o nascimento, e principalmente durante o desmame, faz o rúmen e o retículo se tornarem um ambiente propício para a ação fermentativa, produzindo ácidos graxos voláteis (AGV) essenciais para o desenvolvimento das papilas ruminais e pregas reticulares. Este fato é uma característica da fase transicional, pois o animal ainda se alimenta de leite e produtos para fermentação, uma vez que é essencial para o contínuo desenvolvimento das câmaras até o desmame. A fase final de desmame se destaca pelo fechamento do sulco reticular (goteira esofágica), e coincide com o declínio natural da lactação. Contudo, o sucesso do desmame dependerá do desenvolvimento dos pré-estômagos para facilitar a fermentação de forragens (CHURCH, 1993; REECE, 2006).

2.4 Retículo

O retículo possui formato esferoide e assemelha-se funcionalmente ao rúmen. Ele constitui a câmara cranial dos pré-estômagos e está sobre o processo xifoide do esterno em situação retrodiafragmática (GETTY, 1986; KÖNIG; LIEBICH, 2011).

Apesar do termo ruminoretículo ser aplicado a estes dois órgãos por terem relação funcional, eles exibem padrões de motilidade únicos para cada compartimento. A motilidade do rúmen consiste principalmente na mistura do alimento, enquanto que o retículo tem padrão de motilidade para regurgitação do alimento (REECE, 2006; RUCKEBUSCH, 2011). Além disso, conforme há contração reticular, partículas ficam retidas nas células reticulares, e dessa maneira, fazendo do retículo uma câmara seletora de partículas que seguirão para o próximo pré-estômago (KITAMURA *et al.*, 2003; OKINE *et al.*, 1998).

Histologicamente, o retículo é semelhante ao rúmen no que diz respeito ao epitélio, camada conjuntiva e camadas musculares. Diferentemente do rúmen, que possui numerosas papilas que aumentam a superfície de contato para absorção, a mucosa do retículo possui uma vasta rede de pregas primárias conectadas como uma rede, tal particularidade do retículo, faz com que ele se pareça com um favo de mel. A partir das dobras que se projetam verticalmente, surgem papilas secundárias e terciárias. No ápice dessas pregas primárias ou reticulares há um aglomerado isolado de músculo liso na camada muscular da mucosa, e quando há contração reticular esse músculo faz com que as células se fechem e ocorre retenção das partículas nas células reticulares, selecionando assim as a ingesta que passará para o omaso (BANKS, 1992; KITAMURA *et al.*, 2003; REECE, 2006).

2.5 Pele e retículo

É importante lembrar que o retículo possui um epitélio morfologicamente semelhante ao da pele, constituído de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, embora não possua melanócitos igual na pele, possui células proliferativas na camada basal, que por sua vez se diferenciam em estratos até a queratinização do epitélio. O processo de queratinização é importante, uma vez que protege e impermeabiliza o tecido. No caso dos ruminantes, esse tipo de epitélio nas câmaras pré-gástricas é essencial, pois há abrasão da ingesta fibrosa, e tem papel na

proteção das ultraestruturas, bem como as pregas reticulares e assoalho do retículo. Visto isso, as conexinas tem papel fundamental na comunicação intercelular de um epitélio, que é uma estrutura avascular, e as moléculas que interpassam as células estabilizam e coordenam as atividades celulares como manutenção e proliferação celular, como nos outros tecidos avasculares (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007; GARCIA-VEGA *et al.*, 2021; KOBIELAK; BODDUPALLY, 2014; SCOTT *et al.*, 2012).

2.6 Proteínas de comunicação e adesão

É importante ressaltar o desenvolvimento do retículo desde a fase fetal até o desmame do animal, pois esse órgão passa por modificações morfológicas (CHURCH, 1993; STALLCUP; KREIDER; RAKES, 1990). Uma vez que não há na literatura estudos acerca das proteínas de comunicação, junção e adesão celular no retículo, é de grande interesse elucidar a presença dessas proteínas no retículo, já que elas que são características de células epiteliais (GARCIA; NELSON; CHAVEZ, 2018). Algumas dessas proteínas são encontradas na junção gap, as chamadas conexinas. A junção gap é um importante mecanismo que faz a interação célula-célula de maneira imediata e individualizada, de modo que as mesmas troquem moléculas entre elas, formando um trânsito de informação entre células adjacentes (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; STEINBERG, 1998). Além das conexinas, outras proteínas de grande importância celular são as caderinas. Conexinas e caderinas são consideradas proteínas de regulação da proliferação e diferenciação celular (MESNIL; PICCOLI; YAMASAKI, 1997; TAKEICHI, 1991). As caderinas são glicoproteínas transmembrânicas responsáveis pela adesão mediada por Ca^{2+} em células epiteliais (GEIGER; AYALON, 1992; HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001), atuam na migração e no comportamento celular, mantendo a estrutural normal dos tecidos, além de participar na regulação da histogênese e morfodiferenciação (PETTITT, 2005). Uma possível relação entre a comunicação intercelular da junção gap e a E-caderina são indicadas (HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001; JONGEN *et al.*, 1991; MEGE *et al.*, 1988; MEYER *et al.*, 1992), uma vez que a adesão celular dependente de Ca^{2+} é mediada pela E-caderina (JONGEN *et al.*, 1991). Além das conexinas e caderina, as cateninas são essenciais, uma vez que, associadas à caderinas apresentam sua

função normal de manutenção na integridade celular (GUJRAL et al., 2013; ZHAO et al., 2003).

As cateninas juntamente com as caderinas, formam um complexo de adesão, a principal função das cateninas é união dos filamentos de actina às caderinas, de modo que esse complexo da junção aderente possa cumprir seu papel na homeostase celular e tecidual, uma vez que esse tipo de junção preserva a arquitetura celular mantendo a forma e se organizando de maneira em que as células possam se proliferar, diferenciar e migrar. Além disso, durante o desenvolvimento da epiderme, as junções aderentes tem papel na integridade celular enquanto o tecido sofre o processo de formação e remodelamento (BRAGA, 2000; HUBER; BIERKAMP; KEMLER, 1996; IZAGUIRRE *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

Descrever a expressão e a localização das caderinas (E e N), cateninas (Alfa e Beta) e conexinas (26, 32, 40 e 43) no retículo de fetos bovinos (110 e 150 dias de desenvolvimento), bezerros recém-nascidos e bovinos adultos, a partir das técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência, para verificar o comportamento de expressão dessas proteínas nas diferentes idades estudadas. Ainda, realizar descrição morfológica tecidual e das atividades celulares proliferativa e apoptótica, com os respectivos anticorpos, anti-Ki67 e anti-Caspase-3, com a finalidade de observar as mudanças que ocorrem na mucosa reticular durante seu desenvolvimento. Além disso, análise estereológica das camadas teciduais que compõem o retículo (epitélio, conjuntiva e musculares), afim de mensurar o volume das mesmas, para observar as possíveis mudanças e/ou adaptações nos estados digestivo afuncional (fetos 110, 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos) para funcional (bovinos adultos) do órgão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Delineamento experimental*

Para realização desta pesquisa foram utilizados retículos bovinos das seguintes idades: fetos de 110 dias gestacionais (19 – 22 cm de comprimento), fetos de 150 dias gestacionais (34 – 37 cm de comprimento), bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. As idades gestacionais foram estimadas através da medida céfalo-caudal (ou em inglês Crown-rump CR), que é a distância entre a região cranial (osso occipital) e a região caudal (primeira vértebra coccígea) como mostrado na figura 1 (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; NODEN; LAHUNTA, 1990). Os 10 fetos (raça nelore) e 5 bovinos adultos (aproximadamente 3 anos, macho, raça nelore) foram coletados no frigorífico Barra Mansa, sede localizada em Sertãozinho-SP. Os 5 bezerros recém-nascidos (até 24h após nascimento, raça holandesa) foram adquiridos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ/USP) no campus de Pirassununga e foram eutanasiados imediatamente após o nascimento no Centro de Apoio à Pesquisa e Ensino da FMVZ/USP em Pirassununga. O material colhido foi dividido de acordo com a idade dos animais (Tabelas 1 e 2; Figura 3). A eutanásia dos bezerros recém-nascidos foi realizada através da sedação profunda com Tiopental (10mg/Kg), seguida de aplicação de xilazina (3ml/kg) por via endovenosa, seguida de aplicação de 20ml de cloreto de potássio (KCl), também por via endovenosa.

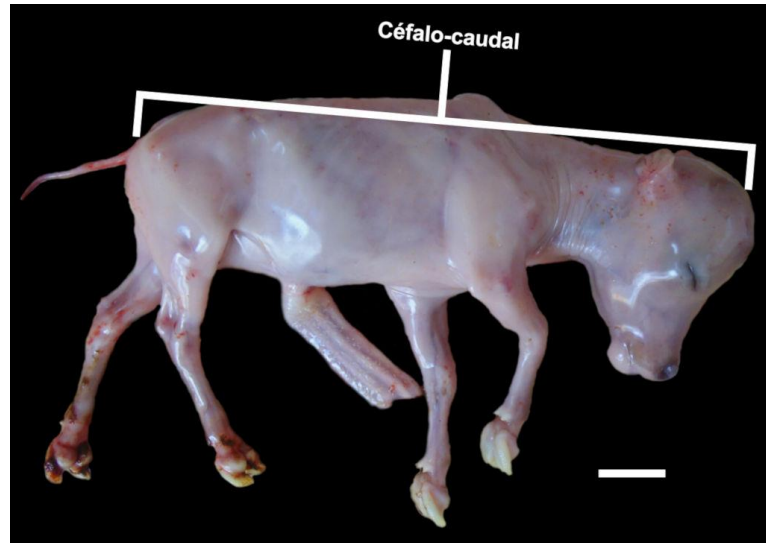
Tabela 1 – Estimativa da idade gestacional dos bovinos segundo (NODEN; LAHUNTA, 1990).

Idade (dias)	Céfalo-caudal (cm)
40-60	1-5
60-80	6-10
80-100	11-15
100-110	16-20
110-125	21-25
125-140	26-30
140-150	31-35
150-160	36-40
160-170	41-45
170-180	46-50
180-190	51-55
190-200	56-60
200-210	61-65
210-225	66-70
225-230	71-75
230-240	76-80
240-260	81-85
260-270	86-90
270-280	91-95

Tabela 2 – Idade gestacional e desenvolvimento fetal (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; NODEN; LAHUNTA, 1990).

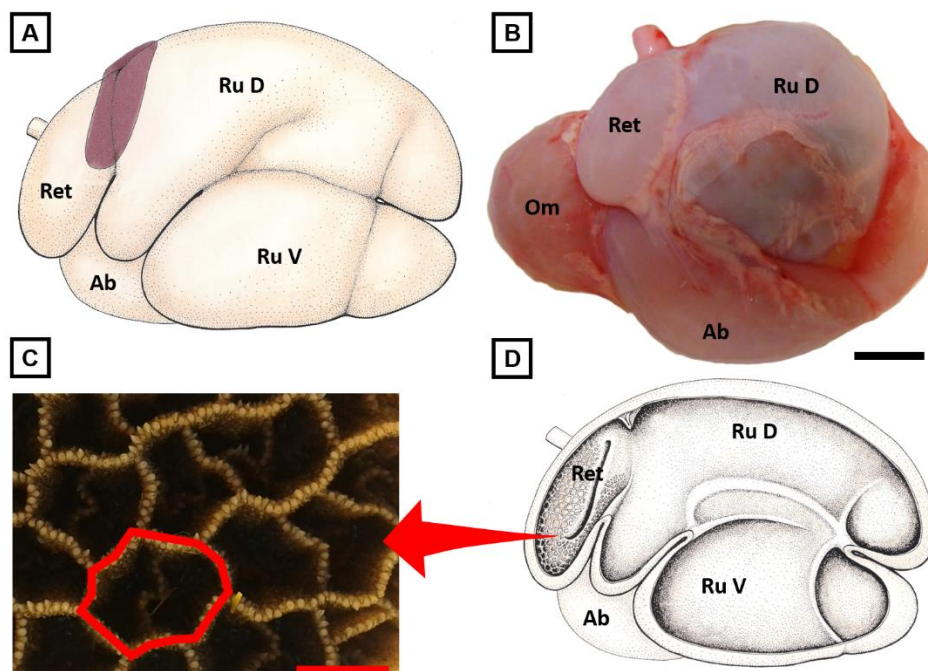
Idade	Descrição
110 dias de gestação (240 mm de comprimento)	Diferenciação completa dos estômagos (pré-estômagos e abomaso), tamanhos relativos dos quatro compartimentos estomacais no feto são comparáveis com os encontrados no adulto.
150 dias de gestação (370 mm de comprimento)	Todos os órgãos desenvolvidos e diferenciados.
Bezerros (Até 48 horas após o nascimento)	Pré-estômagos em desenvolvimento para alimentação de sólidos.
Bovinos adultos (Animais acima de 30 meses)	Estômagos completamente desenvolvidos.

Figura 1 – Fotografia de feto de aproximadamente 150 dias gestacionais com as regiões da medida céfalo-caudal. Barra: 3cm.



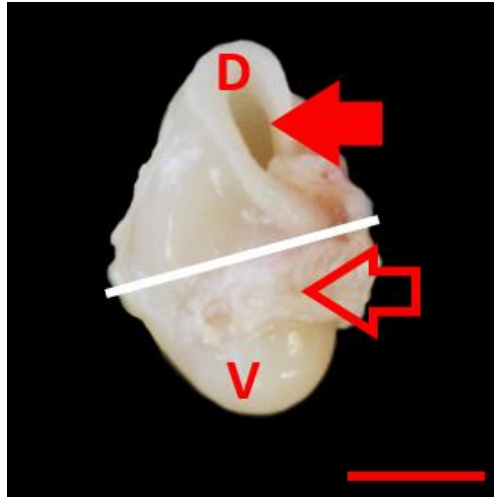
Na coleta do retículo dos fetos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (Figura 2) as posições anatômicas foram exatas às já descritas, não sendo observadas diferenças em relação à literatura.

Figura 2 – Esquema do estômago bovino (vista lateral esquerda) (A e D). Em B foto do estômago de um feto de 150 dias gestacionais; Em C foto de fragmento do retículo de bovino adulto com delineamento da célula reticular (destaque em vermelho). Ru. D – Rúmen saco dorsal; Ru V – Rúmen saco ventral; Ret – Retículo; Om – Omaso; Ab – Abomaso. Esquema adaptado (KÖNIG; LIEBICH, 2011). Em (B) barra: 2cm e (A) barra: 1cm.



Para análise mais detalhada do órgão, ele foi dividido em região Dorsal e Ventral do retículo como mostra a figura 3.

Figura 3 – Fotografia do retículo feto 150 dias gestacionais dividido em região dorsal e ventral pela barra de cor branca. Óstio ruminoreticular (**seta**) na região dorsal (**D**) e óstio retículo-omasal (**seta vazada**) na região ventral (**V**). Barra: 2cm.



4.2 Volume da parede do retículo

Para estimar o volume da parede do retículo, o órgão foi cortado em anéis de mesma espessuras e em seguida foi colocado sobre esses anéis um sistema de pontos, baseado nos princípios geométricos de Archimedes e de Cavalieri (MAYHEW; OLSEN, 1991). Em seguida, foi realizada a contagem de pontos que tocavam a parede do retículo (Figura 4).

A seguinte fórmula foi empregada para esta estimativa:

$$V := \sum p. (a/p). \bar{t}$$

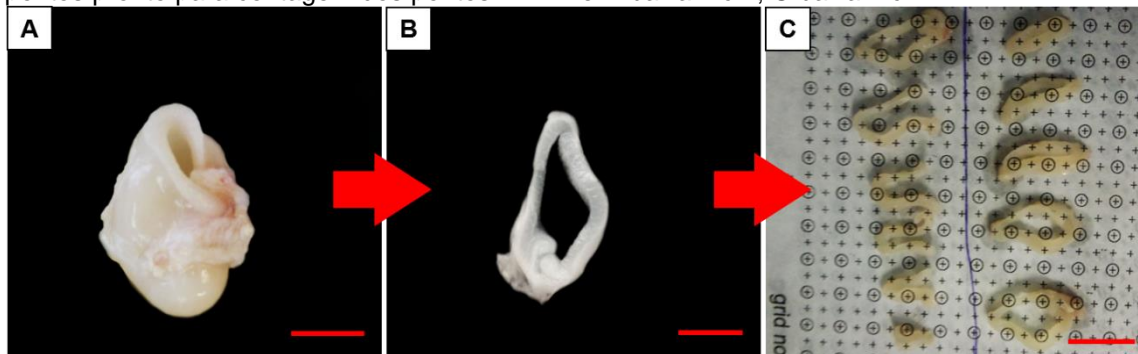
Onde:

$\sum p$ = somatória de pontos na parede do órgão;

a/p = área associada a cada ponto;

\bar{t} = espessura do anel.

Figura 4 – Etapas para contagem de pontos para estimar o volume da parede do retículo de fetos 150 dias através do método de Cavalieri. Em **A** retículo inteiro. **B** cortes em anéis para contagem de pontos da parede e do lúmen do órgão. **C** Fotomicrografia do órgão inteiro fragmentado em anéis e sistema de pontos pronto para contagem dos pontos. Em **A** e **B** barra: 1cm; **C** barra: 2cm



4.3 Histologia - Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

Parte do material coletado foi conservado em solução fixadora de formol 10% com tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico e dibásico anidro) 7,2 pH 0,1M. Em seguida, foi realizado procedimento de desidratação em sequência crescente de etanol (70%, 90% e absoluto) e diafanização do tecido foi realizada com xilol (etanol/xilol, xilol I e II), na sequência o material foi incluído em parafina. Os cortes teciduais (5 μ m) foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%), e por fim H₂O. Em seguida, foi realizada a coloração com hematoxilina por 3 minutos, seguida de lavagem em água corrente durante 5 minutos. Então, foi realizada a coloração com eosina durante 7 minutos, seguida pela desidratação dos cortes em ordem crescente de etanol e montagem das lâminas com lamínula e solução selante *Permount*®.

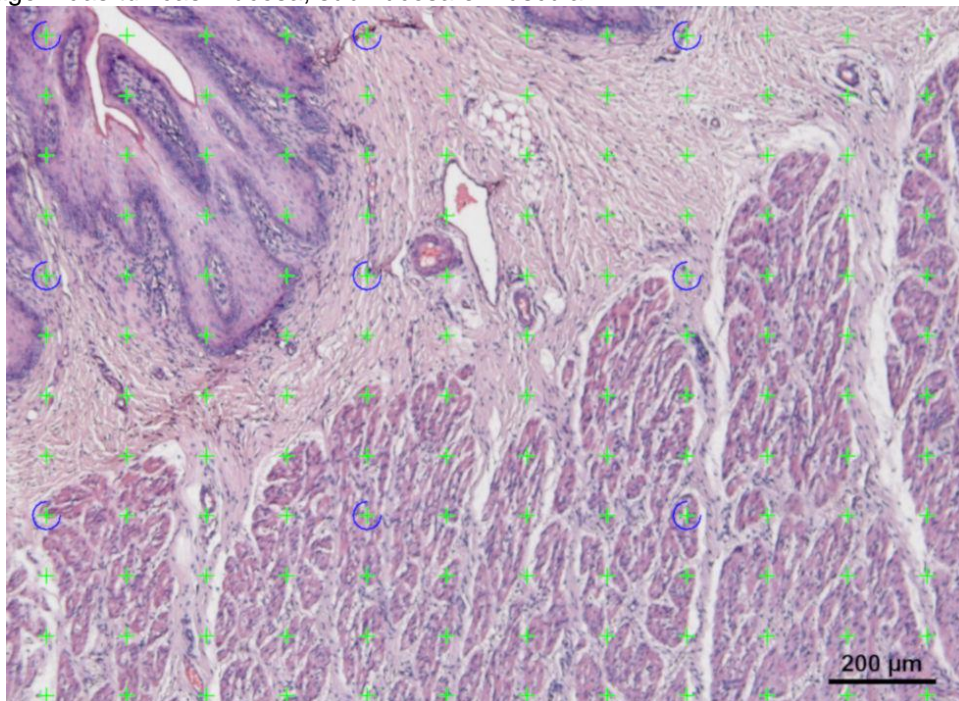
4.4 Densidade De Volume (V_v) Das Túnicas Muscular (V_{vmus}), Submucosa (V_{vsub}) E Mucosa (V_{vmuc})

A densidade de volume (V_v), ou proporção de volume, refere-se à fração de volume ocupada pelas túnicas nos respectivos espaços referência, que é, neste caso, o volume da parede do retículo dorsal e ventral. Para a estimativa de V_v um sistema teste foi sobreposto sobre o espaço referência. Serão contados o número total de pontos sobre a região de interesse (túnicas) (P_{int}) e o número total de pontos sobre o espaço referência (P_{ref}) (MUNIZ *et al.*, 2013; NYENGAARD; ALWASEL, 2014). A seguinte equação será utilizada:

$$V_{V_{Túnica}} := \frac{\sum P_{int}}{\sum P_{ref}}$$

Para realização da contagem das camadas, foi utilizado o software Visiopharm Integrator Systems (VIS) juntamente com a câmera Olympus (modelo DP72, Olympus Corporation, Japão) e microscópio Leica (modelo DM6000B, Leica Microsystems CMS GmbH, Alemanha), no software foi colado o sistema de pontos sobre o tecido para realização da contagem dos pontos que tocam as camadas mucosa, submucosa e muscular como pode ser visto na figura 5.

Figura 5 – Fotografia do corte histológico corado com hematoxilina e eosina com o sistema de pontos para contagem das tûnicas mucosa, submucosa e muscular.



4.5 Imuno-histoquímica e quantificação do índice de proliferação celular pelo Ki67 e de índice de apoptose pela Caspase-3

Parte do material coletado foi conservado em fixador Metacarn (70% metanol, 20% clorofórmio e 10% ácido acético glacial), permanecendo nele por oito horas. Em seguida, o Metacarn foi substituído por etanol a 95% para conservação. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas nos quatro grupos de diferentes idades, sendo eles, 5 fetos com 110 dias gestacionais, 5 fetos com 150 dias gestacionais, 5 bezerras recém-nascidos e 5 bovinos adultos.

Após a inclusão do material em parafina, como realizado rotineiramente para histologia, foram feitos os cortes histológicos (5 μ m), os cortes foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%) e colocados em tampão citrato em pH 6,0 1M por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato em panela de pressão (aproximadamente 100°C) durante 5 minutos, permanecendo em temperatura ambiente por 30 minutos para resfriarem. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma cuba com peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente. Para redução das ligações inespecíficas, as lâminas foram lavadas com PBS 1M + Tween 20 a 0,05% (PBS-Tween 20), seguida de incubação com solução bloqueadora de proteínas (DAKO®, Califórnia, EUA) por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as secções foram incubadas por 18 horas a 4°C com anticorpos anti-Ki67 (Abcam®, Cambridge, Reino Unido) ou anti-Caspase-3 (Abcam®, Cambridge, Reino Unido) (Tabela 3). Em seguida foi aplicado o kit Envision (DAKO®, Califórnia, EUA) de polímero marcado com enzima Horseradish Peroxidase (HRP) conjugado com IgG de caprino anti-camundongo e anti-coelho (Tabela 3) por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida e, por 15 minutos, à temperatura ambiente em câmara úmida. A reação foi revelada por incubação com diaminobenzidina (DAB) (DAKO®, Califórnia, EUA) diluído 1:50 em solução tampão HCl-Imidazol (DAKO®, Califórnia, EUA) contendo peróxido de hidrogênio em pH 7,5 por 1 minuto. Após lavagem, realizou-se a coloração de fundo com hematoxilina durante 30 segundos, lavadas em água corrente durante 5 minutos, novamente desidratadas em ordem crescente de etanol e montadas com solução selante Permount® e lamínula. Os mesmos

procedimentos foram realizados simultaneamente em cortes histológicos de tecidos controles indicados na tabela 3.

Após a realização das reações imuno-histoquímicas, os cortes foram inteiramente fotografados com a câmera AxioCam HRc Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha) acoplada ao microscópio Olympus BX60F5 (Olympus Optical Co., Ltd., Japão).

Para a realização da contagem foi colocado um frame quadriculado de 12 cm x 12 cm no centro da fotomicrografia para realização da quantificação das 500 células marcadas ou não marcadas pelos anticorpos Ki67 e caspase-3 clivada. O software utilizado para captura e quantificação foi o Zen Blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha),

Para análise estatística foi usado a média das porcentagens de células marcadas e não marcadas, e os testes aplicados foram one-way ANOVA para os marcadores individuais e para comparação entre os marcadores entre os grupos de animais o two-way ANOVA.

Tabela 3 – Anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica no epitélio reticular.

ANTICORPO	DESCRIÇÃO	EMPRESA	CONTROLE POSITIVO	APLICAÇÃO (CONCENTRAÇÃO)	ALVO
Anti-Ki67	Policlonal Coelho	Abcam (ab15580)	Intestino de cão; baço de camundongo	1:500	Ki67 Nuclear
Anti-Caspase -3	Policlonal Coelho	Imuny (IM-0035)	Linfonodo de ratos; baço de camundongo	1:500	Caspase -3 Citoplas ma
Goat anti-mouse e anti-rabbit	Polímero com peroxidase ligados a anticorpos policlonais Camundongo e coelho	Dako (K4061)	----- -	Pronto para uso	IgG de caprino anti- camundo ngo e anti- coelho

4.6 Imunofluorescência

4.6.1 Imuno-Histoquímica de Fluorescência de Alta Sensibilidade (Tiramida-Fluoresceína)

Parte do material coletado foi conservado em Metacarn, permanecendo nele por oito horas. Após a inclusão do material em parafina e realizados os cortes histológicos (5µm), os cortes foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%) e colocados em tampão citrato por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato em panela de pressão (aproximadamente 100°C) durante 5 minutos, permanecendo em temperatura ambiente por 30 minutos para resfriarem. Elas foram, então, incubadas em solução tampão de bloqueio TNB por 30 minutos. Na sequência, foram incubadas com os anticorpos contra as proteínas de interesse (Conexinas 26, 32, 40, 43, E-caderina, α e β -cateninas) (Tabelas 4) durante 18 horas (*overnight*) a 4°C. Após este período, foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em tampão TNT sob agitação. Sequencialmente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (produzido em suíno) ou anti-camundongo (produzido em cabra) (Tabela 4), por uma hora em câmara úmida, e as lâminas foram lavadas novamente por 3 vezes (5 minutos cada) com tampão TNT sob agitação.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com Estreptavidina-Peroxidase (kit TSA™ - Fluorescein System, NEL701A001KT, Perkin Elmer, EUA) diluída na concentração [1:200] em tampão TNT, por 30 minutos em câmara escura. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em tampão TNT 3 vezes de 5 minutos cada, sendo então, incubadas com Tiramida-Fluoresceína diluída na concentração [1:200] por 10 minutos em câmara úmida. Após 3 lavagens de 5 minutos cada em tampão TNT, foram incubadas em Iodeto de Propídio diluído na concentração [1:100] por 10 minutos, sendo em seguida montadas com lamínula e Prolong Antifade®.

As análises foram realizadas utilizando-se o microscópio Olympus BX60F5 (Olympus Optical Co., Ltd., Japão), a câmera AxioCam HRc Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha) e o programa Zen Blue Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha).

Tabela 4 – Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica de fluorescência de alta sensibilidade no epitélio reticular.

ANTICORPO	DESCRIÇÃO	EMPRESA	CONTROLE POSITIVO	APLICAÇÃO (CONCENTRAÇÃO)	ALVO
Anti-Conexina 26 (Anti-GJB2)	Policlonal Coelho	Abcam (ab65969)	Fígado de rato	1:300	Membrana celular (junção gap - Conexina 26)
Anti-Conexina 32 (Anti-GJB1)	Policlonal Coelho	Abcam (ab66613)	Intestino humano; fígado	1:300	Membrana celular (junção gap - Conexina 32)
Anti-Conexina 40 (Anti-GJA5)	Policlonal Coelho	Abcam (ab38580)	Placenta; fígado	1:200	Membrana celular (junção gap - Conexina 40)
Anti-Conexina 43 (Anti-GJA1 [CXN-6])	Monoclonal Camundongo	Abcam (ab11369)	Coração	1:200	Membrana celular (junção gap - Conexina 43)
E-Caderina	Policlonal Coelho	Novus Biological (NBP2-16258)	Coração	1:100 a 1:1000	Membrana celular (junção celular)
Alfa-Catenina	Policlonal Coelho	Abcam (ab6299)	Fígado	1:2000	Membrana Celular/Citoplasma
Beta-Catenina	Monoclonal Coelho	Abcam (ab32572)	Pâncreas; Fígado	1:200	Membrana Celular/Citoplasma
Anticorpo Secundário Biotinilado Cabra anti-camundongo	Policlonal Camundongo	Abcam (ab97021)	-----	1:200 a 1:5000	IgG de camundongo
Anticorpo Secundário Biotinilado Suíno anti-coelho	Policlonal Coelho	Dako (E0353)	-----	1:300 a 1:4000	IgG de coelho

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística entre os grupos foi feita avaliação dos dados quanto à sua normalidade e variâncias para a escolha adequada do teste a ser realizado. Para distribuição normal e variâncias iguais foi aplicado o teste paramétrico One-way ANOVA para as mesmas os diferentes grupos e o Two-way ANOVA para o mesmo grupo para analisar as diferentes regiões, quando One-way ANOVA pós-teste Tukey's e quando Two-way pós-teste ANOVA Sidak's. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism®, sendo consideradas diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Volume da parede reticular pelo princípio de Cavalieri

O volume (cm³) da parede e lúmen do retículo foi estimado através do princípio de Cavalieri e durante o processo de quantificação foi possível notar que o volume da parede reticular aumentou de forma gradativa ao longo do seu desenvolvimento durante o período fetal até os bovinos adultos (tabela 5).

Ao realizar a comparação entre os volumes das camadas teciduais da parede reticular foi possível observar na tabela 5 e figura 6 o aumento crescente do volume da parede reticular de fetos 110 dias até o bovino adulto, observa-se a diferença estatística entre todas as idades, onde $p < 0,0001$.

É importante ressaltar a diferença entre os volumes da parede reticular dos animais, através do cálculo do volume da parede de uma idade em relação ao volume da parede reticular da anterior, vimos que o volume da parede reticular no feto de 150 dias é 4,3 vezes maior que no feto de 110 dias gestacionais, no bezerro recém-nascido é 9,19 vezes maior que no feto de 150 dias e no bovino adulto é 37,2 vezes maior que nos bezerros recém-nascidos (tabela 5, figura 6 e 7).

Quando observado o volume da parede reticular em relação ao volume total (volume da parede reticular + volume do lúmen), esta proporção foi semelhante ao longo do desenvolvimento do órgão no animal até a fase adulta, não diferindo estatisticamente (figura 8).

Tabela 5 – Quantificação do aumento de volume (cm^3) da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos. Médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam médias diferentes ($p < 0,0001$), onde há semelhança, não são atribuídas letras. Notar a aceleração do aumento de volume da parede do retículo entre os fetos de 150 dias e os bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias). Observar que a proporção entre o volume da parede reticular e o volume total do órgão foi estatisticamente semelhante ao longo do desenvolvimento até a fase adulta. Para estatística foi aplicado one-way ANOVA e pós-teste Tukey, onde $p < 0,05$ foi adotado para significância. O número de animais utilizados foi de 5 por grupo.

Parede reticular	Fetos 110 dias	Fetos 150 dias	Bezerros recém-nascidos (275 dias)	Bovinos adultos
Volume da PR (cm^3) N= 5	0,6 cm^3 -0,17 (Log_{10}) $\pm 0,05^a$	2,6 cm^3 0,39 (Log_{10}) $\pm 0,50^b$	23,9 cm^3 1,37 (Log_{10}) $\pm 3,20^c$	888,9 cm^3 2,95 (Log_{10}) $\pm 57,69^d$
% de volume em relação ao bovino adulto	0,08%	0,3%	2,7%	100%
Crescimento do órgão em relação a idade anterior	1x	4,3x	9,19x	37,2x
Volume do lúmen	0,36 cm^3 $\pm 0,09$	0,86 cm^3 $\pm 0,24$	8,69 cm^3 $\pm 4,72$	420,48 cm^3 $\pm 147,84$
VTR - % Volume da PR em relação ao total (Parede + Lúmen)	65,91% $\pm 3,96$	74,57% $\pm 2,98$	73,49% $\pm 11,17$	68,46% $\pm 6,07$

Figura 6 – Média do volume (cm^3) da parede reticular (PR). Quando observado todas as idades fetos 110 dias, 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos e bovino adulto, é possível observar diferença estatística entre todas as idades estudadas, onde $p < 0,0001$. Notar aumento volume de maneira crescente de fetos 110 dias gestacionais até bovinos adultos. Para estatística foi aplicado one-way ANOVA e pós-teste Tukey, onde $p < 0,05$ foi adotado para significância. O número de animais utilizados foram 5 por grupo.

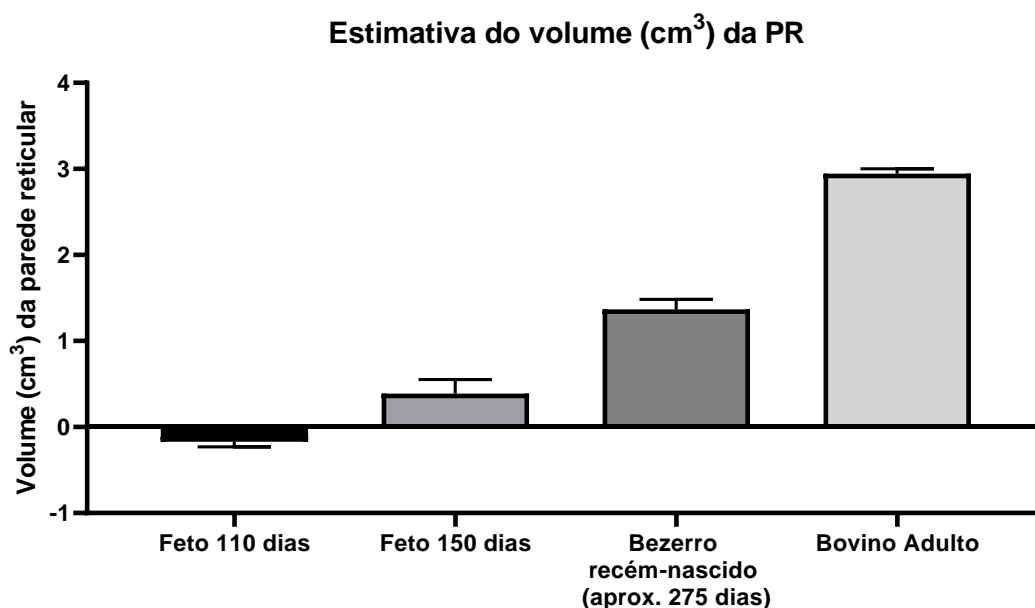


Figura 7 – Percentagem (%) da parede reticular (**PR**) de fetos de 110 dias, 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos em relação ao volume da PR do bovino adulto. Notar a aceleração do aumento de volume da parede do retículo entre os fetos de 150 dias e os bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias).

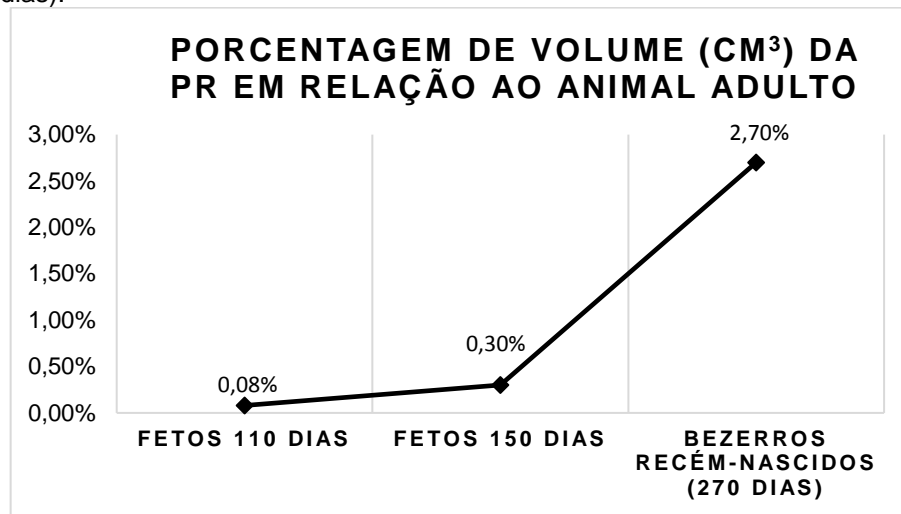
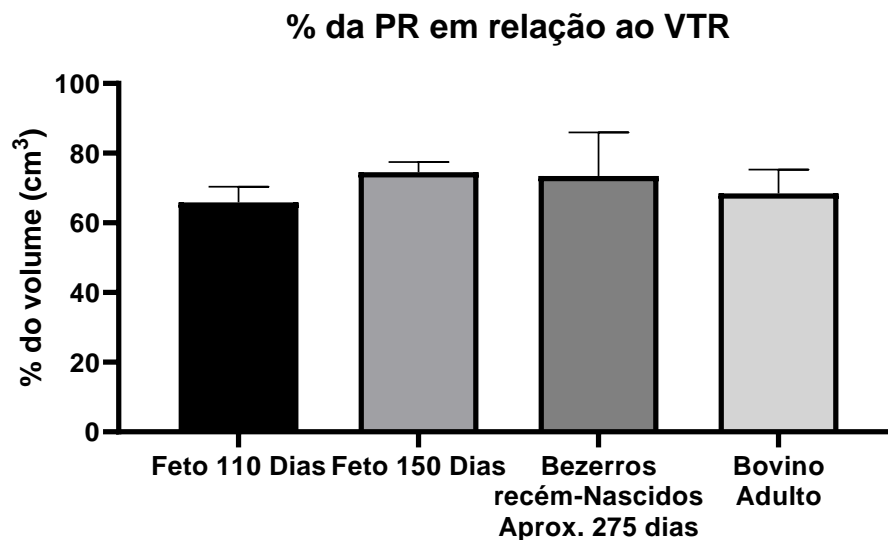


Figura 8 – Percentagem (%) da parede reticular (**PR**) de fetos de 110 dias, 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos e bovino adulto em relação ao volume total do retículo (**VTR**, Volume da parede + lúmen do retículo). Notar que o volume da PR em relação ao VTR foi estatisticamente semelhante ao longo do desenvolvimento até a fase adulta. Para estatística foi aplicado one-way ANOVA e pós-teste Tukey, onde $p < 0,05$ foi adotado para significância. O número de animais utilizados foram 5 por grupo.



5.2 Morfologia reticular por Hematoxila e Eosina (HE)

No presente estudo a coloração de HE foi realizada afim de observar a morfologia tecidual da parede do retículo. Foram observadas alterações morfológicas entre fetos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Dentre essas diferenças, notou-se as túnicas mucosa, submucosa e musculares, como descrito abaixo.

5.2.1 Fetos 110 dias gestacionais

Nos fetos de 110 dias gestacionais ocorreu a primeira observação de um tipo de revestimento epitelial, um epitélio cúbico estratificado que denominamos epitélio transitório, que está presente enquanto as estruturas da parede do retículo (cristas e papilas reticulares) estão em desenvolvimento (fase fetal e pré-ruminante), não havendo sua presença nos bovinos adultos (fase ruminante). Este tecido é espesso, composto de várias camadas de células cúbicas que são bem diferenciadas entre si, formando um gradiente morfológico perceptível da região basal até a região apical. Assim podem ser observadas duas camadas epiteliais bem distintas deste epitélio transitório: A camada basal, composta de 3 a 4 fileiras superpostas de células cúbicas, e a camada transitória. A presença ou não desta camada transitória qualifica o epitélio como transitório ou não. As células dessa camada apresentam forma alongada em quase toda altura do mesmo e, nos estratos mais próximos ao lúmen suas células adquirem aspecto cúbico, as células possuem citoplasma vesiculado. A camada transitória está localizada sobre a camada basal e entre as cristas reticulares em desenvolvimento. As cristas reticulares nessa idade gestacional estão no início do seu desenvolvimento. É possível observar a lâmina própria-submucosa, formada por tecido conjuntivo frouxo, entre a camada basal do epitélio e a camada muscular. Além disso, a camada muscular não apresentou divisões entre longitudinal externa e circular interna (figura 9 A e B).

5.2.2 Fetos 150 dias gestacionais

Nos fetos de 150 dias gestacionais observou-se epitélio transitório espesso, sendo suas células alongadas e vesiculadas. Próximo ao lúmen as células tinham aspecto cuboides, como encontrado nos fetos de 110 dias gestacionais, sendo que a camada transitória é observada acima da camada basal e ao redor das cristas reticulares. Nota-se que há início de ramificações das cristas reticulares, a camada basal é mais delgada que a encontrada nos fetos de 110 dias gestacionais. É possível observar acúmulos de núcleos próximo ao ápice da crista reticular, indicando a formação da musculatura lisa da mucosa. Além disso, é possível observar a camada submucosa, entre a camada basal e a túnica muscular, nesta última observou-se a diferenciação entre as camadas musculares circular interna e longitudinal externa (figura 9 C e D).

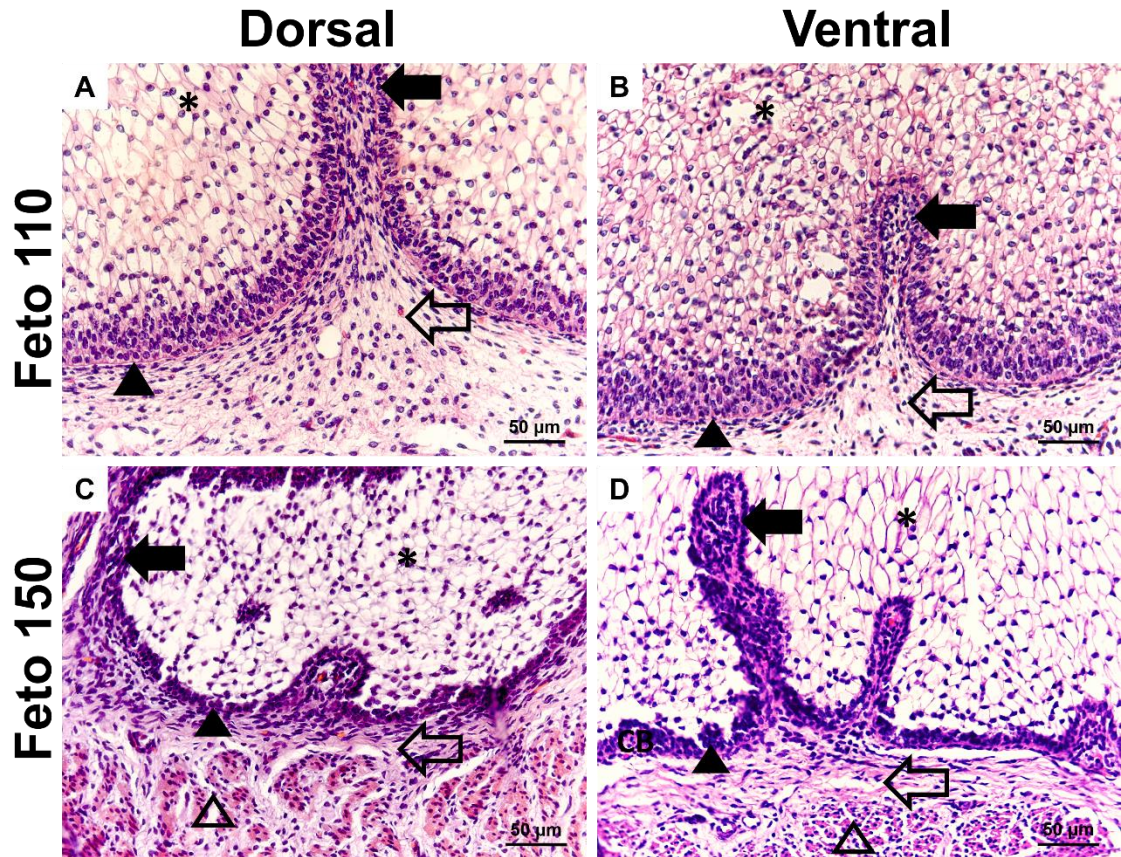
5.2.3 Bezerros recém-nascidos

Nos bezerros recém-nascidos, a camada transitória não era espessa como nos fetos, porém, apresenta-se somente ao redor das cristas reticulares ainda em desenvolvimento. O aspecto celular desse epitélio deixou de ser alongado, para possuir somente células cuboides com vesículas menores. Observou-se possível estratificação do epitélio nas cristas, além do início de queratinização. Foi observada uma única fileira de células na camada basal. Foi possível observar a muscular da mucosa, presente nas extremidades das cristas reticulares. Notou-se túnica submucosa e a túnica muscular, longitudinal externa e circular interna, de espessura variada em todo o tecido (figura 10A e B).

5.2.4 Bovinos adultos

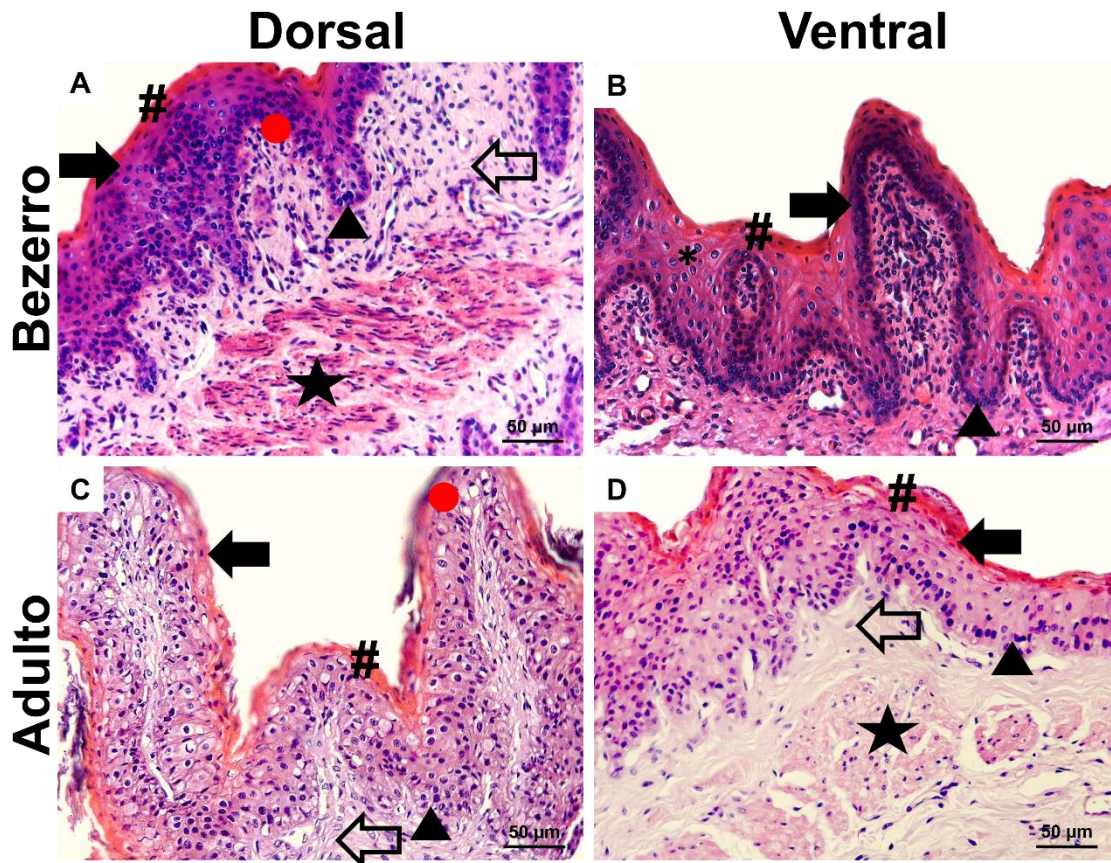
Nos bovinos adultos não havia presença de epitélio transitório, além do tecido epitelial estar completamente formado, sendo do tipo pavimentoso estratificado queratinizado, morfológicamente semelhante à epiderme. Foi possível observar as papilas reticulares que emergem da mucosa na porção lateral. Além disso, a muscular da mucosa estava presente nas extremidades da crista. As túnicas submucosa e muscular apresentaram espessura variado ao longo do tecido (figura 10 C e D).

Figura 9 – Cortes teciduais de retículo bovinos de fetos de 110 dias gestacionais **A** e **B** e fetos de 150 dias gestacionais **C** e **D**. Regiões dorsal **A** e **C** e ventral **B** e **D** em **A** e **B** observou-se a camada transitória bem espessa (*), crista reticular no início do desenvolvimento (**seta**), camada basal (**cabeça de seta**) com 3 ou 4 fileiras, e túnica submucosa (**seta vazada**). Em **C** e **D** notou-se o desenvolvimento das cristas reticulares (**seta**), além da camada muscular circular interna (**cabeça de seta vazada**). Não se notam células musculares lisas no interior das cristas em fetos 110 dias. É possível observar no interior das cristas reticulares em fetos 150 dias, um acúmulo de núcleos, no caso, formação de músculo liso da mucosa reticular. Coloração de hematoxilina-eosina (HE).



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 10 – Cortes teciduais de retículos bovinos de bezerros recém-nascidos **A** e **B** e bovinos adultos **C** e **D**. Regiões dorsal **A** e **C** e ventral (**B** e **D**). Em **A** e **B** é possível observar a presença de queratina (**cerquilha**), redução de espessura da camada transitória (*) e estratificação do epitélio. Nos bezerros recém-nascidos já é possível notar as papilas reticulares (**ponto vermelho**), a camada basal (**cabeça de seta**) com a única fileira celular e na extremidade das cristas reticulares a muscular da mucosa (**estrela**) rodeada por túnica submucosa (**seta vazada**). Em **C** e **D** não há presença de epitélio transitório, há presença de queratina (**cerquilha**) e estratificação do epitélio, as cristas reticulares (**seta**) são repletas de papilas reticulares (**ponto vermelho**). Nota-se também a camada basal (**cabeça de seta**), túnica submucosa (**seta vazada**) e muscular da mucosa (**estrela**). Na figura **10A**, logo abaixo do ponto vermelho, descendo em linha reta, nota-se o início da formação da muscular da mucosa, o que caracteriza esta papila como em estágio de desenvolvimento. Coloração de hematoxilina-eosina (HE).



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.3 Volume das camadas teciduais da parede reticular

Foi quantificado através da técnica estereológica o volume das camadas da parede reticular mucosa, submucosa e camada muscular. Através do volume da parede total quantificado macroscopicamente pela técnica de Cavalieri, foi possível quantificar o volume da parede e as respectivas camadas de maneira microscópica.

Podemos observar na tabela 6, 7, figura 11 e 12 que o volume (cm³) das camadas teciduais do retículo, a mucosa, a submucosa e a muscular aumentaram de maneira significativa e crescente. Houve diferença estatística em todas as idades estudadas: fetos 110, 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos, onde $p < 0,0001$. Quando as regiões dorsal e ventral foram comparadas não vimos diferença estatística tanto nas idades estudadas quanto nas diferentes camadas.

Tabela 6 – Quantificação do volume (cm³) das camadas teciduais da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos. Médias do volume (cm³), médias transformadas em Log₁₀ e \pm desvio padrão e letras diferentes indicam médias diferentes ($p < 0,0001$) quando analisada na mesma região (Ventral x Ventral, ou Dorsal x Dorsal de animais de idade diferente). Para análise entre os grupos de animais foi aplicado one-way ANOVA, pós teste de Tukey, onde $p < 0,05$ indica diferença estatística. Para uma melhor distribuição da estatística, os números absolutos de todos os grupos foram transformados em Log₁₀, com número de 5 animais por grupo.

Camadas teciduais da parede reticular	Feto 110 dias	Feto 150 Dias	Bezerros recém-nascidos	Bovinos adultos
Dorsal				
Mucosa dorsal	0,1cm ³ -1,01 ^a (Log ₁₀) $\pm 0,05$	0,28 cm ³ -0,55 ^b (Log ₁₀) $\pm 0,02$	2,59 cm ³ 0,40 ^c (Log ₁₀) $\pm 0,09$	226,0 cm ³ 2,34 ^d (Log ₁₀) $\pm 0,10$
Submucosa dorsal	0,06cm ³ -1,21 ^a (Log ₁₀) $\pm 0,10$	0,17cm ³ -0,78 ^b (Log ₁₀) $\pm 0,06$	6,87cm ³ 0,83 ^c (Log ₁₀) $\pm 0,07$	252,7cm ³ 2,40 ^d (Log ₁₀) $\pm 0,04$
Muscular Dorsal	0,11cm ³ -0,96 ^a (Log ₁₀) $\pm 0,06$	0,41cm ³ -0,40 ^b (Log ₁₀) $\pm 0,09$	7,33cm ³ 0,85 ^c (Log ₁₀) $\pm 0,10$	383,2cm ³ 2,29 ^d (Log ₁₀) $\pm 0,03$
Ventral				
Mucosa ventral	0,09cm ³ -1,05 ^A (Log ₁₀) $\pm 0,03$	0,28cm ³ -0,56 ^B (Log ₁₀) $\pm 0,04$	3,39cm ³ 0,52 ^C (Log ₁₀) $\pm 0,09$	186,2cm ³ 2,27 ^D (Log ₁₀) $\pm 0,06$
Submucosa ventral	0,06cm ³ -1,23 ^A (Log ₁₀) $\pm 0,01$	0,16cm ³ -0,81 ^B (Log ₁₀) $\pm 0,05$	5,73cm ³ 0,75 ^C (Log ₁₀) $\pm 0,10$	200,1cm ³ 2,29 ^D (Log ₁₀) $\pm 0,09$
Muscular Ventral	0,13cm ³ -0,90 ^A (Log ₁₀) $\pm 0,08$	0,47cm ³ -0,34 ^B (Log ₁₀) $\pm 0,09$	8,33cm ³ 0,91 ^C (Log ₁₀) $\pm 0,10$	429,0cm ³ 2,62 ^D (Log ₁₀) $\pm 0,08$

Figura 11 – Média do volume (cm^3) das camadas teciduais mucosa, submucosa e muscular da parede reticular (PR) nas diferentes idades estudadas pré-ruminante (fetos 110 dias, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos de aproximadamente 275 dias e Bovinos adultos). Em **A**, **B** e **C** pode-se observar que o volume das camadas reticulares mucosa, submucosa e muscular em fetos 110, 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos foram diferentes estatisticamente entre todas as idades. Em todas as idades e todas as camadas não houve diferença estatística entre as regiões dorsal e ventral. Para análise estatística entre as idades em relação as camadas, foi aplicado one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey onde $p < 0,05$. Para as regiões dorsal e ventral da mesma idade foi aplicado o two-way ANOVA, onde ns (não significativo) indica o resultado da comparação entre elas, o gráfico mostra a média e o desvio padrão. Para uma melhor distribuição da estatística, os números absolutos de todos os grupos foram transformados em Log_{10} , com número de 5 animais por grupo. Como todas as médias foram diferentes em si não foram atribuídas letras.

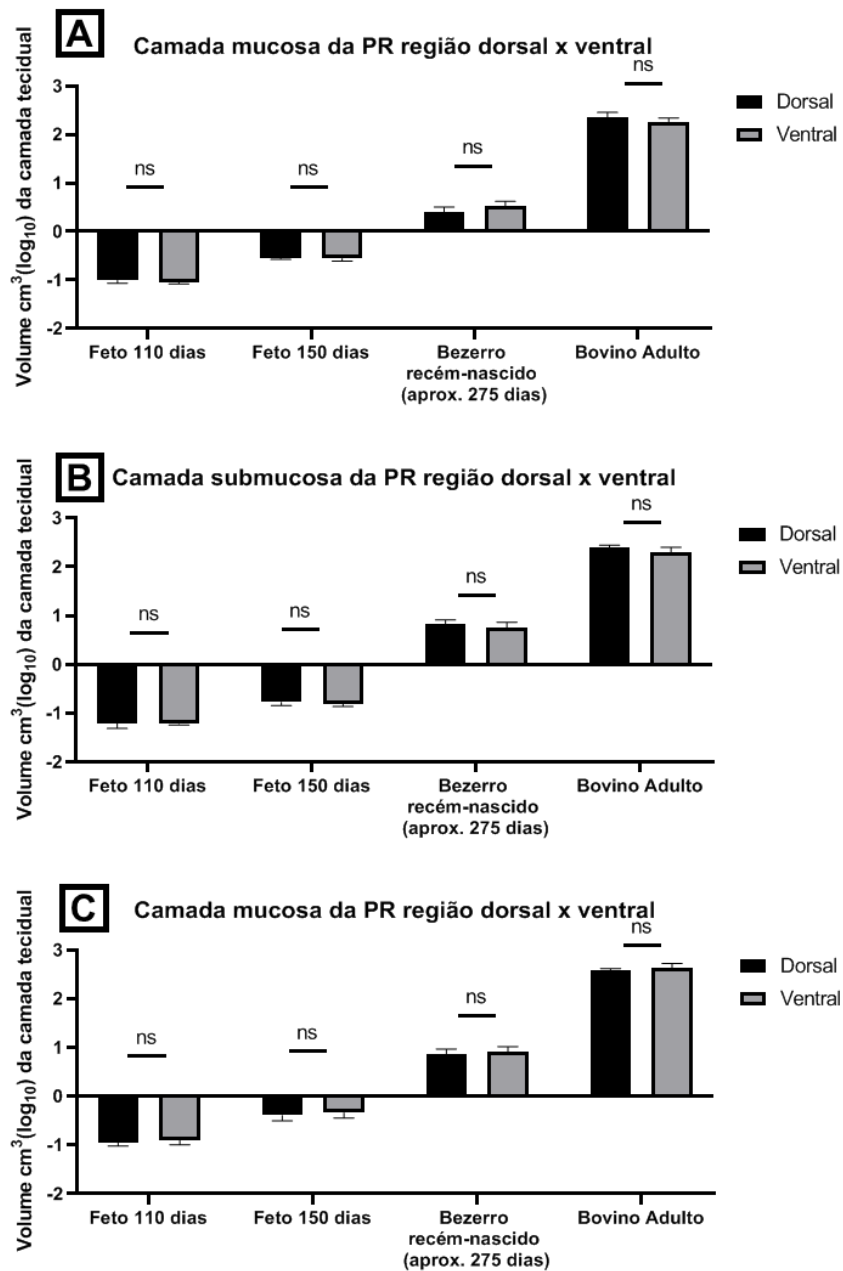
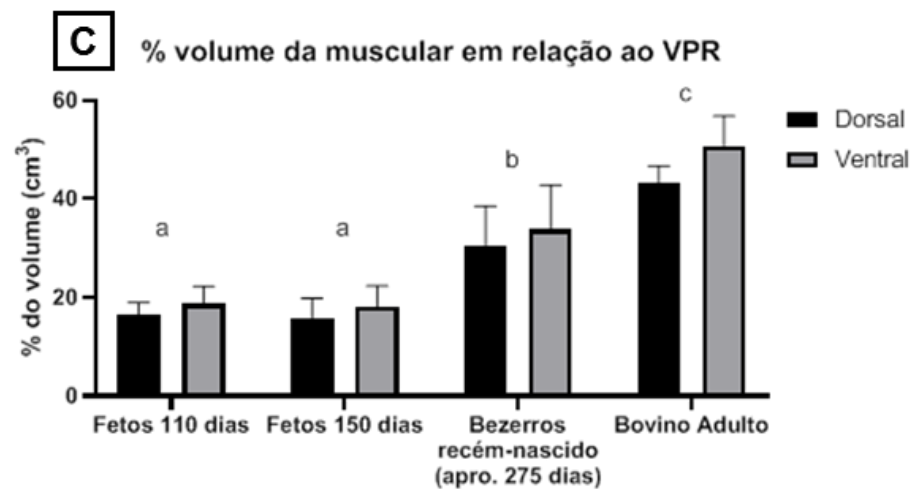
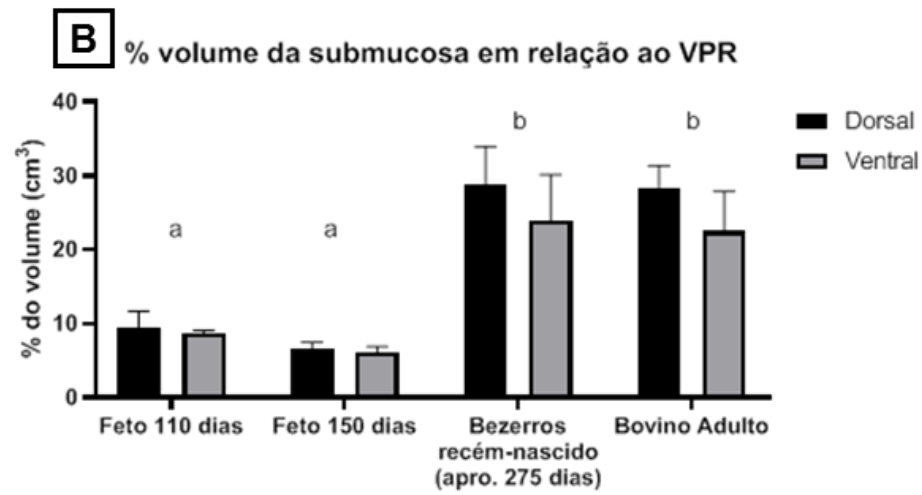
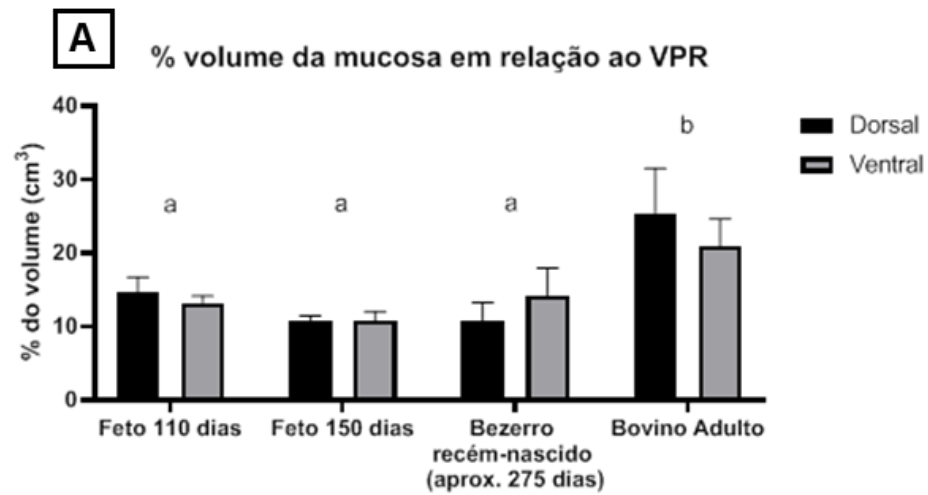


Tabela 7 – Porcentagem (%) do volume (cm³) de cada camada tecidual (mucosa, submucosa e camada muscular) em relação ao volume total da parede reticular dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e bovinos adultos. Médias em porcentagem (%) ± desvio padrão. Observar que as camadas que mais contribuem para o aumento do volume da parede reticular são a submucosa e a camada muscular, e a que menos contribui é a camada mucosa. Para análise entre os grupos de animais foi aplicado one-way ANOVA, pós teste de Tukey, onde $p < 0,05$ indica diferença estatística.

Camadas teciduais	Feto 110 dias	Feto 150 dias	Bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias)	Bovino Adulto
Dorsal				
Mucosa dorsal/VPR	14,65% ±1,86 ^a	10,88% ±0,48 ^a	10,84% ±2,20 ^a	25,43% ±5,25 ^b
Submucosa dorsal/VPR	9,40% ±2,06 ^a	6,51% ±0,81 ^a	28,72% ±4,69 ^b	28,43% ±2,56 ^b
Muscular dorsal/VPR	16,43% ±2,26 ^a	15,91% ±3,44 ^a	30,64% ±7,05 ^b	43,11% ±3,12 ^c
Ventral				
Mucosa ventral/VPR	13,22% ± 0,8 ^a	10,78% ±1,08 ^a	14,17% ±3,37 ^a	20,95% ±3,18 ^b
Submucosa ventral/VPR	8,76% ±0,29 ^a	6,08% ±0,69 ^a	23,95% ±5,54 ^b	22,51% ±4,69 ^b
Muscular ventral/VPR	18,66% ±3,08 ^a	18,15% ±3,16 ^a	34,80% ±7,18 ^b	48,26% ±8,69 ^c

Figura 12 – Porcentagem (%) do volume (cm³) de cada camada tecidual (mucosa, submucosa e camada muscular) em relação ao volume total da parede reticular (VPR) dos fetos de 110 dias gestacionais, fetos 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias). Em **A** observa-se a porcentagem (%) do volume (cm³) da mucosa em relação a parede reticular nas diferentes idades. Notar o bovino adulto. Em **B** observa-se a porcentagem (%) do volume (cm³) da submucosa em relação a parede reticular nas diferentes idades. Notar a diferença entre fetos, bezerros e bovinos adultos. E em **C** observa-se a porcentagem (%) do volume (cm³) da muscular em relação a parede reticular nas diferentes idades. Notar o aumento crescente da camada muscular ao longo do desenvolvimento. Observar que a camadas que mais contribuem para o aumento do volume da parede reticular são a submucosa e a camada muscular, e a que menos contribui é a camada mucosa. Para análise entre os grupos de animais foi aplicado one-way ANOVA, pós teste de Tukey, onde $p < 0,05$ indica diferença estatística. Para análise das regiões entre cada idade foi usado o two-way ANOVA com pós-teste Sidak, não houve diferença estatística entre as regiões dorsal e ventral em nenhuma das idades, onde $p > 0,05$.



5.4 Quantificação do Índice de proliferação (IPC) e de apoptose (IA)

A quantificação celular foi realizada a partir da marcação nuclear positiva com anticorpos para atividade celular proliferativa (anti-ki67) e marcação citoplasmática positiva para atividade celular apoptótica (anti-caspase-3) na camada basal do epitélio das diferentes idades estudadas (fetos de 110 e 150 dias gestacionais, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos).

5.4.1 Anti-Ki67

Na quantificação de células positivas para Ki67, indicando o índice de proliferação celular observou-se maior proliferação nos fetos de 110 dias gestacionais comparado as outras idades amostradas, tanto na região dorsal quanto ventral.

Quando observada a região dorsal dos fetos de 150 dias, o índice diminui significativamente e se mantém baixo nos bezerros e adultos, mesmo não havendo diferença estatística entre os fetos de 150 dias gestacionais, bezerros e adultos, há valores absolutos nos animais adultos maiores em relação aos fetos de 150 dias e bezerros, havendo tendência para um aumento progressivo (Tabela 8 e figura 13).

Em relação a região ventral dos fetos de 150 dias gestacionais, o índice de proliferação abaixa significativamente também, e se mantém baixo nos bezerros, não havendo diferença estatística (Tabela 8 e figura 13).

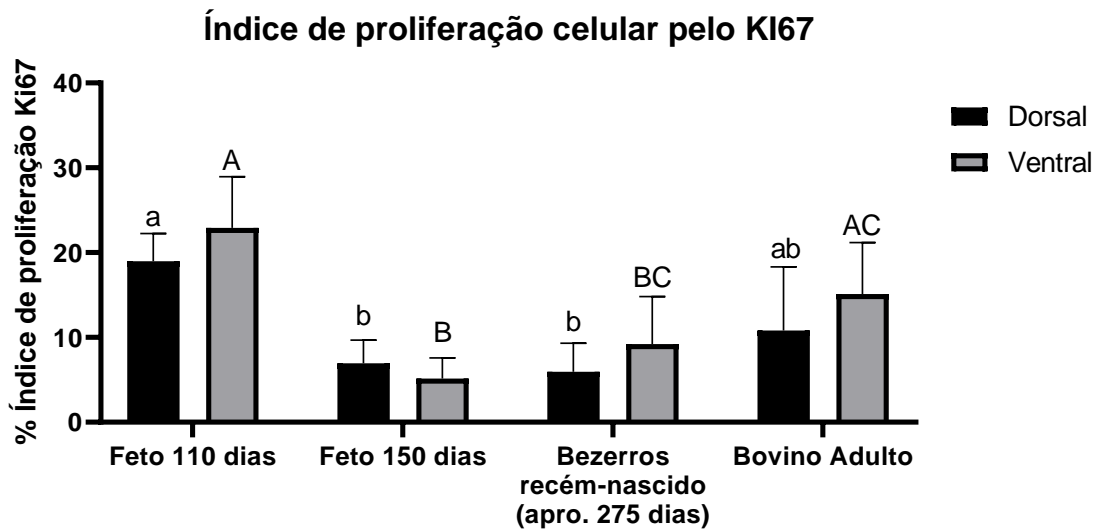
Quando observado os animais adultos em comparação aos fetos de 150 dias gestacionais houve um aumento significativo. Quando comparado os animais adultos com fetos de 110 dias gestacionais e bezerros não há diferença estatística (Tabela 8 e figura 13).

Em relação aos números absolutos para região ventral, os fetos de 110 dias gestacionais têm maior índice de proliferação, baixando o nível do índice de proliferação celular significativamente nos fetos de 150 dias gestacionais e uma tendência de aumento progressivo em bezerros e adultos. Quando comparado as regiões dorsal e ventral não observou diferença estatística em nenhuma idade em relação a proliferação celular (Tabela 8 e figura 13).

Tabela 8 – Valores com as médias da porcentagem (%) do índice de proliferação celular da camada basal do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo), através da marcação por ki67. Na tabela podemos ver as médias e o desvio padrão. As letras indicam a diferença estatística ($p < 0,05$). Letras minúsculas one-way ANOVA para região dorsal, letras maiúsculas one-way ANOVA para região ventral. Letras iguais nas linhas indicam que não há diferença entre as médias. Tukey foi aplicado como pós-teste na análise estatística. Notar a que o maior índice proliferativo se deu no grupo de fetos de 110 dias, e houve um aumento gradativo até o bovino adulto tanto na região dorsal quanto ventral.

IPC pelo Ki67	Fetos 110 dias	Fetos 150 dias	Bezerros recém-nascidos (275 dias)	Bovinos adultos
Retículo Dorsal	18,99% ± 3,26 ^a	6,95% ± 2,74 ^b	5,96% ± 3,35 ^b	10,81% ± 7,51 ^{ab}
Retículo Ventral	22,91% ± 6,04 ^A	5,13% ± 2,43 ^B	9,20% ± 5,61 ^{BC}	15,12% ± 6,07 ^{AC}

Figura 13 – Quantificação do índice de proliferação celular (IPC) pelo Ki67 nos cortes teciduais de retículos fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo). As letras indicam a diferença estatística ($p < 0,05$). Letras minúsculas one-way ANOVA para região dorsal, letras maiúsculas one-way ANOVA para região ventral, o pós-teste Tukey foi utilizado. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença entre as médias. Para as regiões dorsal e ventral da mesma idade foi aplicado o two-way ANOVA e pós-teste Sidak, onde não houve diferença significativa em nenhum grupo. Em cada animal é indicado o desvio padrão da média. Notar que o maior índice proliferativo se deu no grupo de fetos de 110 dias, e houve um aumento gradativo até o bovino adulto tanto na região dorsal quanto ventral.



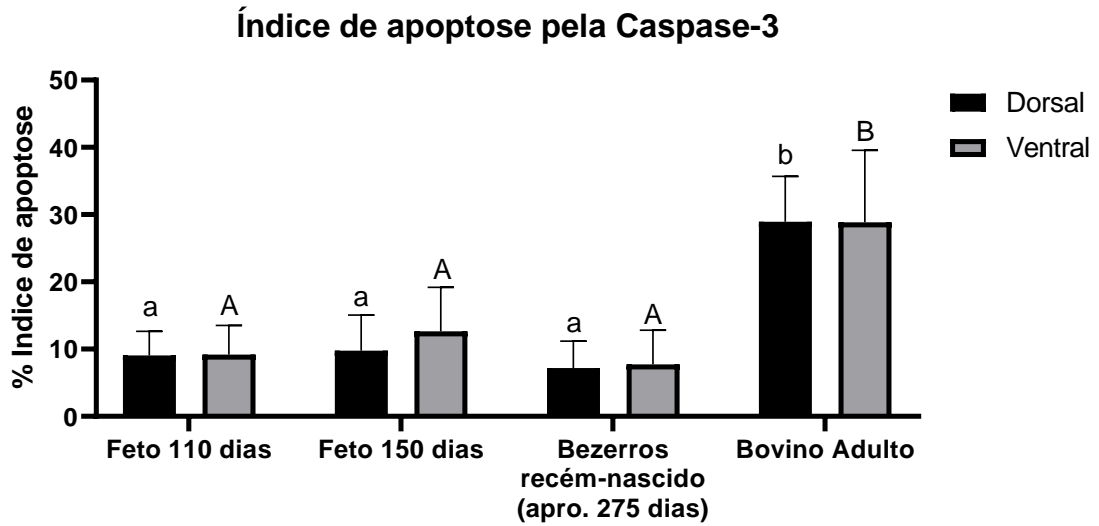
5.4.2 Anti-Caspase-3 clivada

Na tabela 9 e figura 14 observou-se o índice de apoptose nas diferentes idades estudadas, nos fetos e bezerros o índice se manteve baixo em relação aos animais adultos e não houve diferença estatística entre eles, e quando comparadas as regiões dorsal e ventral, também não resultou diferença estatística. Em relação ao animal adulto, observou-se que o índice aumentou de maneira significativa, mas entre as regiões dorsal e ventral também não houve diferença.

Tabela 9 – Valores com as médias da porcentagem (%) e desvio padrão da média do índice de apoptose (**IA**) da camada basal do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo), através da marcação por caspase-3. Na tabela podemos ver as médias e o desvio padrão. As letras indicam a diferença estatística ($p < 0,05$). Letras minúsculas one-way ANOVA para região dorsal, letras maiúsculas one-way ANOVA para região ventral. Letras iguais nas linhas indicam que não há diferença entre as médias, o pós-teste Tukey foi aplicado para one-way ANOVA. Notar o aumento significativo no índice de apoptose nos animais adultos.

IA pela caspase-3	Fetos 110 dias	Fetos 150 dias	Bezerros recém-nascidos (275 dias)	Bovinos adultos
Retículo Dorsal	9,06% ±3,59 ^a	9,79% ±5,26 ^a	7,17% ±3,99 ^a	28,92% ±6,77 ^b
Retículo Ventral	9,20% ±4,3 ^A	12,65% ±6,51 ^A	7,72% ±5,07 ^A	28,85% ±10,69 ^B

Figura 14 – Quantificação da reação imuno-histoquímica de Caspase-3 nos cortes teciduais de retículos fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos (5 animais por grupo). As letras indicam a diferença estatística ($p < 0,05$). Letras minúsculas one-way ANOVA para região dorsal, letras maiúsculas one-way ANOVA para região ventral. Tukey foi aplicado como pós-teste. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença entre as médias. Para as regiões dorsal e ventral da mesma idade foi aplicado o two-way ANOVA e pós-teste Sidak, onde não houve diferença significativa em nenhum grupo. Em cada animal é indicado o desvio padrão. Notar o aumento significativo no índice de apoptose (IA) nos bovinos adultos.



5.4.3 Proliferação (ki67) x apoptose (caspase-3)

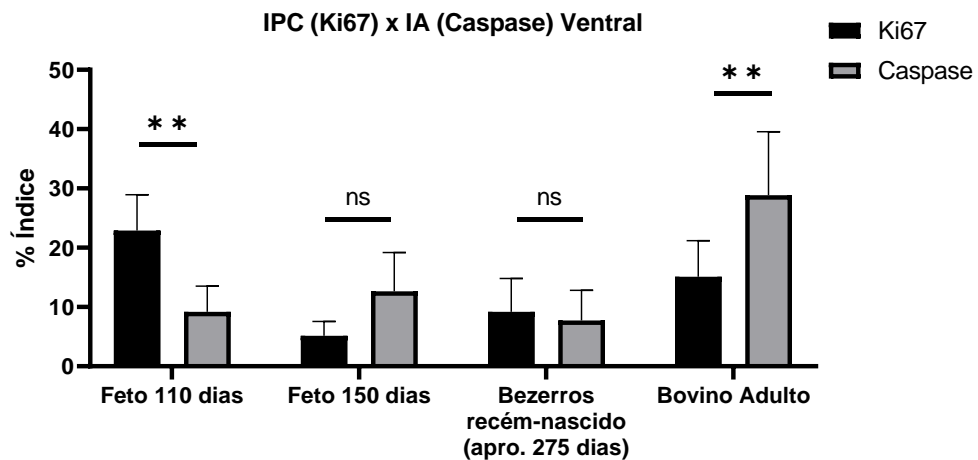
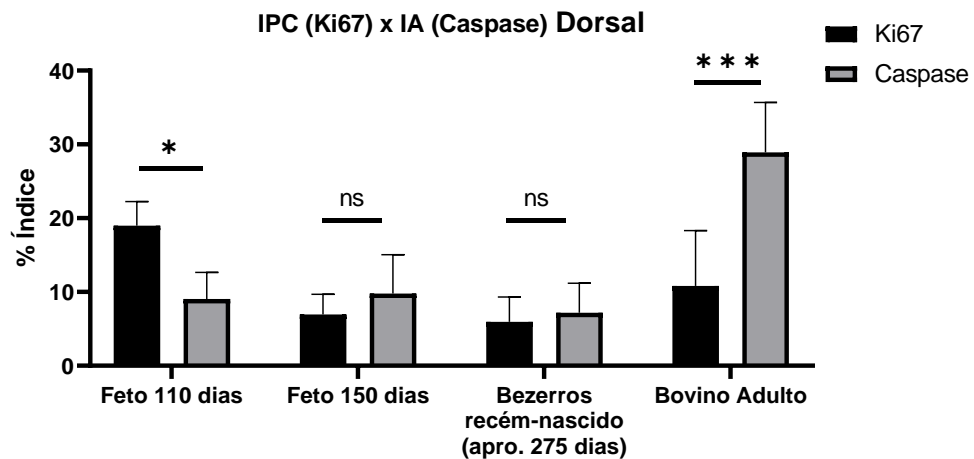
A tabela 10 e figura 15 mostra a comparação de índice de proliferação celular (IPC) e índice de apoptose (IA) por idade estudada, observou-se o índice da região dorsal em **A** e região ventral em **B**. Nos fetos de 110 dias gestacionais o índice de proliferação celular foi mais alto, havendo diferença significativa, onde $p < 0,05$ tanto na região dorsal quanto ventral, o que é coerente com a taxa de crescimento do volume da parede reticular observado entre os fetos de 110 dias e os de 150 dias.

Nos fetos de 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos, o índice de proliferação e apoptose não revelou diferença significativa, tanto na região dorsal quanto ventral. Entretanto, nos bovinos adultos a diferença entre proliferação e apoptose foi significativa, havendo mais apoptose do que proliferação, onde $p < 0,05$ tanto na região dorsal quanto ventral.

Tabela 10 – Valores para comparação entre o índice de proliferação celular (IPC) pelo Ki67 e o índice de apoptose (IA) pela Caspase-3 dos retículos bovinos entre as regiões dorsal e ventral de cada idade, feto 110 dias gestacionais, feto 150 dias gestacionais, bezerro recém-nascido e bovinos adultos (5 animais por grupo). Letras iguais indicam que não há diferença entre as médias. Para as regiões dorsal e ventral da mesma idade foi aplicado o two-way ANOVA e pós-teste Sidak, diferença estatística entre elas ($p < 0,05$) A tabela mostra a porcentagem (%) das médias e o desvio padrão. Notar que o IPC em fetos 110 dias gestacionais teve maior índice, enquanto observou-se o aumento gradativo até o animal adulto, em contrapartida, o IA se manteve baixo nos fetos e bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e um aumento significativo nos bovinos adultos tanto na região dorsal quanto ventral.

IPC pelo Ki67 x IA pela Caspase-3	Fetos 110 dias	Fetos 150 dias	Bezerros recém-nascidos (275 dias)	Bovinos adultos
Índice de proliferação celular (IPC) pelo Ki67				
Retículo Dorsal	18,99% ±3,26 ^a	6,95% ±2,74 ^b	5,96% ±3,35 ^b	10,81% ±7,51 ^{ab}
Retículo Ventral	22,91% ±6,04 ^A	5,13% ±2,43 ^B	9,20% ±5,61 ^{BC}	15,12% ±6,07 ^{AC}
Índice de apoptose (IA) pela caspase-3				
Retículo Dorsal	9,06% ±3,59 ^a	9,79% ±5,26 ^a	7,17% ±3,99 ^a	28,92% ±6,77 ^b
Retículo Ventral	9,20% ±4,3 ^A	12,65% ±6,51 ^A	7,72% ±5,07 ^A	28,85% ±10,69 ^B

Figura 15 – Comparação entre o índice de proliferação celular (**IPC**) pela Ki67 e o índice de apoptose (**IA**) pela Caspase-3 dos retículos bovinos entre as regiões dorsal e ventral de cada idade, feto 110 dias gestacionais, feto 150 dias gestacionais, bezerro recém-nascido e bovinos adultos (5 animais por grupo). Para as regiões dorsal e ventral da mesma idade foi aplicado o two-way ANOVA e pós-teste Sidak, onde ns (não significativo) indica a comparação entre elas, o (*) mostra a diferença estatística entre elas ($p < 0,05$). O gráfico mostra a média e o desvio padrão. Notar que a **IPC** em fetos 110 dias gestacionais teve maior índice, enquanto observou-se o aumento gradativo até o animal adulto, em contrapartida, o **IA** se manteve baixo nos fetos e bezerros recém-nascidos (aprox. 275 dias) e um aumento significativo nos bovinos adultos tanto na região dorsal quanto ventral.



5.5 Estudo de proteínas das junções celulares por imunofluorescência

Como descrito no material e métodos, utilizamos a técnica de imunofluorescência para detectar a presença das proteínas de junção (conexinas) e adesão (caderinas e cateninas) nas diferentes idades estudadas (fetos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos), logo podemos observar tanto a presença tecidual nas diferentes idades gestacionais quanto sua localização.

5.5.1 Conexina 26

5.5.1.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

Através da imunomarcção da proteína Cx26, foi observada a presença tanto na camada basal quanto no epitélio transitório de fetos 110 e 150 dias gestacionais das porções ventral e dorsal (Figuras 16A-D e 17A-D). A localização da Cx26 na camada basal de ambos os fetos (110 e 150 dias gestacionais) foi citoplasmática, enquanto que no epitélio dos mesmos fetos a localização da Cx26 foi na membrana citoplasmática.

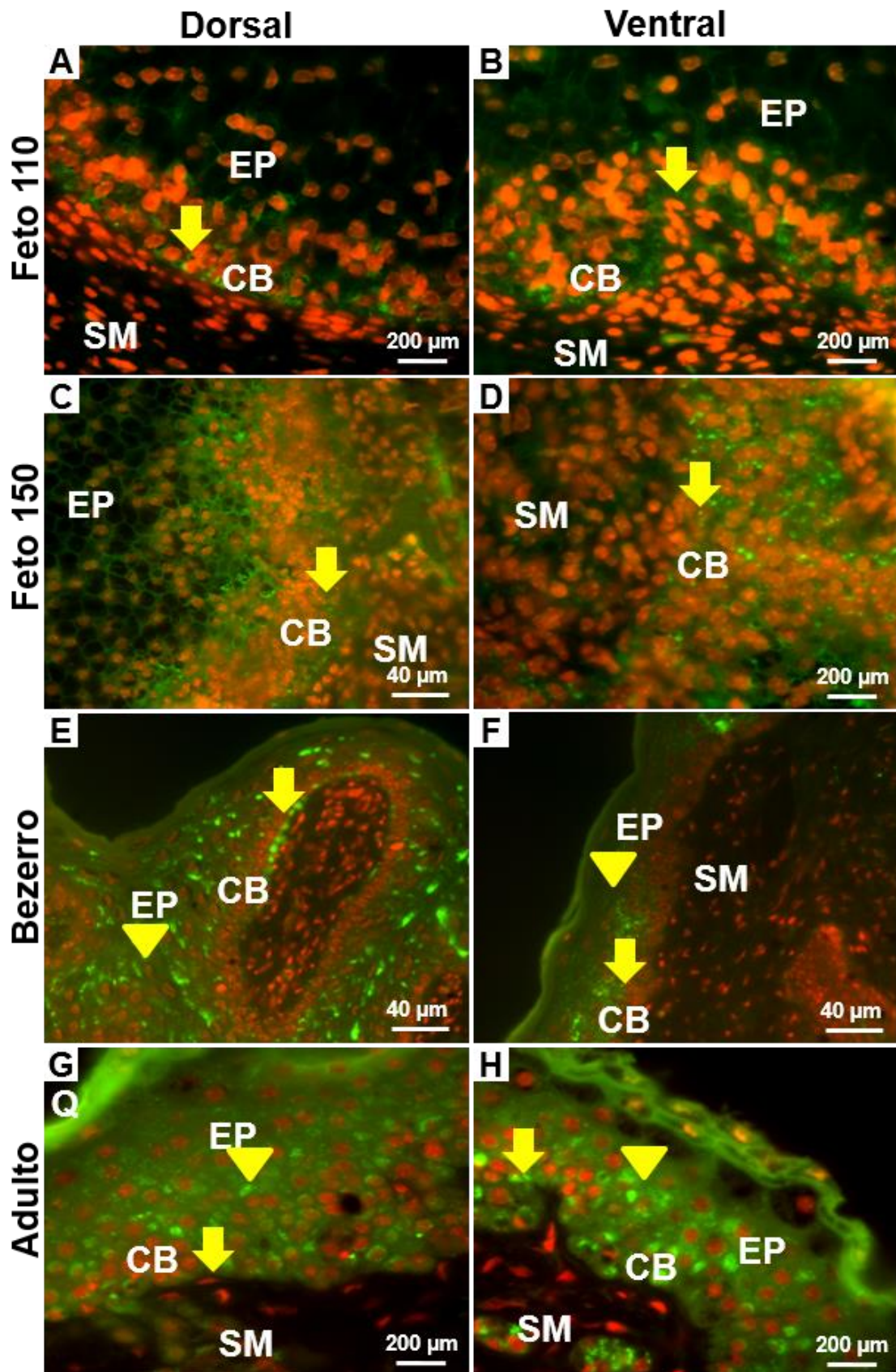
5.5.1.2 – Bezerros recém-nascidos

Nos bezerros a Cx26 também estava presente tanto na camada basal quanto no epitélio e o padrão semelhante de localização como observado nos fetos, quando próximo a camada basal estavam presentes no citoplasma e quanto mais próxima ao lúmen observou-se a presença da proteína tanto no citoplasma quanto na membrana celular. Em relação a porção ventral e dorsal do retículo o padrão de marcação foi mesmo descrito a cima (figura 16E-F e 17E-F).

5.5.1.3 – Bovinos adultos

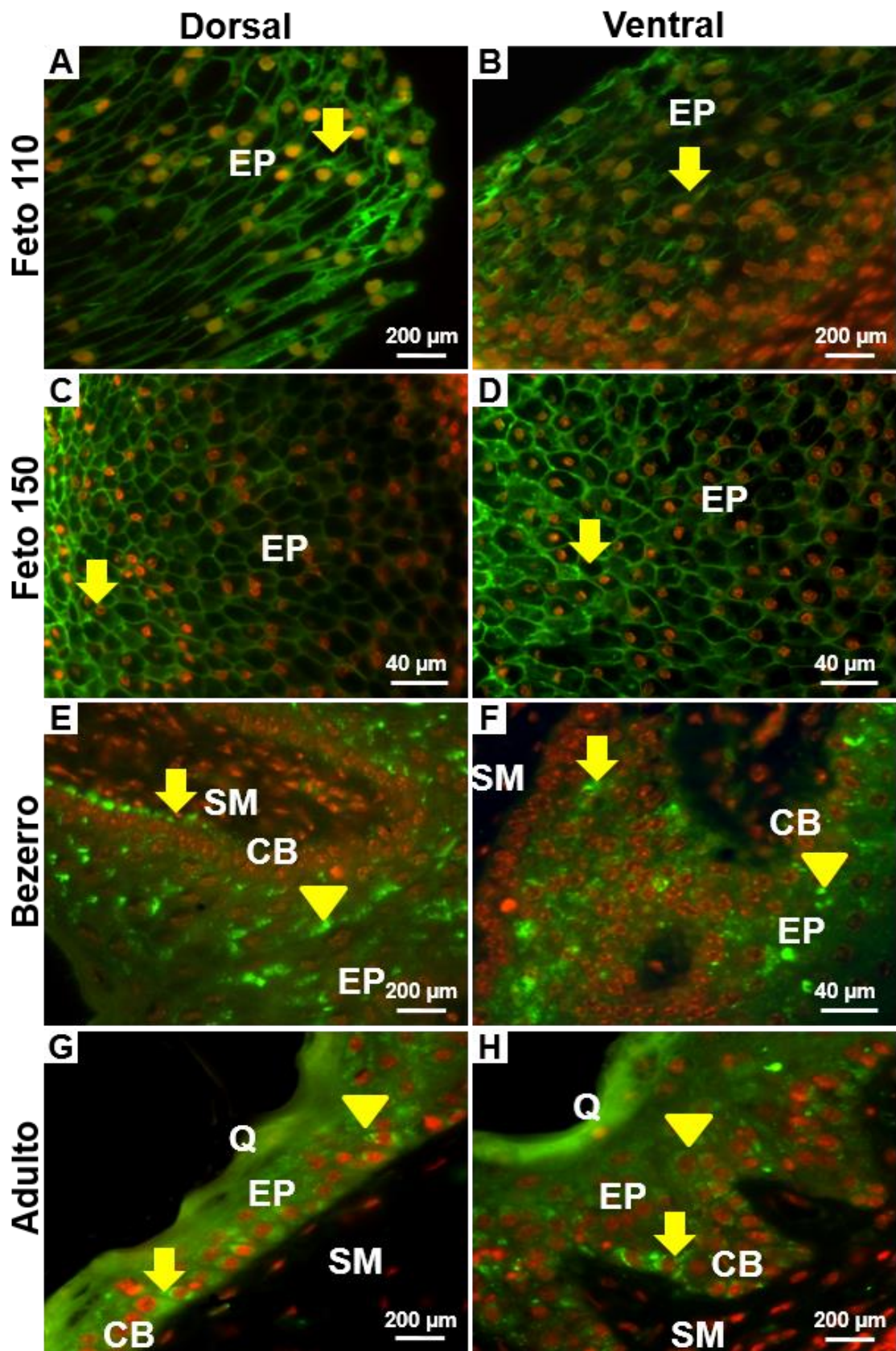
Nos bovinos adultos a Cx26 também foi identificada com marcação citoplasmática na camada basal, mas também podemos observar marcação na membrana celular, e o padrão de marcação no epitélio foi semelhante aos bezerros, onde observamos localização da Cx26 na membrana celular mais próximo ao lúmen, tanto na porção dorsal quanto ventral do retículo (figura 16G-H e 17G-H).

Figura 16 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 26 na camada basal do epitélio reticular. Imagem **16A** porção dorsal e **16B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx26 na camada basal (**seta**) **16C** porção dorsal e **16D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, na camada basal do epitélio reticular (**seta**). Observar que apenas nesta faixa etária as conexinas formam junções puntiformes na região entre as células, nas outras idades apesar de estar presente, sua distribuição aparenta ser apenas intracitoplasmática, mostra também a presença de Cx26 na camada basal. **16E** porção dorsal e **16F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx26 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **16G** porção dorsal e **16H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx26 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa; **Q**: queratina.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 17 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 26 no epitélio reticular. Imagem **17A** porção dorsal e **17B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx26 no epitélio transitório (**seta**). **17C** porção dorsal e **17D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, também mostra a presença de Cx26 no epitélio reticular transitório (**seta**). **17E** porção dorsal e **17F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx26 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **17G** porção dorsal e **17H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx26 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa; **Q**: queratina.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.2 Conexina 32

5.5.2.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

A presença de Cx32 em fetos de 110 e 150 dias gestacionais foi observada na camada basal e no epitélio transitório, e a localização da marcação foi no citoplasma e membrana citoplasmática, tanto na porção dorsal quanto na porção ventral (figura 18A-D e 19A-D).

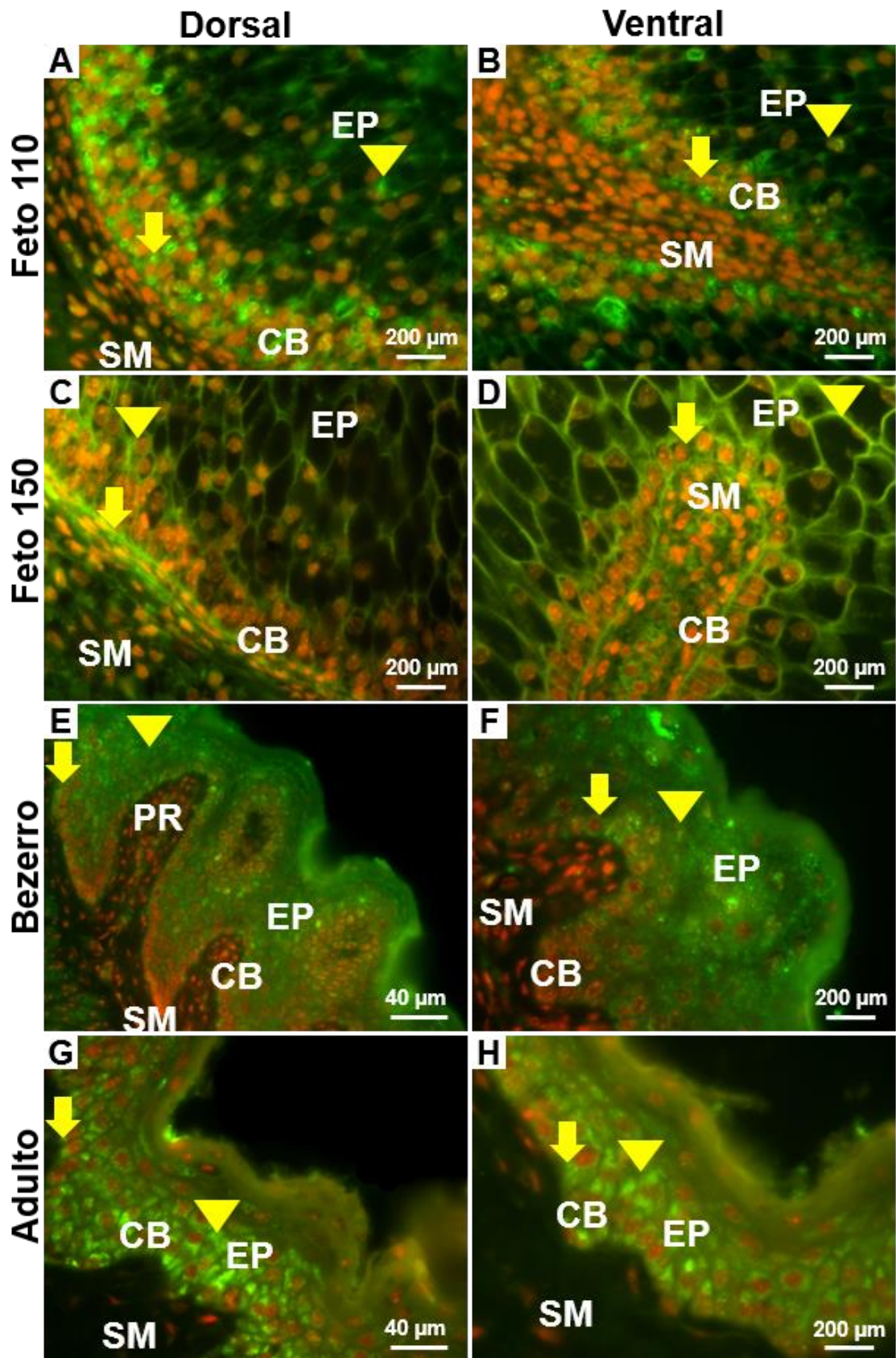
5.5.2.2 – Bezerros recém-nascidos

Em bezerros recém-nascidos a Cx32 foi observada no citoplasma da camada basal e epitélio, e quando próximo ao lúmen, além da presença citoplasmática, a marcação estava presente na membrana celular também, tanto na porção dorsal quanto ventral (Figura 18E-F e 19E-F).

5.5.2.3 – Bovinos adultos

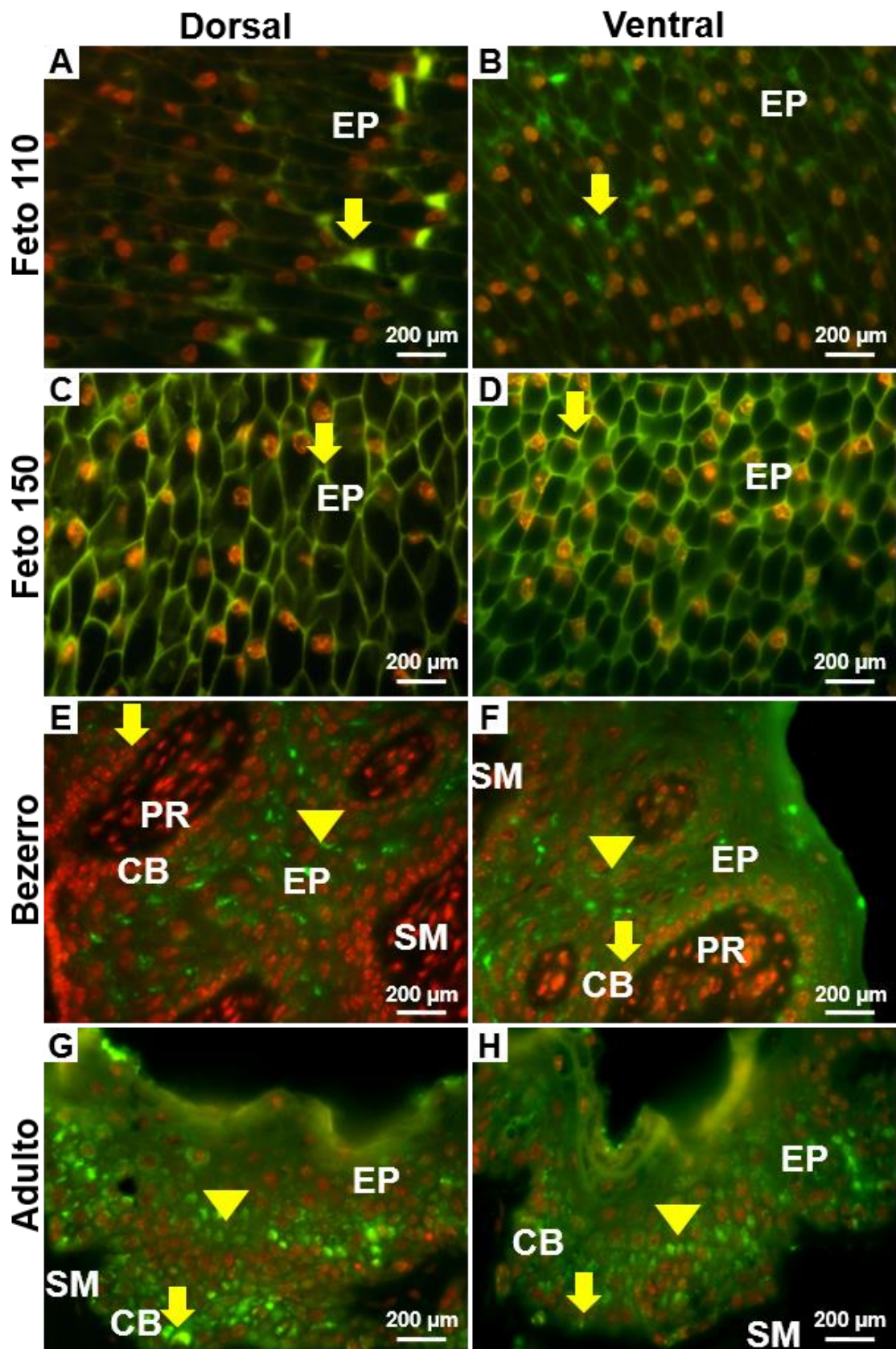
Nos bovinos adultos observamos a presença de Cx32, e sua localização se deu no citoplasma, tanto na camada basal quanto no epitélio reticular, nas porções dorsal e ventral (Figura 18G-H e 19G-H).

Figura 18 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Imagem **18A** porção dorsal e **18B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, localização da conexina 32 na camada basal do epitélio reticular, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **18C** porção dorsal e **18D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **18E** porção dorsal e **18F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **18G** porção dorsal e **18H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 19 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 32 no epitélio reticular. Imagem **19A** porção dorsal e **19B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx32 no epitélio transitório (**seta**). **19C** porção dorsal e **19D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx32 no epitélio transitório (**seta**). **19E** porção dorsal e **19F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **19G** porção dorsal e **19H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx32 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.3 Conexina 40

5.5.3.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

Foi observada a Cx40 nos fetos 110 e 150 dias gestacionais, na camada basal estava presente no citoplasma e na membrana celular. No epitélio transitório sua presença também se deu no citoplasma e também notou-se presença baixa na membrana, tanto na porção dorsal quanto na ventral (figura 20A-D e 21A-D).

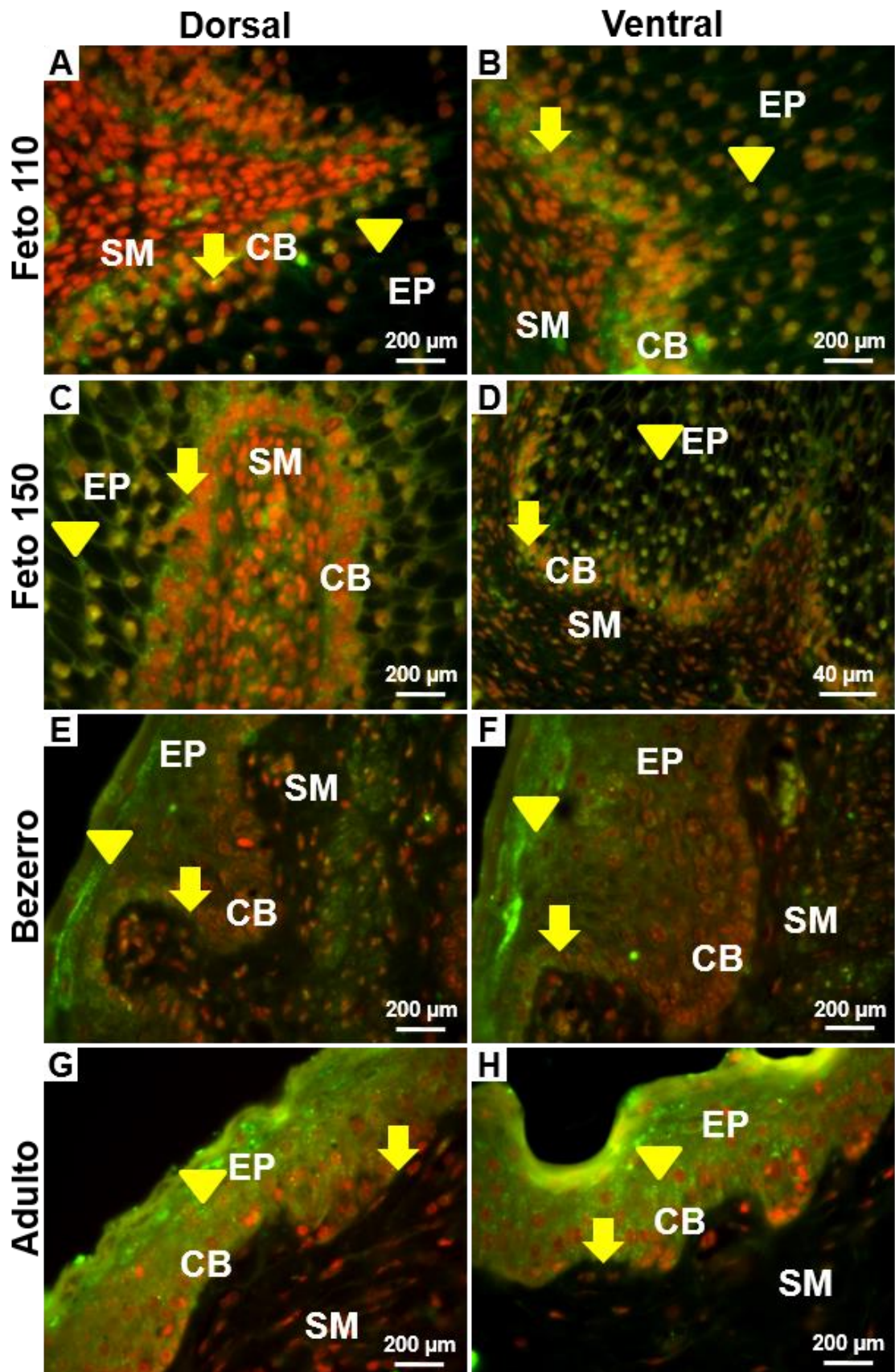
5.5.3.2 – Bezerros recém-nascidos

Nos bezerros Cx40 estava mais presente no epitélio com localização no citoplasma. Quando próximo ao lúmen, a sua localização estava na membrana celular. Na camada basal foi observado menos presença e localizada no citoplasma, tanto na porção dorsal quanto na ventral (Figura 20E-F e 21E-F).

5.5.3.3 – Bovinos adultos

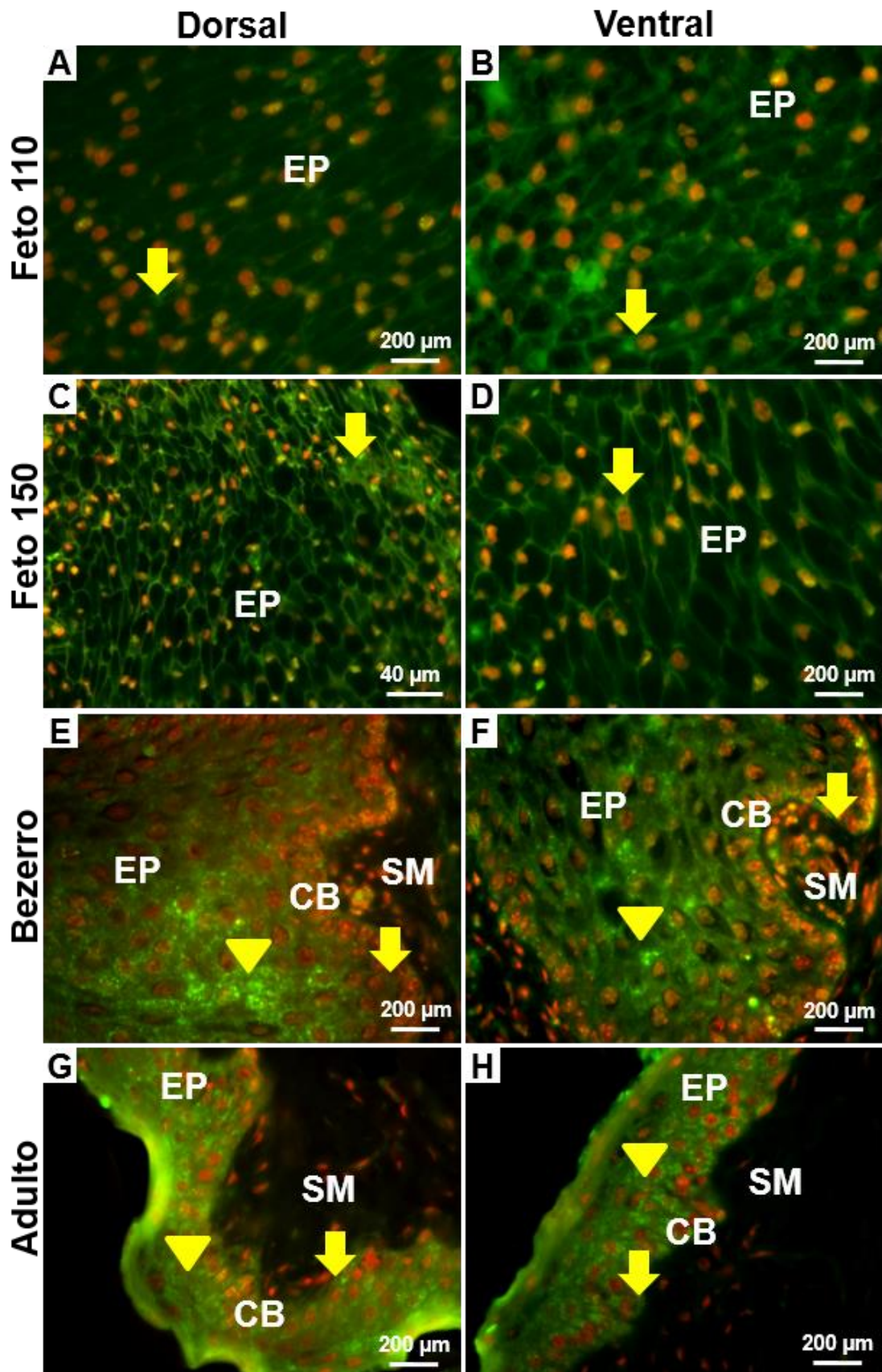
Quando observada a presença de Cx40 em bovinos adultos nas porções dorsal e ventral, a marcação na camada basal com localização no citoplasma, enquanto que no epitélio a marcação estava presente no citoplasma e membrana celular (figura 20G-H e 21G-H).

Figura 20 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 40 na camada basal do epitélio reticular. Imagem **20A** porção dorsal e **20B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **20C** porção dorsal e **20D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **20E** porção dorsal e **20F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **20G** porção dorsal e **20H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 21 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 40 no epitélio reticular. Imagem **21A** porção dorsal e **21B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx40 no epitélio transitório (**seta**). **21C** porção dorsal e **21D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx40 no epitélio transitório (**seta**). **21E** porção dorsal e **21F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **21G** porção dorsal e **21H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx40 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.4 Conexina 43

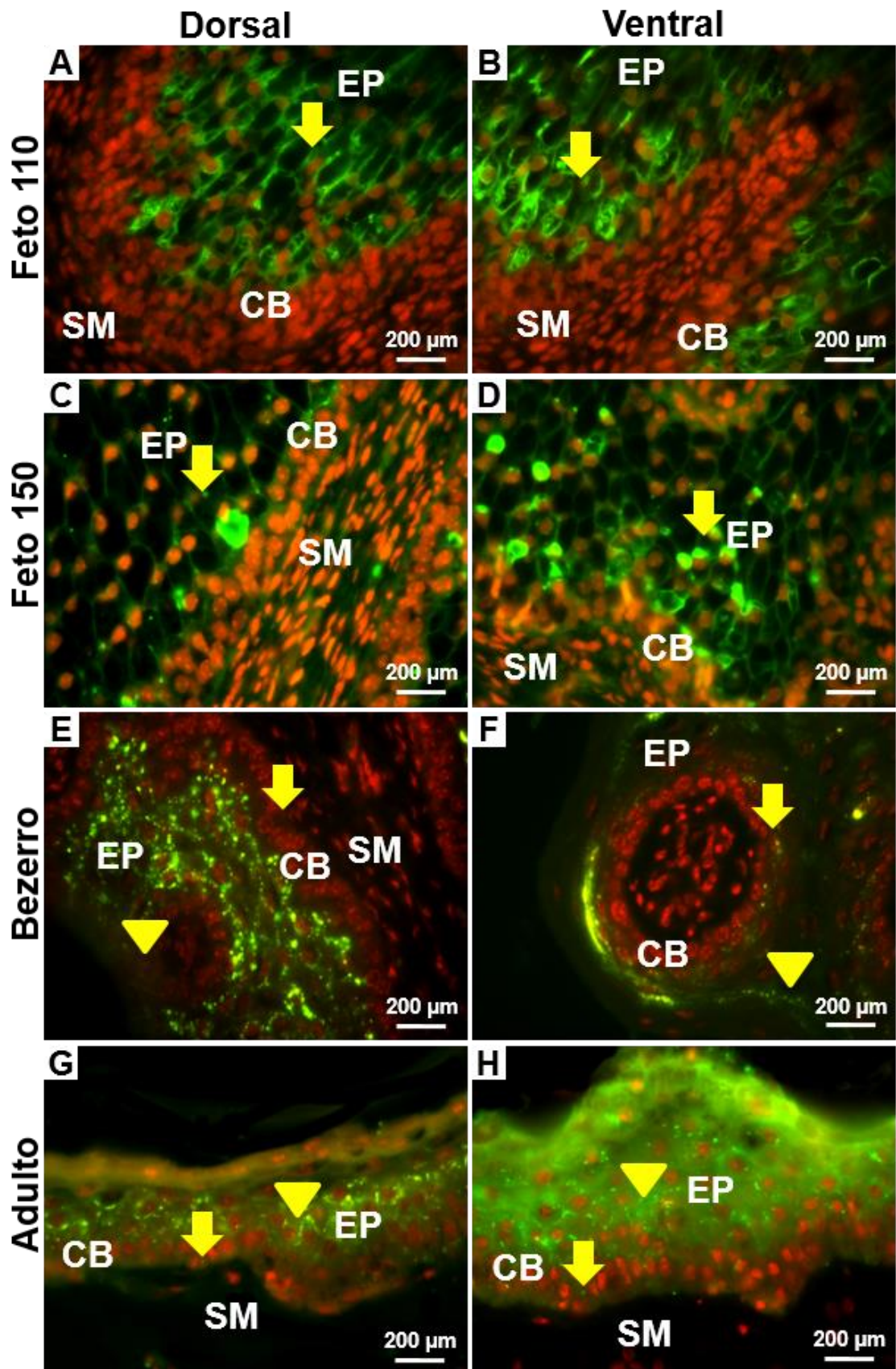
5.5.4.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

Nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais observamos que a presença de Cx43 era predominante no epitélio transitório e na membrana citoplasmática, não se mostrou muito presente na camada basal, tanto na porção dorsal quanto ventral (figura 22A-D e 23A-D).

5.5.4.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos

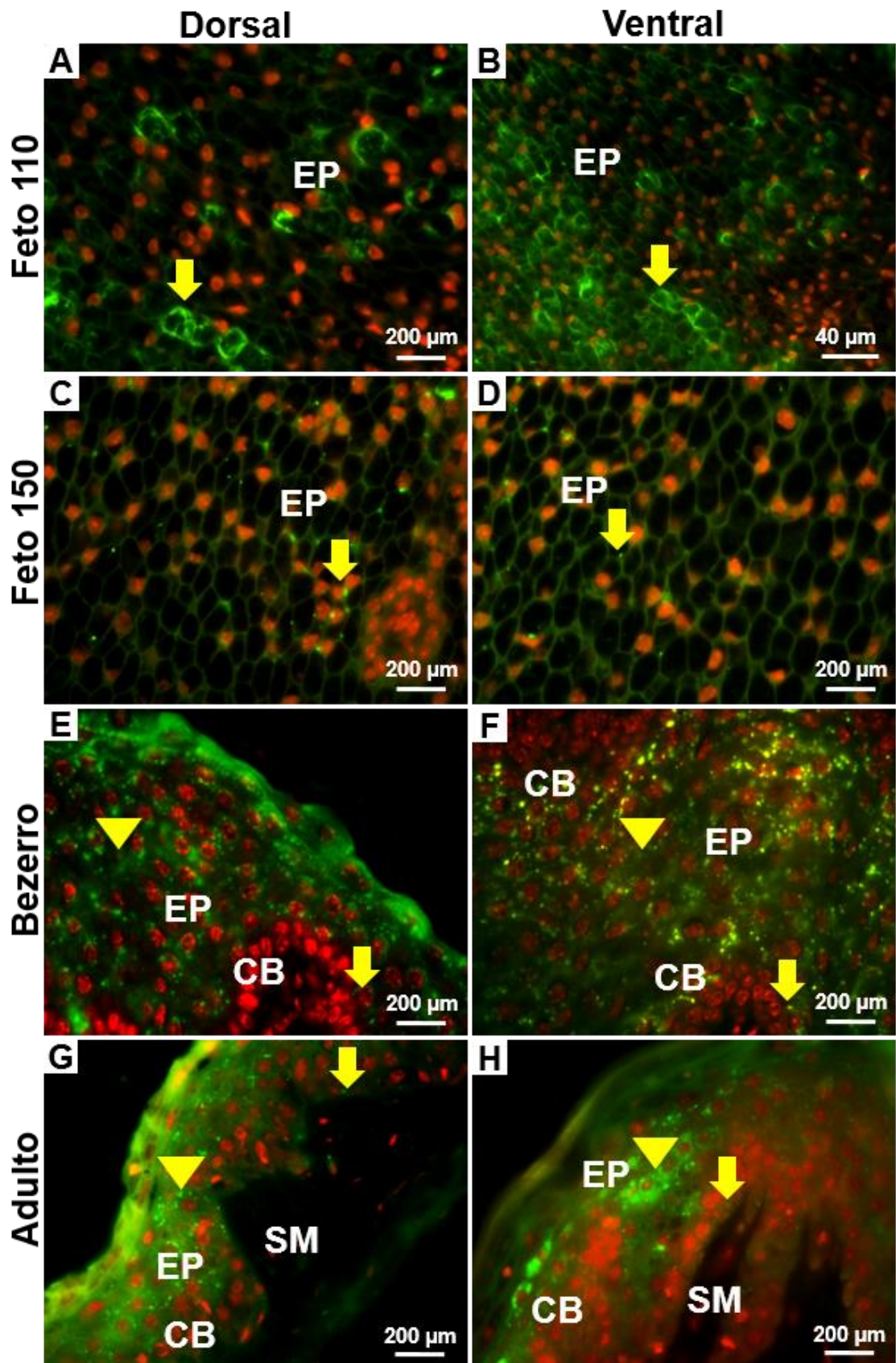
Nos bezerros e bovinos adultos o padrão de marcação se repetiu, havendo a presença predominante de Cx43 no epitélio e baixa presença na camada basal. A localização da marcação era predominante na membrana celular, embora encontrada baixa presença no citoplasma, tanto na porção dorsal quanto na ventral (figura 22E-H e 23 E-H).

Figura 22 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 43 na camada basal do epitélio reticular. Imagem **22A** porção dorsal e **22B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx43 no epitélio transitório (**seta**). **22C** porção dorsal e **22D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx43 no epitélio transitório (**seta**). **22E** porção dorsal e **22F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx43 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **22G** porção dorsal e **22H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx43 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 23 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da conexina 43 no epitélio reticular. Imagem **23A** porção dorsal e **23B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Cx43 no epitélio transitório (**seta**). **23C** porção dorsal e **23D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Cx43 no epitélio transitório (**seta**). **23E** porção dorsal e **23F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Cx43 na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **23G** porção dorsal e **23H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Cx43 no epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As conexinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.5 E-Caderina

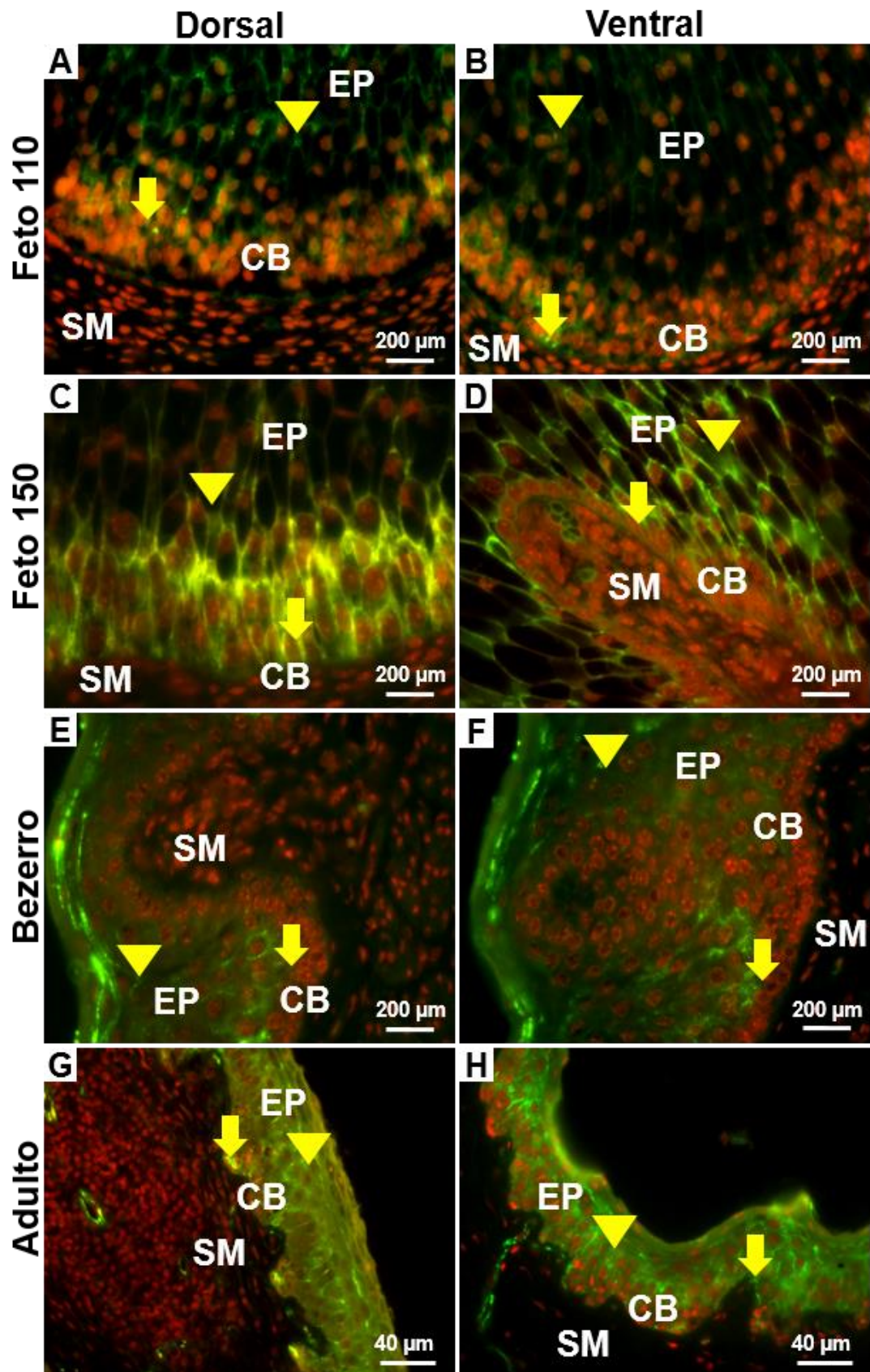
5.5.5.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

Nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais, observamos a presença de E-caderina na membrana celular tanto na camada basal quanto no epitélio. A marcação se deu nas duas porções dorsal e ventral (figura 24A-D e 25A-D).

5.5.5.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos

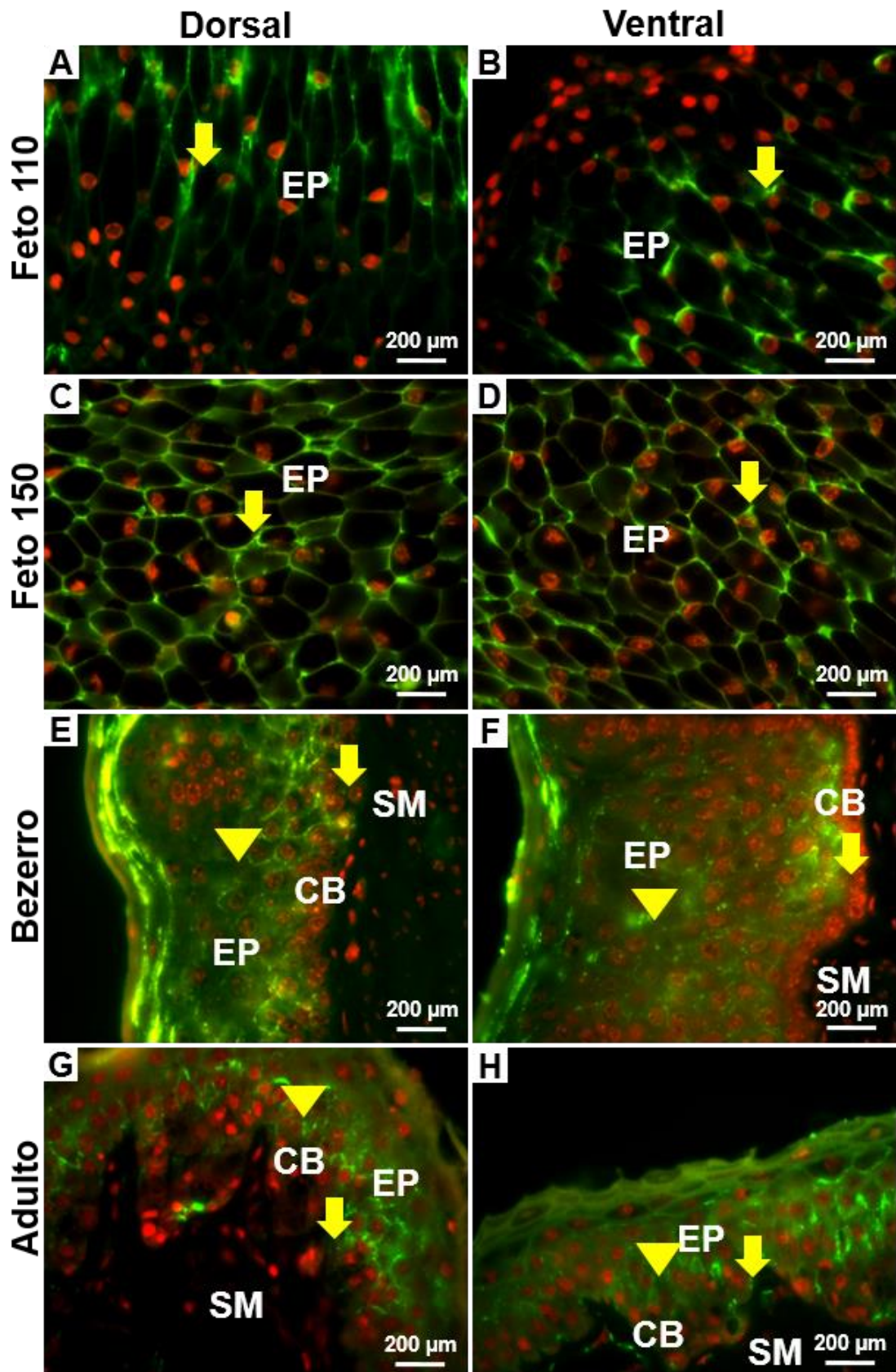
Nos bezerros e adultos observamos a presença de E-caderina predominantemente no epitélio tanto no estrato basal quando nos estratos acima, a localização foi observada na membrana celular, tanto na porção dorsal quanto na ventral (Figura 24E-H e 25E-H).

Figura 24 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da E-caderina na camada basal do epitélio reticular. Imagem **24A** porção dorsal e **24B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **24C** porção dorsal e **24D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **24E** porção dorsal e **24F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **24G** porção dorsal e **24H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As caderinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 25 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da E-caderina no epitélio reticular. Imagem **25A** porção dorsal e **25B** ventral de fetos de **110** dias gestacionais, mostra a presença de E-cad no epitélio transitório (**seta**). **25C** porção dorsal e **25D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de E-cad na no epitélio transitório (**seta**). **25E** porção dorsal e **25F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **25G** porção dorsal e **25H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de E-cad na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramide Signal Amplification. As caderinas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.6 Alfa-Catenina

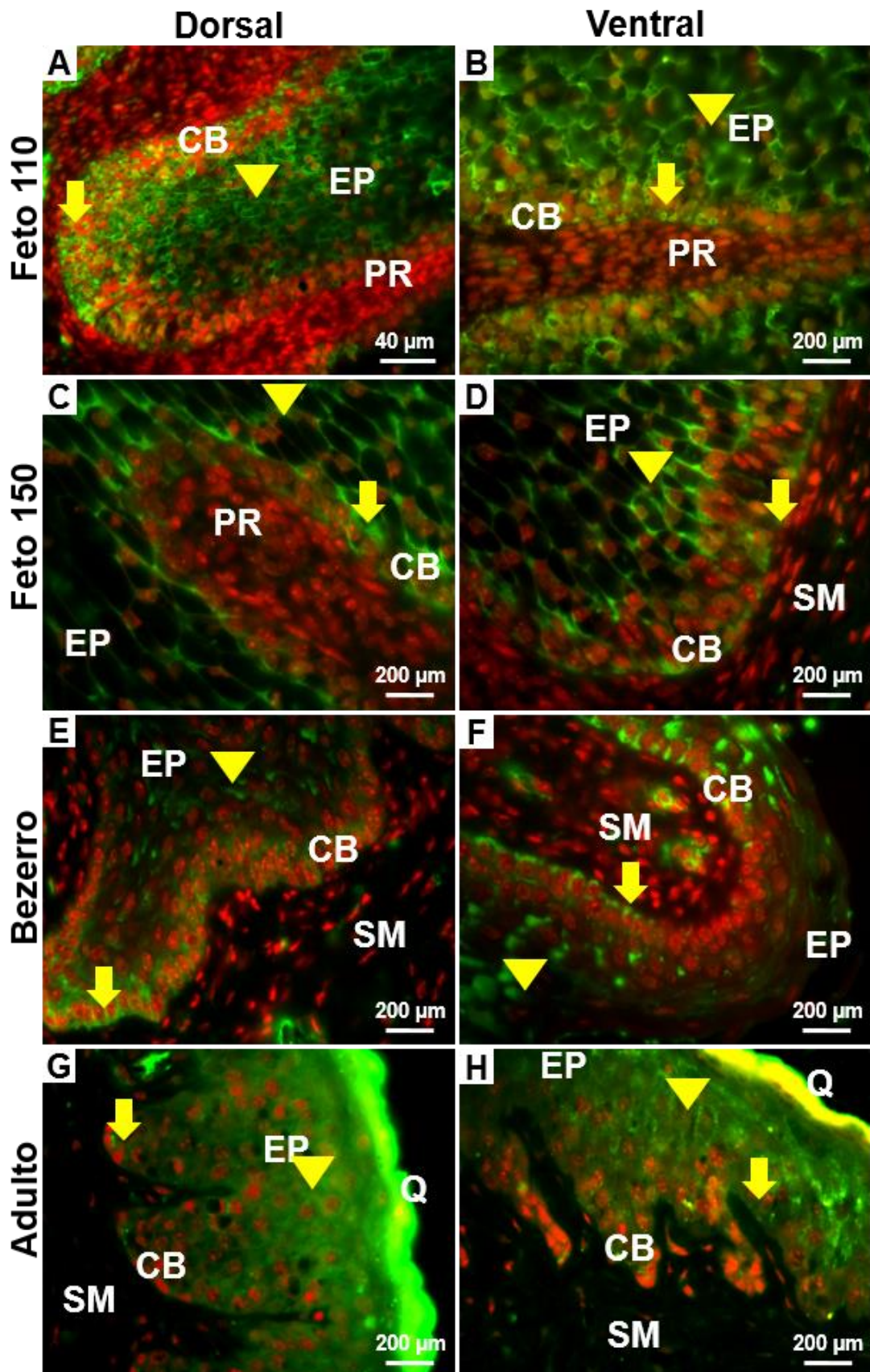
5.5.6.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

A presença de Alfa-Catenina nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais foi na membrana celular, tanto na camada basal quanto no epitélio transitório nas duas porções dorsal e ventral (Figura 26A-D e 27A-D).

5.5.6.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos

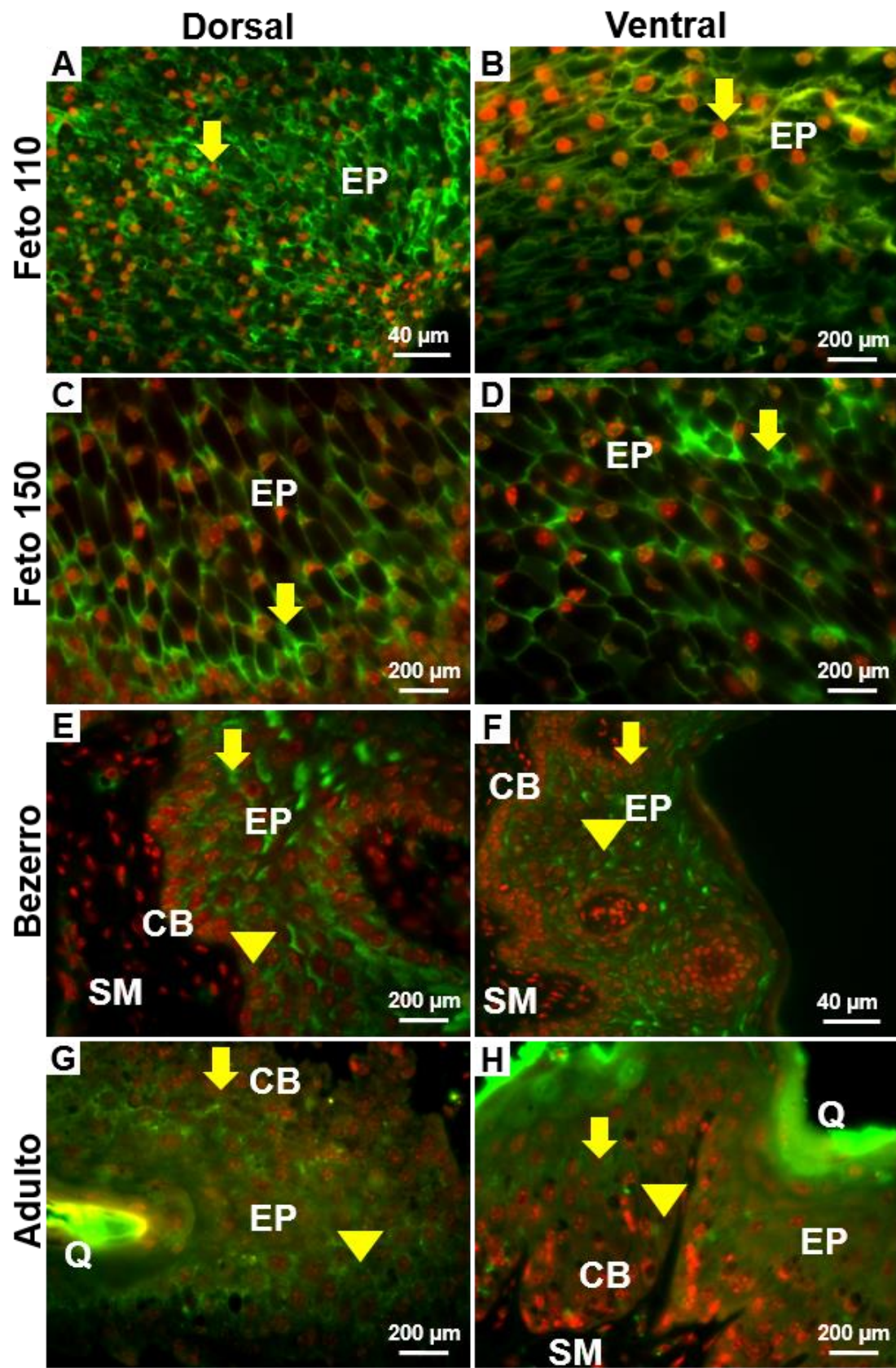
Nos bezerros e bovinos adultos a presença de alfa-Catenina manteve o padrão de marcação dos fetos, a localização da marcação foi na membrana celular, tanto na camada basal quanto no epitélio nas duas porções dorsal e ventral (Figura 26E-H e 27E-H).

Figura 26 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Alfa-catenina na camada basal do epitélio reticular. Imagem **26A** porção dorsal e **26B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **26C** porção dorsal e **26D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **26E** porção dorsal e **26F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **26G** porção dorsal e **26H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As cateninas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa; **Q**: Queratina.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 27 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Alfa-catenina no epitélio reticular. Imagem **27A** porção dorsal e **27B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Alfa-cat no epitélio transitório (**seta**). **27C** porção dorsal e **27D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Alfa-cat na no epitélio transitório (**seta**). **27E** porção dorsal e **27F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **27G** porção dorsal e **27H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Alfa-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As cateninas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa; **Q**: Queratina.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

5.5.7 Beta-catenina

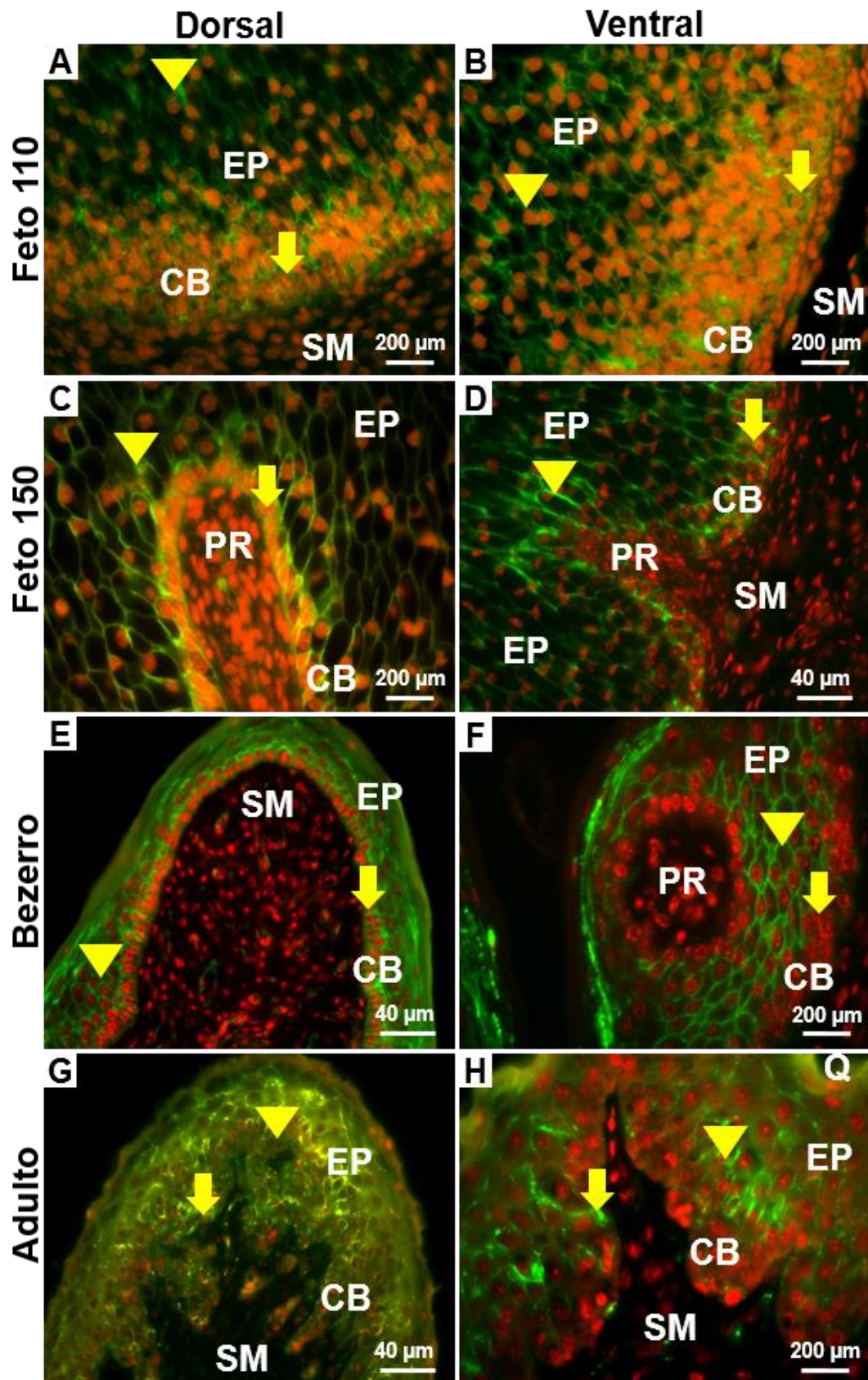
5.5.7.1 – Fetos 110 e 150 dias gestacionais

A Beta-Catenina nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais estava presente na membrana celular, tanto na camada basal quanto no epitélio transitório nas porções dorsal e ventral (Figura 28A-D e 29A-D).

5.5.7.2 – Bezerros recém-nascidos e bovinos adultos

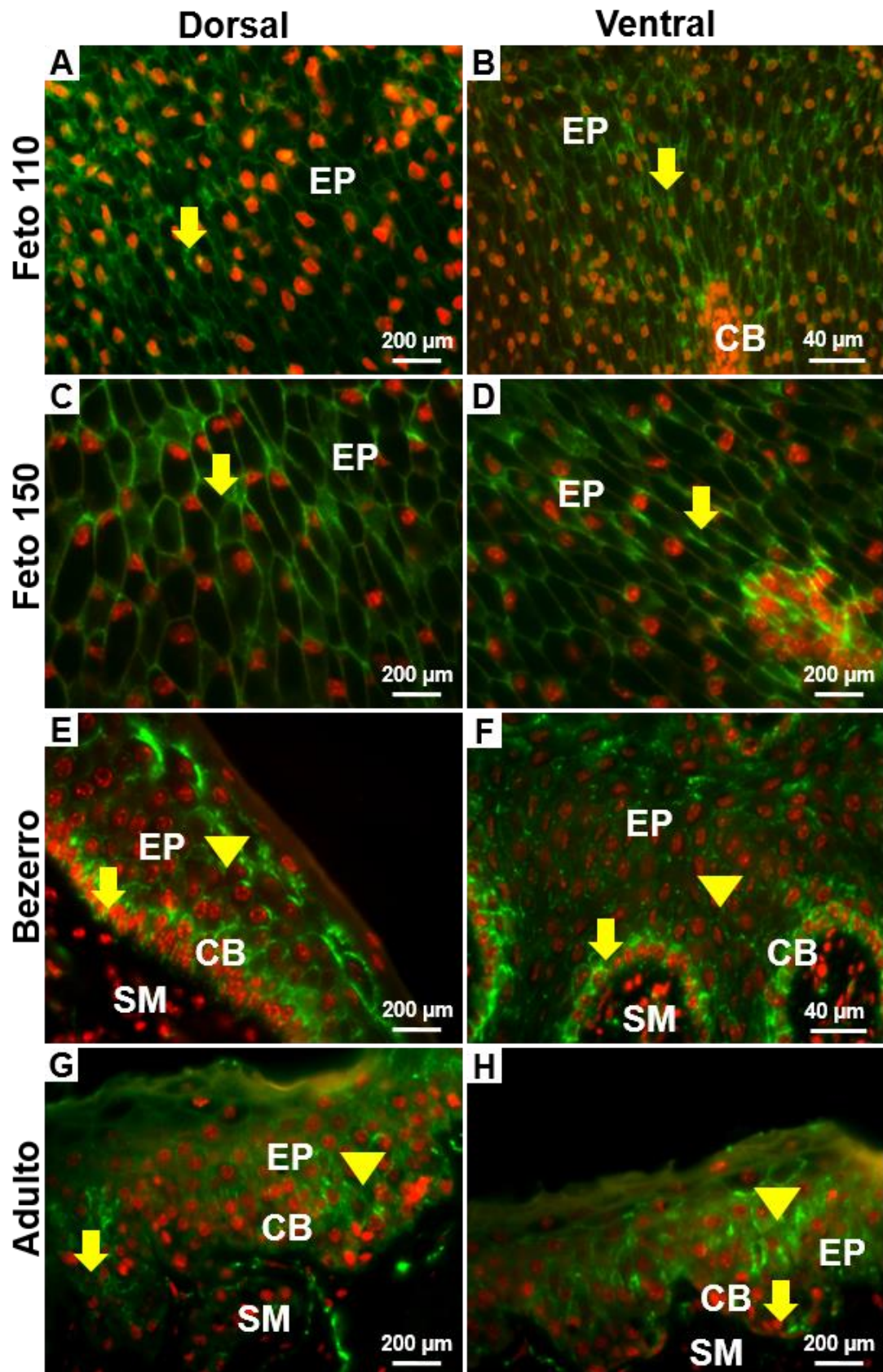
Nos Bezerros e bovinos adultos observou-se presença de Beta-Catenina na membrana celular tanto camada basal quanto no epitélio nas porções dorsal e ventral (Figura 28E-H e 29E-H).

Figura 28 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Beta-catenina na camada basal do epitélio reticular. Imagem **28A** porção dorsal e **28B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **28C** porção dorsal e **28D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio transitório (**cabeça seta**). **28E** porção dorsal e **28F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **28G** porção dorsal e **28H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). As cateninas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa; **Q**: Queratina.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Figura 29 – Fotomicrografia do epitélio reticular de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Localização da Beta-catenina no epitélio reticular. Imagem **29A** porção dorsal e **29B** ventral de fetos de 110 dias gestacionais, mostra a presença de Beta-cat no epitélio transitório (**seta**). **29C** porção dorsal e **29D** ventral de fetos de 150 dias gestacionais, mostra a presença de Beta-cat na no epitélio transitório (**seta**). **29E** porção dorsal e **29F** ventral de bezerros recém-nascidos, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). **29G** porção dorsal e **29H** ventral de bovinos adultos, mostra a presença de Beta-cat na camada basal (**seta**) e epitélio (**cabeça seta**). Marcação por TSA Tiramyde Signal Amplification. As cateninas fluorescem em verde corados pela tiramida, os núcleos em vermelho corados pelo iodeto de propídio. **EP**: Epitélio; **CB**: Camada basal; **SM**: submucosa.



Fonte: Olio, R. L. (2022)

Tabela 11 – Relação da presença das diferentes conexinas (26, 32, 40 e 43), E-caderina, α e β -cateninas nas diferentes idades estudadas.

Anticorpos	Região	Fetos 110	Fetos 150	Bezerros	Adultos
Proteínas de comunicação					
Cx26	Células da camada basal	citoplasma	citoplasma	citoplasma	citoplasma e membrana celular
Cx32	Células da camada basal	membrana	membrana	citoplasma	citoplasma
Cx40	Células da camada basal	citoplasma e membrana celular	citoplasma e membrana celular	citoplasma	citoplasma
Cx43	Células da camada basal	membrana	membrana	membrana	membrana
Cx26	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	citoplasma e membrana celular	citoplasma e membrana celular
Cx32	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	citoplasma e membrana celular	citoplasma
Cx40	Camada superior do epitélio	citoplasma	citoplasma	citoplasma e membrana celular	citoplasma e membrana celular
Cx43	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	citoplasma e membrana celular	citoplasma e membrana celular
Proteínas de adesão celular					
E-cad	Células da camada basal	membrana	membrana	membrana	membrana
	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	membrana	membrana
Alfa-Cat	Células da camada basal	membrana	membrana	membrana	Membrana
	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	membrana	Membrana
Beta-Cat	Células da camada basal	membrana	membrana	membrana	Membrana
	Camada superior do epitélio	membrana	membrana	membrana	Membrana

6 DISCUSSÃO

Os ruminantes são animais que possuem estômago complexo, composto por quatro câmaras, onde três delas são consideradas pré-estômagos, chamadas rúmen, retículo e omaso, e a quarta câmara considerada estômago verdadeiro, o abomaso (CHURCH, 1993; REECE, 2006). O retículo está localizado entre o rúmen e o omaso (DYCE; WENSING; SACK, 2010; GETTY, 1986; KÖNIG; LIEBICH, 2011), sendo assim, ele possui função importante na seleção de partículas que seguirão para o omaso (LEEK, 1987; REECE, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2009; TITCHEN, 1976). As três primeiras câmaras têm uma arquitetura histológica semelhante ao esôfago.

O retículo é provido de estruturas como cristas reticulares, papilas unguiculiformes e sulco reticular. Essas estruturas, juntamente com estímulos extrínsecos e intrínsecos, colaboram para motilidade reticulo-ruminal. Quando há contração do retículo, as cristas e as papilas diminuem o volume do lúmen, partículas menores e mais densas vão para o fundo do retículo (região ventral), e as contrações reticulares fecham parcial ou totalmente o óstio retículo-omasal, ocorrendo, assim, a seleção de partículas (BROOKES, 2001; CLAUSS *et al.*, 2010; LEEK, 1987; TEIXEIRA *et al.*, 1998; TITCHEN, 1976). Além disso, o sulco reticular é responsável por desviar o líquido do esôfago em direção ao abomaso (TITCHEN, 1976). Nos bezerros recém-nascidos esse sulco é comumente chamado de goteira esofágica e desvia todo o líquido ingerido para o abomaso, uma vez que sua alimentação é estritamente de leite materno (NICKEL *et al.*, 1979). No bovino adulto, o sulco desvia cerca de 30% do líquido em direção ao abomaso (DANIEL *et al.*, 2007).

A partir dessas informações acerca do retículo, vimos a necessidade de elucidar adaptações teciduais desse órgão que ocorrem durante as fases pré e pós-natal, bem como o volume de sua parede, morfologia, atividades celulares proliferativas e apoptóticas e a conexão e adesão celular no epitélio reticular bovino.

Através do uso do princípio de Cavalieri (MAYHEW; LUCOCQ, 2015; MAYHEW; OLSEN, 1991; ZEINALI *et al.*, 2017) obtivemos o volume da parede do retículo nas idades estudadas. Demonstramos que é possível aplicar esta

metodologia para uma estrutura grande como o retículo e possivelmente para estruturas ainda maiores desde que possam ser feitas fatias de espessura conhecida da estrutura inteira. Demonstramos também que o volume da parede aumentou de maneira crescente dos fetos de 110 dias gestacionais até os bovinos adultos.

É importante ressaltar que o resultado do volume da parede do retículo dos bovinos adultos é aproximadamente 37 vezes maior que o dos bezerros recém-nascidos. Essa diferença de volume se dá pela função do órgão nas idades citadas. Bezerros recém-nascidos se alimentam de leite materno (fase pré-ruminante) que é transportado diretamente para o abomaso pelo sulco ruminorreticular, logo, o retículo não tem função digestiva nessa idade. Após a transição de pré-ruminante para ruminante propriamente dito, o retículo passa a ter função de seleção de partículas, assim, o seu volume no bovino adulto é muito maior do que nos bezerros recém-nascidos. Contudo, notamos no que se refere à relação entre o volume da parede reticular em relação ao volume total (parede reticular + lúmen) não houve diferença significativa ao longo do desenvolvimento dos fetos de 110 dias até bovinos adultos, ou seja, esta relação permanece constante durante todo o desenvolvimento, a parede reticular cresce em proporção que acompanha o crescimento do volume do órgão vazio incluída a luz do mesmo. Embora não tenhamos desenvolvido um estudo específico para investigar as condições que determinam esta constante, uma hipótese que pode ser levantada e posteriormente testada é que após o desmame, a exigência fisiológica funcional sobre a mucosa e a camada muscular da parede reticular, provocada pelo intenso trânsito alimentar pelo retículo é um dos fatores que determina as grandezas dos volumes.

O retículo possui um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e aglandular, morfológicamente semelhante ao do esôfago e da pele, como visto em outros estudos (BANKS, 1992; BARONI *et al.*, 2012; KANO *et al.*, 1981; KOBIELAK; BODDUPALLY, 2014; NIESSEN, 2007; SCALA; CORONA; MARUCCIO, 2011; SCOTT *et al.*, 2012; VAN SOEST, 1994; VIVO *et al.*, 1990). É importante ressaltar que, como todos os órgãos, o retículo passa por desenvolvimento que acompanha o crescimento do corpo durante o período embrio-fetal. Seu epitélio durante essa fase não possui queratina. Contudo, sua camada superficial forma uma estrutura com múltiplas camadas que

desaparecem depois do nascimento ao término do desenvolvimento e adaptação do retículo para a fase ruminante do animal. Assim, no presente estudo este tipo de epitélio foi chamado de epitélio transitório, uma vez que esta camada está presente somente durante o período fetal e pré-ruminante. Evitamos o termo epitélio de transição para não confundir com o epitélio que reveste partes do sistema urinário, cujo nome também tem implicações funcionais. Stallcup, Kreider e Rakes (1990) apresentam essa estrutura como epitélio indiferenciado, porém, não identificamos atividade celular proliferativa, apenas atividade apoptótica. Este fato indica que esta camada do epitélio é formada por células totalmente diferenciadas que perderam a capacidade de dividir, mas que são repostas pela atividade proliferativa da camada basal do epitélio. Logo, propomos como uma estrutura transitória, já que nos bezerros ela começa a desaparecer e nos bovinos adultos não há presença da mesma. Uma vez que há presença de uma camada transitória durante o período fetal até o nascimento do bezerro, ocorrendo o desenvolvimento somático dos órgãos, e essa camada perdura até a fase pré-ruminante, o epitélio transitório pode ser uma estrutura temporária de sustentação relacionada com o desenvolvimento das cristas reticulares, protegendo-as e suportando-as de maneira estrutural enquanto as cristas reticulares em seu interior se desenvolvem e passam por adaptação no retículo da fase pré-ruminante para ruminante propriamente dito. Há vários exemplos de células de suporte presentes no epitélio, que dão sustentação a outras, como as células colunares do epitélio respiratório e do epitélio olfatório (EURELL; FRAPPIER; DELLMANN, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Assim, as cristas reticulares, pelo menos no início de seu desenvolvimento nas fases fetais, não crescem simplesmente para a luz do retículo, projetando-se para esta luz, mas antes são “esculpidas” do interior do epitélio transitório conforme este sofre um processo de apoptose e involução.

Ferrão (2018) também demonstra no rúmen de fetos (110 e 150 dias gestacionais) e bezerros recém-nascidos que há uma camada transitória enquanto as papilas ruminais se desenvolvem, não havendo presença dessa camada na fase adulta. Esse epitélio transitório apresentou padrão de redução gradual conforme ocorre o desenvolvimento das papilas do rúmen, sendo semelhante ao encontrado no retículo. Ferrão (2018) também sugere que esse epitélio transitório possua função de suporte estrutural para o desenvolvimento

papilar ruminal. É de interesse ressaltar que, embora o rúmen e o retículo sejam pré-estômagos, cada qual possui sua particularidade tanto morfológica quanto fisiológica. Assim, o estudo microscópico do epitélio reticular nessas fases iniciais da vida é importante para a compreensão de como essas estruturas preparam esses órgãos para lidar com o processo de desmame e a ativação funcional do estômago como um todo no animal ruminante.

Além do volume da parede e lúmen reticular, quantificamos as camadas mucosa, submucosa e muscular que compõe a parede reticular. Observamos o crescimento do volume das camadas, contudo foi necessário logaritimizarmos os dados, afim de que os números absolutos tivessem uma distribuição normal, procedimento comum em estatística quando os valores a serem comparados são muito diferentes. Foi possível observar que não há diferenças entre as regiões dorsal e ventral em relação aos parâmetros analisados das camadas da parede reticular e que as camadas acompanham o crescimento da parede que constituem ao longo do desenvolvimento somático do órgão, sendo que estas regiões podem ser consideradas uma só. Tendo essa informação, foi possível obter a porcentagem de volume de cada camada e o quanto ocupa do volume da parede reticular.

A camada mucosa tem um volume em relação à parede reticular maior nos fetos de 110 dias (13,2%) em relação aos fetos de 150 dias (10,8% do total em relação ao volume da parede reticular). Nos bezerros recém-nascidos (14,1% do total em relação ao volume da parede reticular) (aprox. 275 dias) a proporção de volume foi menor que nos bovinos adultos, uma vez que nestes a mucosa compõe 20,9% (do total em relação ao volume da parede reticular) da parede reticular. Ao longo do desenvolvimento notamos que a espessura da mucosa nos fetos se devia à presença do epitélio transitório, nos bezerros e bovinos adultos não estava presente. Esse epitélio transitório é mais espesso nos fetos de 110 dias de desenvolvimento do que nos 150, isso explica porque os fetos 110 dias possuem pouco mais de 2% de volume da mucosa em relação aos fetos de 150 dias gestacionais (dados referentes a tabela 7). A mucosa maior dos animais adultos se deve à funcionalidade do órgão, uma vez que o bezerro recém-nascido não possui os pré-estômagos digestivamente funcionais (KALENBERG; STOFFEL, 2020; REECE, 2006).

Os volumes da camada submucosa dos fetos de 110 dias (8,7% do total em relação ao volume da parede reticular) e 150 dias (6,1% do total do volume da parede reticular) possuem valores mais baixos que os bezerros recém-nascidos e bovinos adultos. Observamos que volume da camada submucosa triplicou nos bezerros recém-nascidos (23,9% em relação ao volume da parede reticular), sendo semelhante aos bovinos adultos (22,5% em relação a parede reticular). A camada submucosa tem importância na sustentação e irrigação sanguínea, uma vez que é composta por tecido conjuntivo rico em vasos de calibre médio (EURELL; FRAPPIER; DELLMANN, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), que por sua vez, está se desenvolvendo nos fetos, sugerindo que esta camada tem importância a partir do nascimento, onde as camadas estão formadas nos fetos e sofrerão remodelamento do nascimento até a fase ruminante propriamente dito (ECKERT *et al.*, 2015; GUILLOTEAU; ZABIELSKI; BLUM, 2009; STEELE *et al.*, 2016).

A camada muscular dos 110 dias (18,6% em relação ao volume da PR) e fetos de 150 dias (18,1% em relação ao volume da PR) foram semelhantes, e em relação as outras camadas, a muscular é a maior dentre os fetos. Ao nascer, os bezerros (34,8%) possuem quase duas vezes o volume da camada muscular em relação aos fetos. Nos bovinos adultos a camada muscular ocupa quase metade da parede reticular com 48,2% e faz sentido, uma vez que recebe estímulos nervosos intrínsecos e extrínsecos para contrair e relaxar, para que ocorra a motilidade ruminoreticular, afim de misturar e sustentar o peso da ingesta, regurgitar e selecionar partículas que voltarão ou continuarão para a digestão. Por isso esta camada compõe quase metade da parede reticular (REECE, 2006).

Ao longo do desenvolvimento dos fetos há fornecimento intrauterino de nutrientes e hormônios que contribuem para saúde e crescimento fetal, e os órgãos digestivos acompanham o desenvolvimento somático, assim como o retículo (AL MASRI *et al.*, 2018), com pouco estímulo externo. Cabe ressaltar que o estímulo não é inexistente, uma vez que há ingestão de líquido amniótico (GUZMAN *et al.*, 2020). Além disso, os órgãos passam por remodelamento e adaptação tecidual.

A partir das camadas observadas, a quantificação do índice proliferativo e apoptótico (IPC e IA) no estrato basal foi realizada, o estrato basal no epitélio

é uma camada de células indiferenciadas que ao migrarem para o estrato adjacente sofrem processo de diferenciação celular mudando morfológicamente até o último estrato, chamado de córneo, onde a célula tem ruptura da membrana nuclear e perda metabólica com perda de organelas, fazendo assim a deposição da queratina e sofrendo um processo apoptótico para formar este último estrato da mucosa reticular (FUCHS, 1990; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A proliferação celular foi analisada a partir da presença de Ki67, que é expresso no ciclo celular na fase S, através de estímulos na fase G1 e aumenta progressivamente ainda na fase S e G2, atinge um platô na mitose. A célula ao entrar na fase G0 tem redução da produção de Ki67 e se torna indetectável (BIRAJDAR *et al.*, 2014; BROWN; GATTER, 1990). Observou-se maior índice proliferativo nos fetos de 110 dias gestacionais (22,9%) em relação a todas as outras idades quantificadas, tanto na região dorsal quanto ventral. Nos fetos de 150 dias gestacionais (5,13%) e nos bezerros recém-nascidos (9,2%) o IPC foi menor do que os bovinos adultos (15,12%), dentre as idades fetais, os animais de 110 dias gestacionais tiveram maior índice proliferativo, indicando aumento da camada basal. Possivelmente isto ocorre porque o epitélio reticular está em intenso processo de formação inicial aos 110 dias, com as cristas reticulares em desenvolvimento. Nos bovinos adultos o epitélio está em constante manutenção e atividade de reparação tecidual, Greenwood *et al.*, (1997) demonstram que alimentos mais grosseiros resultam em queratina mais delgada no rúmen e retículo, indicando o sucessivo desgaste epitelial.

Fogarty e Bergmann (2017) demonstram em seu trabalho que a morte celular programada, apoptose, induz a proliferação celular, ocorrendo também reparação tecidual. Além disso, quando há desenvolvimento tecidual, além da manutenção há também o remodelamento tecidual.

Quando observado o IA (Índice de Apoptose) da camada basal, obtivemos maior índice nos animais adultos (28,85%), enquanto nos fetos de 110 (9,2%) e 150 dias gestacionais (12,65%) e bezerros recém-nascidos (7,72%) os índices de apoptose foram semelhantes estatisticamente, tanto na região dorsal quanto ventral não houve diferença. A mucosa reticular dos animais adultos sofre abrasão, uma vez que ingerem alimentos fibrosos e possuem motilidade ruminorreticular, e o IA maior nessa idade pode ser devido à esta atividade abrasiva da dieta dos ruminantes, uma vez que animais que se alimentam com

dietas mais grosseiras e possuem epitélio queratinizado mais delgado por conta do atrito (GREENWOOD *et al.*, 1997), lembrando, como mencionado anteriormente, que a atividade apoptótica também estimula a atividade proliferativa. Além disso, o desgaste epitelial é um estímulo para o aumento da produção de queratina, o qual é um processo, como dito anteriormente, que envolve a apoptose (FOGARTY; BERGMANN, 2017).

Em relação à pele humana, Bebars *et al.*, (2017) mostram a diferença da marcação por caspase-3 em pele normal e com psoríase, é possível observar que na pele normal, a apoptose se dá em todos os estratos, inclusive no estrato basal. No entanto, a intensidade e padrões de marcações na psoríase diferem da pele normal, mas também há presença da caspase-3 em todos os estratos. E além disso, Raymond *et al.*, (2007) mostram em seu estudo que a presença de várias caspases, incluindo a caspase-3, se dá em todos os estratos na pele humana, isso mostra a importância na renovação epitelial e também um evento biológico de morte celular programada. Ademais, sugere que a expressão de caspase na epiderme pode estar relacionada com a diferenciação de queratinócitos, e em resposta ao dano cutâneo a apoptose pode ser induzida, sendo que o mesmo, como sugerido e explicado no parágrafo anterior, pode ser aplicado a nossas observações sobre a taxa de apoptose no retículo adulto, explicando o índice apoptótico maior nos bovinos adultos, uma vez que as forragens fibrosas grosseiras e a motilidade reticular promovem abrasão no epitélio reticular, causando danos, semelhante a pele estimulando a produção de queratina Bebars *et al.*, (2017), sugere que a ativação das caspases, em baixo nível desempenham papel importante na fisiologia normal da pele, o que também pode ser aplicado à parede do retículo.

Ainda na pele, Baroni *et al.* (2012) demonstram importantes mecanismos que impedem a perda de água e eletrólitos, o primeiro é a queratinização a partir do estrato mais superficial, estrato córneo; a segunda é a vedação a partir das junções celulares do tipo tight. As células do tecido epitelial possuem mecanismos que regulam a troca de moléculas intercelulares, além de manter a integridade tecidual (ADIL; NARAYANAN; SOMANATH, 2021; BRAGULLA; HOMBERGER, 2009; GARCIA-VEGA *et al.*, 2021). Além da junção oclusiva (tight junction), há junções celulares do tipo comunicantes e aderentes, onde subunidades proteicas estão presentes. As proteínas das junções comunicantes

são as conexinas, que são fundamentais pela interação célula-célula de maneira direta, uma vez que o epitélio é avascular, a entrega e coordenação de sinais é conduzida através dos canais comunicantes e vias de sinalização parácrinas; as proteínas das junções aderentes são as caderinas e cateninas, que conferem a estabilidade da adesão célula-célula (CHANSON *et al.*, 2018; POLLARD *et al.*, 2017). A presença de diferentes conexinas expressas na pele permite a interação e estabelecem comunicação entre os diferentes estratos, além das células do tecido responderem a estímulos de modo coordenado, vantagem que as conexinas oferecem para este tecido avascular que é a epiderme (GARCIA-VEGA *et al.*, 2021). Da mesma maneira, o fato de termos achado diferentes conexinas expressas no epitélio reticular mostra que neste epitélio há a necessidade de resposta a estímulos variados que precisam ser respondidos de forma coordenada em diferentes etapas do desenvolvimento do órgão, provavelmente estímulos derivados do próprio processo de diferenciação e crescimento do órgão, isto é, estímulos intrínsecos nos fetos e bezerro, diversamente do que ocorre no adulto, onde há estímulos extrínsecos importantes derivados da alimentação. Além disso, as conexinas estão relacionadas com a proliferação celular, Churko e Laird (2013), descrevem como a conexina 26 está relacionada com a hiperproliferação de queratinócitos na pele quando há uma ferida ou em pacientes com oculodentodigital displasia (ODDD), causado por uma mutação no gene que codifica a conexina 43. Para além da proliferação, Decrock *et al.* (2009) descrevem que as conexinas tem papel na apoptose, uma vez que elas facilitam ou neutraliza esse processo, onde diferentes ativadores de morte celular podem ou não serem capazes de passar ou ativar canais de conexinas. Dessa maneira, podemos relacionar eventos intrínsecos no epitélio reticular de proliferação celular e apoptose à presença de conexinas, nos casos extrínsecos como abrasão do epitélio reticular através de ingesta grosseira, as conexinas tem papel fundamental na migração e proliferação celular afim de reparar o tecido.

As conexinas passam pelo processo de oligomerização tanto no retículo endoplasmático no caso da conexina 32 quanto no complexo de golgi como a conexina 26 e 43 e no caso da conexina 40 tem oligomerização de forma tardia na via secretora. Devido ao papel fundamental na manutenção de muitas funções celulares e fisiologia tecidual, a expressão das conexinas precisa ser

mantida em todos os momentos, mesmo durante a mitose, apoptose, diferenciação, senescência ou estresse celular (AASEN *et al.*, 2018). O turnover se torna muito importante para a manutenção da junção gap, uma vez que o fluxo constante de produção e estoque de conexinas para que possam renovar as junções comunicantes, as quais têm uma taxa de renovação elevada quando estão na membrana (JOHNSTONE *et al.*, 2012; LAIRD; CASTILLO; KASPRZAK, 1995; LAMPE; LAU, 2004). Além disso, essa reserva de conexinas em “modo de espera” se torna importante para que a renovação seja rápida e não precise ainda construir a conexina necessária e sim em resposta a estímulos seja transportada para a membrana, esse transporte depende das junções aderentes formadas por E-caderina dependentes de Ca^{2+} , conferindo estabilidade celular para formar os filamentos de actina que se ligam as cateninas, e assim, formar o caminho do citoplasma para membrana em que as conexinas são transportadas (HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001).

A presença da conexina 26 (Cx26) nos fetos 110 e 150 dias gestacionais, foi observada na camada basal no citoplasma, em situação de “modo de espera”, não funcional, enquanto no epitélio transitório a localização se deu na membrana formando junções comunicantes funcionais. Esta observação sugere que a Cx26 tem papel na manutenção do epitélio transitório nos fetos durante esse período de estruturação da camada tecidual, uma vez que o epitélio reticular nos fetos está se remodelando ao longo do desenvolvimento, como mostra Garcia-Vega *et al.* (2021) e Churko e Laird (2013) em seus estudos, que a conexina 26 tem papel importante na manutenção da pele e quando há o processo de cicatrização, a super expressão de Cx26 se mostrou importante para a proliferação e migração celular, além da renovação epitelial. Nos bezerros recém-nascidos e bovinos adultos, onde o epitélio é estratificado, a Cx26 estava presente tanto na camada basal quanto no epitélio. A localização na camada basal foi citoplasmática em “modo de espera” e próximo ao lúmen, a presença se deu no citoplasma e membrana, formando as junções funcionais com conexinas em “modo de espera” no citoplasma, indicando também papel de manutenção, os bezerros recém-nascidos também passam pela adaptação tecidual até a fase ruminante propriamente dita, e a presença de Cx26 se torna importante para estruturação tecidual. Nos animais adultos, além da renovação epitelial que acontece de modo natural, temos a abrasão dos alimentos,

sugerindo que a Cx26 tem papel importante tanto no remodelamento quanto na manutenção tecidual nas idades fetais e pós-natal. Além disso, a função de proliferação celular é sugerida, uma vez que há expressão em níveis baixos de Cx26 nas células em cultura (GARCIA-VEGA *et al.*, 2021; KANDYBA; HODGINS; MARTIN, 2008). Além disso, a presença citoplasmática sugere que a proteína esteja em “modo de espera”, pronta para renovação dos canais comunicantes em que a Cx26 se faz presente, aguardando estímulos para ser transportada para membrana plasmática, uma vez que a finalização e estoque das proteínas é realizada tanto no retículo endoplasmático quanto complexo de golgi (AASEN *et al.*, 2018; GEORGE; KENDALL; EVANS, 1999; MARTIN *et al.*, 2001). A expressão de Cx26 tem papel na proliferação e migração celular, contudo a presença de Cx26 mantém a homeostase do queratinócito durante o crescimento e diferenciação destas células na pele humana (ARITA *et al.*, 2002), o que sugere que o mesmo acontece no epitélio reticular, possuindo o mesmo tipo celular que é o queratinócito, sugerindo que a Cx26 no epitélio reticular possui um papel importante para a manutenção, proliferação e diferenciação celular do epitélio reticular durante o desenvolvimento fetal e pós-natal nos bezerros recém-nascidos e bovinos adultos.

A presença de Cx32 em fetos de 110 e 150 dias gestacionais foi observada na camada basal e no epitélio transitório, e a presença se deu tanto no citoplasma quanto na membrana citoplasmática. Em bezerros recém-nascidos a Cx32 foi observada no citoplasma da camada basal e epitélio, e quando próximo ao lúmen, além da presença citoplasmática foi possível observar a presença na membrana, sugerindo a importância da Cx32 nas fases fetais e recém-nascidos para a manutenção tecidual. Estudos na pele humana demonstram que a expressão das conexinas, inclusive a Cx32 (DI *et al.*, 2001) mantém a homeostase e diferenciação dos queratinócitos, uma vez que Cx32 está relacionado com a maioria dos efeitos dependentes de Ca^{2+} (BODENDIEK; RAMAN, 2010; GÓMEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Visto isso, a presença de Cx32 sugere a comunicação para manutenção e diferenciação dos queratinócitos no epitélio reticular, uma vez que o órgão está passando por remodelamento tecidual e sofre adaptações enquanto se desenvolve. Nos bovinos adultos, a presença de Cx32 foi citoplasmática, não havendo a presença nos canais de comunicação na membrana citoplasmática. Esse resultado

corroborar com os achados no epitélio ruminal de fetos, bezerros recém nascidos e bovinos adultos por Ferrão (2018). Em relação as conexinas, como outras proteínas, passam pelas modificações pós tradução, uma delas é a oligomerização, e particularmente as conexinas são hexomerizadas, formando os hemicanais prontos para o transporte e atuação na membrana. Visto isso, temos a conexina 32 localizada no citoplasma nos bovinos adultos, esperando para atuação, uma proteína necessária para o desenvolvimento do epitélio reticular, havendo presença na membrana citoplasmática, mas quando o epitélio está desenvolvido nos bovinos adultos não há presença na membrana, sugerindo que a Cx32 seja uma proteína de suporte. Estudos a cerca de Cx32 e Cx40 em miócitos (DI *et al.*, 2001; PLUM *et al.*, 2000), demonstram que Cx32 e Cx40 tem um papel de reposição dos hemicanais na membrana, quando ocorre alguma falha na formação dos hemicanais compostos por Cx43, este evento não é comum. Esse estudo suporta a hipótese de que a presença citoplasmática de Cx32 seja de suporte, sugerindo que seja uma conexina com função de reserva para manutenção do epitélio reticular nos bovinos adultos, uma vez que há necessidade de uma comunicação inesperada em que a Cx43 não possa atuar naquele momento, seja por falha na confecção da proteína ou mesmo uma alteração genética, com a presença de Cx32 no citoplasma, a célula terá resposta mais rápida e a comunicação entre as células será eficaz.

A conexina 40 (Cx40) foi observada nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais, na camada basal estava presente no citoplasma e na membrana celular. No epitélio transitório sua presença também se deu no citoplasma e também observou presença baixa na membrana, ainda mais próximo ao lúmen. Sugerindo que a Cx40 é importante na diferenciação (DI *et al.*, 2001; PLUM *et al.*, 2000) na camada basal durante o desenvolvimento, uma vez que o epitélio está de remodelando e Cx40 desempenha função compartilhada com Cx43 (DI *et al.*, 2001). A hipótese da baixa presença na membrana do epitélio transitório, pode ser devido a canais heteroméricos formados por Cx40 e Cx43, como demonstra Trevor; Wu; Burt (2002) alterações de expressão de Cx40 e Cx43 provocam mudanças na permeabilidade e as conexinas tem papel importante na sinalização do crescimento celular. Durante o processo de remodelamento tecidual no desenvolvimento, muito provavelmente essas alterações ocorram durante o período fetal. Nos bezerros a presença de Cx40 na camada basal e

epitélio se deu no citoplasma, exceto próximo ao lúmen que sua presença foi observada na membrana citoplasmática. Quando observada a presença de Cx40 em bovinos adultos, a marcação na camada basal com localização no citoplasma, enquanto que no epitélio a marcação estava presente no citoplasma e membrana celular. Os resultados sugerem que a Cx40 tem importância na diferenciação e manutenção dos queratinócitos, uma vez que a presença nos canais de comunicação se deu nos estratos acima do estrato germinativo, estrato basal. A Cx40 na pele humana e outras conexinas fazem parte do complexo de manutenção, diferenciação e homeostase tecidual (DI *et al.*, 2001; MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007). Contudo, vimos que a presença de Cx40 se torna fundamental durante o desenvolvimento, podendo estar relacionada com a diferenciação dos queratinócitos basais durante o desenvolvimento, nos bezerros recém-nascidos e bovinos adultos além da diferenciação, a manutenção dos queratinócitos dos estratos acima, mantendo a homeostase tecidual.

Nos fetos de 110 e 150 dias gestacionais observamos que a presença de Cx43 era predominante no epitélio transitório e na membrana citoplasmática, não se mostrou muito presente na camada basal. Nos bezerros e bovinos adultos o padrão de marcação se repetiu, havendo a presença predominante de Cx43 no epitélio e baixa presença na camada basal. A localização da marcação era predominante na membrana celular, embora encontrada baixa presença no citoplasma. A Cx43 pode estar atuando no processo de diferenciação e manutenção das células do epitélio transitório do retículo, uma vez que ela também foi encontrada na epiderme de roedores e na pele humana. Nestes casos revelou-se muito importante no processo de diferenciação de queratinócitos e manutenção da epiderme na pele em roedores (AU *et al.*, 2020). Na pele humana também foi encontrada na camada basal, onde demonstrou-se que tem papel na diferenciação dos queratinócitos basais, mas desempenham um papel importante nos outros estratos da epiderme (LANGLOIS *et al.*, 2007), da mesma maneira, como encontramos em outros estratos do epitélio reticular, ela pode desempenhar um papel importante na diferenciação e manutenção destas camadas intermediárias. A Cx43 é amplamente estudada na pele, uma vez que sua presença se dá em todos os estratos da epiderme, tem papel importante na comunicação dos queratinócitos, está relacionada com o

crescimento e diferenciação celular (BODENDIEK; RAMAN, 2010; LANGLOIS *et al.*, 2007). Além disso, quando há ferida na pele a Cx43 diminui sua expressão para que possa haver migração celular, em contrapartida, há um aumento na expressão de Cx26 tendo papel na proliferação e migração celular (CHURKO; LAIRD, 2013; GARCIA-VEGA *et al.*, 2021). Visto isso, ao observar a presença da Cx43 em todos os estratos durante o desenvolvimento somático do órgão até a fase adulta, este resultado ter papel essencial também na comunicação durante o remodelamento e manutenção do epitélio reticular, com função na diferenciação e crescimento dos queratinócitos.

As junções comunicantes são essenciais para as células e seus respectivos tecidos e órgãos, uma vez que as conexinas desempenham papel na troca de íons e pequenas moléculas como glicose, além da troca com o meio extracelular como é o caso de alguns hemicanais que não formam canais com as células vizinhas, nos tecidos avasculares como é o caso do epitélio reticular, as conexinas desempenham papel ainda maior, que é a troca de íons além de levar fatores como cAMP cGMP, passagem de Ca^{2+} e K^+ e mediando passagem de ATP, além da coordenação da diferenciação dos queratinócitos. As diferentes conexinas 26, 32, 40 e 43 nos queratinócitos, desempenham papel na diferenciação, migração e crescimento celular, para que haja renovação tecidual de maneira intrínseca natural, e de modo extrínseco quando há abrasão do epitélio reticular pelos alimentos fibrosos que podemos relacionar com a reparação que ocorre na epiderme, onde as conexinas possuem função de proliferação, renovação, manutenção e migração celular (BODENDIEK; RAMAN, 2010; CHURKO; LAIRD, 2013; GREENWOOD *et al.*, 1997; KARDAMI *et al.*, 2007; MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007; SCOTT *et al.*, 2012). O transporte de conexinas para membrana se dá através das junções aderentes formadas pelas caderinas, Hernandez-Blazquez *et al.* (2001), mostraram em seus experimentos como a E-caderina estabiliza as células, uma vez que a formação da junção aderente dependente de Ca^{2+} faz com que os filamentos estabilizem a aderência e também formem um caminho para o transporte das conexinas do citoplasma para a membrana plasmática. Desse modo, podemos afirmar que a é muito importante verificar se as junções aderentes estão presentes enquanto as conexinas estão presentes na célula.

A E-caderina, α e β -cateninas estão presentes em todas as idades estudadas, tanto na camada basal quanto nos estratos acima, inclusive nas idades fetais e mostra que este epitélio é uma estrutura coesa e bem conectada desde as fases fetais, criando ao ambiente propício na membrana para a formação de junções de comunicação. Esse resultado indica a importância dessas proteínas para manutenção da integridade tecidual no epitélio reticular, concordando com os achados (LIEN; STEPNIAK; VASIOUKHIN, 2008; TINKLE *et al.*, 2008), que demonstram a importância das caderinas e cateninas para manutenção da integridade da adesão dos queratinócitos, e mostrando a eficácia da manutenção tecidual da pele. Assim, a presença das caderinas e as outras moléculas de adesão oferecem uma contribuição para a adaptação tecidual, mantendo a integridade epitelial juntamente com as conexinas para a diferenciação e manutenção do epitélio reticular, uma vez que a adesão celular se faz necessária para que as células se comuniquem (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001; HUBER; BIERKAMP; KEMLER, 1996). As células possuem mecanismos importantes para manter a homeostase tecidual, as caderinas fazem parte de um complexo de proteínas que mantêm as células aderidas, em especial as epiteliais, são glicoproteínas transmembrânicas responsáveis pela adesão mediada por Ca^{2+} em células epiteliais (GEIGER; AYALON, 1992; HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2001), atuam na migração e no comportamento celular, mantendo a estrutura normal dos tecidos, além de participar na regulação da histogênese e morfodiferenciação (PETTITT, 2005). Hernandez-Blazquez *et al.* (2001) demonstram que as caderinas tem íntima relação com as proteínas de comunicação em relação ao transporte das conexinas para membrana, para manter a adesão as caderinas dependem de Ca^{2+} . As cateninas por sua vez, formam um complexo proteico juntamente com as caderinas e a tirosina quinase p120 para manter a estabilidade da adesão celular e integridade tecidual (GUJRAL *et al.*, 2013; REYNOLDS *et al.*, 1994; SHIBAMOTO *et al.*, 1995; TAKEICHI, 1995; ZHAO *et al.*, 2003). A presença da caderina e cateninas se tornam fundamentais desde as fases fetais no epitélio reticular, sugerindo fortemente que as mesmas contribuem diretamente para o desenvolvimento tecidual e manutenção celular, nos bovinos adultos são essenciais para manutenção do epitélio, além de manter a estabilidade e integridade celular enquanto o tecido se desenvolve.

7 CONCLUSÕES

O volume da parede reticular dos bovinos adultos é aproximadamente 37 vezes maior que o dos bezerros recém-nascidos, contudo, a relação entre o volume da parede reticular e o volume do órgão (incluída a luz do mesmo) é uma constante desde o período fetal até a vida adulta com valor de 70% em média. A parede reticular cresce em proporção que acompanha o crescimento do volume reticular do órgão vazio.

As cristas reticulares se desenvolvem no interior de um epitélio transitório, sendo “esculpidas” do interior do epitélio transitório, surgindo na superfície conforme este sofre um processo de apoptose e involução.

Os bovinos adultos possuem cerca de 7% a mais de camada mucosa que os bezerros recém-nascidos, devido ao animal adulto ter atividade digestiva no retículo, o que não acontece no bezerro recém-nascido por se alimentar de leite materno e estrategicamente digerir somente no abomaso até passar pela transição e ser um ruminante propriamente dito.

A camada submucosa quase triplicou seus volumes nos bezerros e recém nascidos em relação ao volume dos fetos de 110 e 150 dias gestacionais, por ser um tecido de sustentação e provedor de nutrição, atendendo às demandas de uma mucosa mais desenvolvida.

A camada muscular nos bovinos adultos ocupa quase metade do volume da parede reticular possivelmente pela intensa atividade muscular peristáltica nesta faixa etária.

Os fetos de 110 dias gestacionais possuem maior índice proliferativo em relação a todas as idades estudadas, devido ao intenso processo de formação e desenvolvimento, ainda mais no processo de formação das cristas reticulares. Nos bovinos adultos o índice proliferativo mais alto que nos fetos de 150 dias gestacionais e bezerros recém-nascidos está relacionado com o elevado desgaste epitelial e a conseqüente alta taxa de renovação tecidual.

Os bovinos adultos possuem maior índice apoptótico em relação a todas as idades estudadas devido à estimulação da proliferação celular e provavelmente devido ao estímulo para reposição da camada superficial de queratina, cuja formação envolve o processo de apoptose.

As conexinas 26, 32, 40 e 43 estão presentes no epitélio reticular em todas as idades estudadas, seja no citoplasma ou na membrana, mas sua presença na membrana formando junções, isto é, atuando funcionalmente na comunicação celular. As diferentes conexinas estudadas, tornam-se importantes no epitélio reticular bovino para que haja diferenciação dos queratinócitos, além de promoverem o desenvolvimento, migração, manutenção e proliferação tecidual.

A presença das conexinas no citoplasma são necessárias, à medida que a célula recebe estímulos para renovação das junções na membrana, as conexinas oligomerizadas estão prontas em “modo de espera” para o recrutamento e renovação das junções comunicantes funcionais.

A Cx26 presente nos estratos acima nas idades fetais tem papel na manutenção e proliferação durante a estruturação do epitélio reticular, assim como nos bezerros recém-nascidos que ainda passam por remodelamento tecidual. Nos bovinos adultos tem papel muito importante na manutenção tanto no estrato basal quanto nos estratos superiores, renovação e proliferação celular, devido a eventos intrínsecos biológicos, como proliferação e renovação, assim como em eventos extrínsecos no que diz respeito a abrasão epitelial, mantendo a homeostase dos queratinócitos enquanto se diferenciam e proliferam.

A Cx32 tem papel na manutenção e diferenciação dos queratinócitos do epitélio reticular durante a fase pré-ruminante (idade fetal e bezerros recém-nascidos). Nos bovinos adultos a Cx32 tem papel de suporte, que em resposta a erros de montagem, essa proteína pode formar um hemicanal para suprir deficiência celular, tendo a Cx32 pronta para resposta rápida em formar um novo canal para junção comunicante.

A presença de Cx40 se torna fundamental durante o desenvolvimento fetal, relacionada com a diferenciação dos queratinócitos basais, nos bezerros recém-nascidos e bovinos adultos além da diferenciação, a manutenção dos queratinócitos dos estratos acima, mantêm a homeostase tecidual.

A Cx43 possui papel no crescimento, renovação e diferenciação dos queratinócitos, além de manter a homeostase do epitélio reticular, devido a sua presença na membrana em todas as idades estudadas, sendo essencial para o desenvolvimento e manutenção tecidual.

O complexo de adesão celular formado pela E-caderina, α e β -cateninas está presente em todas as fases do epitélio reticular, e se faz necessário para manter a integridade celular enquanto o epitélio sofre remodelamento enquanto está se desenvolvendo, nas fases adultas mantém a homeostase dos queratinócitos.

As junções de adesão e as moléculas que as formam (E-caderina, α e β -cateninas) estiveram presentes em todas as fases no epitélio, portanto a ausência das conexinas e das junções de comunicação e o acúmulo de conexinas no citoplasma das células epiteliais em alguns estratos e faixas etárias à falta de uma conexão intercelular estável, mas a uma estratégia metabólica momentânea da célula ainda a ser estudada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN, T.; JOHNSTONE, S.; VIDAL-BRIME, L.; LYNN, K. S.; KOVAL, M. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

ADIL, M. S.; NARAYANAN, S. P.; SOMANATH, P. R. Cell-cell junctions: structure and regulation in physiology and pathology. **Tissue Barriers**, v. 9, n. 1, 2021.

AL MASRI, S.; REINCKE, R.; HUENIGEN, H.; GEMEINHARDT, O.; RICHARDSON, K. C.; PLENDL, J. Computed tomography study of the fetal development of the dairy cow stomach complex. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 1719–1729, 2018.

ARITA, K.; AKIYAMA, M.; TSUJI, Y.; MCMILLAN, J. R.; EADY, R. A. J.; SHIMIZU, H. Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1493–1500, 2002.

AU, A.; SHAO, Q.; WHITE, K. K.; LUCACIU, S. A.; ESSELTINE, J. L.; BARR, K.; LAIRD, D. W. Comparative Analysis of Cx31 and Cx43 in Differentiation-Competent Rodent Keratinocytes. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2020.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 688 p.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BEBARS, S. M. M.; AL-SHARAKY, D. R.; GABER, M. A.; RAGABAFIFY, D. Immunohistochemical expression of caspase 3 in psoriasis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 7, p. EC01–EC05, 2017.

BIRAJDAR, S. S.; RADHIKA, M. B.; PAREMALA, K.; SUDHAKARA, M.; SOUMYA, M.; GADIVAN, M. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 18, n. 2, p. 169, 2014.

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725–731, 2003.

BODENDIEK, S. B.; RAMAN, G. Connexin Modulators and Their Potential Targets under the Magnifying Glass. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4191–4230, 2010.

BRAGA, V. Epithelial Cell Shape: Cadherins and Small GTPases. **Experimental Cell Research**, v. 261, n. 1, p. 83–90, 2000.

BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516, 2009.

BROOKES, S. J. H. Retrograde tracing of enteric neuronal pathways. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2001.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489–503, 1990.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 238, n. 1, p. 1–27, 1996.

CHANSON, M.; WATANABE, M.; O'SHAUGHNESSY, E. M.; ZOSO, A.; MARTIN, P. E. Connexin Communication Compartments and Wound Repair in Epithelial Tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. Illinois: Waveland Press, 1993. 564 p.

CHURKO, J. M.; LAIRD, D. W. Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease. **Physiology**, v. 28, n. 3, p. 190–198, 2013.

CLAUSS, M.; HOFMANN, R. R.; STREICH, W. J.; FICKEL, J.; HUMMEL, J. Convergence in the macroscopic anatomy of the reticulum in wild ruminant species of different feeding types and a new resulting hypothesis on reticular function. **Journal of Zoology**, v. 281, n. 1, p. 26–38, 2010.

CLAUSS, M.; HUME, I. D.; HUMMEL, J. Evolutionary adaptations of ruminants and their potential relevance for modern production systems. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 979–992, 2010.

CUNNINGHAM, J.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. **Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1–3, p. 79–91, 2007.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C. de; MELO, L. Q. de; SOUZA, R. L. M. de; GUERRERO, M. C. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores da fase fluida ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1850–1856, 2007.

DECROCK, E.; VINKEN, M.; DE VUYST, E.; KRYSKO, D. V.; D'HERDE, K.; VANHAECKE, T.; VANDENABEELE, P.; ROGIERS, V.; LEYBAERT, L. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? **Cell Death &**

Differentiation, v. 16, n. 4, p. 524–536, 2009.

DI, W. L.; RUGG, E. L.; LEIGH, I. M.; KELSELL, D. P. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 4, p. 958–964, 2001.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Text of Veterinary Anatomy**. Saint Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, 2010.

ECKERT, E.; BROWN, H. E.; LESLIE, K. E.; DEVRIES, T. J.; STEELE, M. A. Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6315–6326, 2015.

EURELL, J. A. C.; FRAPPIER, B. L.; DELLMANN, H.-D. **Dellmann's textbook of veterinary histology**. [s.l.] Blackwell Pub, 2006. 405 p.

FERRÃO, J. S. P. **Expressão de proteínas de comunicação e junções celulares no rúmen de fetos bovinos, bezerros recém-nascidos e bovinos adultos**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

FOGARTY, C. E.; BERGMANN, A. Killers creating new life: Caspases drive apoptosis-induced proliferation in tissue repair and disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1390–1400, 2017.

FRANDSON, R. D. ; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e Fisiologia Dos Animais da Fazenda**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2011.

FUCHS, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 6, p. 2807, 1990.

GARCIA-VEGA, L.; O'SHAUGHNESSY, E. M.; ALBULOUSHI, A.; MARTIN, P. E. Connexins and the epithelial tissue barrier: A focus on connexin 26. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2021.

GARCÍA-YUSTE, S. **Sustainable and Environmentally Friendly Dairy Farms**. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland, 2020. 120 p.

GARCIA, M. A.; NELSON, W. J.; CHAVEZ, N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 4, 2018.

GEIGER, B.; AYALON, O. Cadherins. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, p. 307–332, 1992.

GENTRY, A. W. The ruminant radiation. *In*: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B.; SCHALLER, M. G. B. **Antelopes, deer, and relatives : fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New York: Yale University Press, 2000. p. 341.

- GEORGE, C. H.; KENDALL, J. M.; EVANS, W. H. Intracellular Trafficking Pathways in the Assembly of Connexins into Gap Junctions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8678–8685, 1999.
- GETTY, R. **Sisson and Grossman: Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro NV - 2: Guanabara, 1986. 1134 p.
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ, J. M.; DE MIGUEL, M.; LARROSA, B.; GONZÁLEZ, D.; BARRIO, L. C. Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 16030–16035, 2003.
- GORDON, I. J.; PRINS, H. H. T. **The Ecology of Browsing and Grazing**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. 341 p.
- GORDON, I. J.; PRINS, H. H. T. **The Ecology of Browsing and Grazing II**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2019. 454 p.
- GREENWOOD, R. H.; MORRILL, J. L.; TITGEMEYER, E. C.; KENNEDY, G. A. A New Method of Measuring Diet Abrasion and Its Effect on the Development of the Forestomach. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2534–2541, 1997.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; BLUM, J. W. GASTROINTESTINAL TRACT AND DIGESTION IN THE YOUNG RUMINANT: ONTOGENESIS, ADAPTATIONS, CONSEQUENCES AND MANIPULATIONS. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 37–46, 2009.
- GUJRAL, T. S.; KARP, E. S.; CHAN, M.; CHANG, B. H.; MACBEATH, G. Family-wide investigation of PDZ domain-mediated protein-protein interactions implicates β -catenin in maintaining the integrity of tight junctions. **Chemistry and Biology**, v. 20, n. 6, p. 816–827, 2013.
- GUZMAN, C. E.; WOOD, J. L.; EGIDI, E.; WHITE-MONSANT, A. C.; SEMENEC, L.; GROMMEN, S. V. H.; HILL-YARDIN, E. L.; DE GROEF, B.; FRANKS, A. E. A pioneer calf foetus microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1320–1334, 2010.
- HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; JOAZEIRO, P. P.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Control of Intracellular Movement of Connexins by E-Cadherin in Murine Skin Papilloma Cells. **Experimental Cell Research**, v. 270, p. 235–247, 2001.
- HUBER, O.; BIERKAMP, C.; KEMLER, R. Cadherins and catenins in development. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 685–691, 1996.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1st. ed. Rio de Janeiro, Brazil: Elsevier, 2012. 472 p.

IZAGUIRRE, M. F.; LARREA, D.; ADUR, J. F.; DIAZ-ZAMBONI, J. E.; VICENTE, N. B.; GALETTO, C. D.; CASCO, V. H. Role of E-Cadherin in Epithelial Architecture Maintenance. **Cell Communication & Adhesion**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2010.

JANIS, C. M. Tertiary mammal evolution in the context of changing climates, vegetation, and tectonic events. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 467–500, 1993.

JOHNSTONE, S. R.; BILLAUD, M.; LOHMAN, A. W.; TADDEO, E. P.; ISAKSON, B. E. Post-translational modifications in connexins and pannexins. **The Journal of membrane biology**, v. 245, n. 0, p. 319, 2012.

JONGEN, W. M. F.; FITZGERALD, D. J.; ASAMOTO, M.; PICCOLI, C.; SLAGA, T. J.; GROS, D.; TAKEICHI, M.; YAMASAKI, H.; JONGEN, W. M. F.; FITZGERALD, D. J.; ASAMOTO, M.; PICCOLI, C.; SLAGA, T. J.; GROS, D.; TAKEICHI, M.; YAMASAKI, H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. **The Journal of cell biology**, v. 114, n. 3, p. 545–555, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 568 p.

KALENBERG, C. A.; STOFFEL, M. H. The embryonic development of the bovine stomach revisited. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 49, n. 2, p. 270–280, 2020.

KANDYBA, E. E.; HODGINS, M. B.; MARTIN, P. E. A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: Analysis of the roles of connexins in the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 4, p. 1039–1049, 2008.

KANO, Y.; FUKAYA, K.; ASARI, M.; EGUCHI, Y. Studies on the development of the fetal and neonatal bovine stomach. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 10, n. 3, p. 264–74, 1981.

KARDAMI, E.; DANG, X.; IACOBAS, D. A.; NICKEL, B. E.; JEYARAMAN, M.; SRISAKULDEE, W.; MAKAZAN, J.; TANGUY, S.; SPRAY, D. C. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 94, n. 1–2, p. 245–264, 2007.

KITAMURA, N.; YOSHIKI, A.; SASAKI, M.; BALTAZAR, E. T.; HONDO, E.; YAMAMOTO, Y.; AGUNGPRİYONO, S.; YAMADA, J. Immunohistochemical evaluation of the muscularis mucosae in the ruminant forestomach. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 32, n. 3, p. 175–178, 1 jun. 2003.

KOBIELAK, A.; BODDUPALLY, K. Junctions and Inflammation in the Skin. **Cell Communication & Adhesion**, v. 21, n. 3, p. 141–147, 2014.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre, Brazil: Artmed, 2011. 787 p.

LAIRD, D. W.; CASTILLO, M.; KASPRZAK, L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 5, p. 1193, 1995.

LAMPE, P. D.; LAU, A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1171–1186, 2004.

LANGLOIS, S.; MAHER, A. C.; MANIAS, J. L.; SHAO, Q.; KIDDER, G. M.; LAIRD, D. W. Connexin Levels Regulate Keratinocyte Differentiation in the Epidermis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 30171–30180, 2007.

LEEK, B. F. The Control of the Motility of the Reticulo-Rumen. *In*: **Physiological and Pharmacological Aspects of the Reticulo-Rumen**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987. p. 1–20.

LIEN, W. H.; STEPNIAK, E.; VASIOUKHIN, V. Dissecting the role of cadherin–catenin proteins in mammalian epidermis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 40, p. 15225, 2008.

MARTIN, P. E. M.; BLUNDELL, G.; AHMAD, S.; ERRINGTON, R. J.; EVANS, W. H. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 21, p. 3845–3855, 2001.

MAYHEW, T. M.; LUCOCQ, J. M. From gross anatomy to the nanomorphome: stereological tools provide a paradigm for advancing research in quantitative morphomics. **Journal of anatomy**, v. 226, n. 4, p. 309–21, 2015.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of anatomy**, v. 178, p. 133–44, 1991.

MEGE, R. M.; MATSUZAKI, F.; GALLIN, W. J.; GOLDBERG, J. I.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. October, p. 7274–7278, 1988.

MEŞE, G.; RICHARD, G.; WHITE, T. W. Gap Junctions: Basic Structure and Function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2516–2524,

2007.

MESNIL, M.; PICCOLI, C.; YAMASAKI, H. A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the bystander effect in HeLa cells. **Cancer Research**, v. 57, n. 14, p. 2929–2932, 1997.

MEYER, R. A.; LAIRD, D. W.; REVEL, J. P.; JOHNSON, R. G. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 1, p. 179–89, 1992.

MÜLLER, E. J.; WILLIAMSON, L.; KOLLY, C.; SUTER, M. M. Outside-in Signaling through Integrins and Cadherins: A Central Mechanism to Control Epidermal Growth and Differentiation? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 3, p. 501–516, 2008.

MUNIZ, E.; LOBO LADD, A. A. B.; LOBO LADD, F. V.; DA SILVA, A. A. P.; KMIT, F. V.; BORGES, A. S.; TEIXEIRA, R.; DA MOTA, L. S. L. S.; BELLI, C. B.; DE ZOPPA, A. L. V.; DA SILVA, L. C. L. C.; DE MELO, M. P.; COPPI, A. A. 3-D technology used to accurately understand equine ileocolonic aganglionosis. **Cells Tissues Organs**, v. 198, n. 2, p. 160–168, 2013.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E.; SACK, W. O. Digestive System. *In: The Viscera of the Domestic Mammals*. New York, NY: Springer New York, 1979. p. 21–203.

NIESSEN, C. M. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2525–2532, 2007.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. de. **The embryology of domestic animals. Developmental mechanisms and malformations**. Zaragoza, Spain: Acribia, S. A., 1990. 399 p.

NYENGAARD, J. R.; ALWASEL, S. H. Practical stereology of the stomach and intestine. **Annals of Anatomy**, v. 196, n. 1, p. 41–47, 2014.

OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; KASKE, M.; KENNELLY, J. J.; CHRISTOPHERSON, R. J. Current understanding of the role of the reticulum and reticulo-omasal orifice in the control of digesta passage from the ruminoreticulum of sheep and cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 78, n. 1, p. 15–21, 1998.

PETTITT, J. **The cadherin superfamily**. [s.l.] WormBook, 2005.

PLUM, A.; HALLAS, G.; MAGIN, T.; DOMBROWSKI, F.; HAGENDORFF, A.; SCHUMACHER, B.; WOLPERT, C.; KIM, J. S.; LAMERS, W. H.; EVERT, M.; MEDA, P.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Unique and shared functions of different connexins in mice. **Current Biology**, v. 10, n. 18, p. 1083–1091, 2000.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.;

JOHNSON, G. T. **Cell Biology**. Philadelphia,: Elsevier Inc., 2017. 882 p.
RAYMOND, A. A.; MÉCHIN, M. C.; NACHAT, R.; TOULZA, E.; TAZI-AHNINI, R.; SERRE, G.; SIMON, M. Nine procaspases are expressed in normal human epidermis, but only caspase-14 is fully processed. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 3, p. 420–427, 2007.

REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006. 926 p.

REYNOLDS, A. B.; DANIEL, J.; MCCREA, P. D.; WHEELLOCK, M. J.; WU, J.; ZHANG¹, Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 12, p. 8333, dez. 1994.

RUCKEBUSCH, Y. Gastrointestinal motor functions in ruminants. **Comprehensive Physiology**, p. 1225–1282, 2011.

SCALA, G.; CORONA, M.; MARUCCIO, L. Structural, Histochemical and Immunocytochemical Study of the Forestomach Mucosa in Domestic Ruminants. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 40, n. 1, p. 47–54, 2011.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000.

SCOTT, C. A.; TATTERSALL, D.; O'TOOLE, E. A.; KELSELL, D. P. Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 8, p. 1952–1961, 2012.

SHIBAMOTO, S.; HAYAKAWA, M.; TAKEUCHI, K.; HORI, T.; MIYAZAWA, K.; KITAMURA, N.; JOHNSON, K. R.; WHEELLOCK, M. J.; MATSUYOSHI, N.; TAKEICHI, M.; ITO, F. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. **The Journal of Cell Biology**, v. 128, n. 5, p. 949, 1995.

STALLCUP, O. T.; KREIDER, D. L.; RAKES, J. M. Histological development and histochemical localization of enzymes in rumen and reticulum in bovine fetuses. **Journal of animal science**, v. 68, n. 6, p. 1773–89, 1990.

STEELE, M. A.; PENNER, G. B.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; GUAN, L. L. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4955–4966, 2016.

STEINBERG, T. H. Gap junction function: the messenger and the message. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 4, p. 851–4, 1998.
TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v. 251, n. 5000, p. 1451–1455, 1991.

TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Current Opinion in**

Cell Biology, v. 7, n. 5, p. 619–627, 1995.

TEIXEIRA, A. F.; KÜHNEL, W.; VIVES, P.; WEDEL, T. Functional morphology of unguiculiform papillae of the reticular groove in the ruminant stomach. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 191, n. 5, p. 469–476, 2009.

TEIXEIRA, A. F.; WEDEL, T.; KRAMMER, H. J.; KÜHNEL, W. Structural differences of the enteric nervous system in the cattle forestomach revealed by whole mount immunohistochemistry. **Annals of Anatomy**, v. 180, n. 5, p. 393–400, 1998.

TINKLE, C. L.; PASOLLI, H. A.; STOKES, N.; FUCHS, E. New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 40, p. 15405–15410, 2008.

TITCHEN, D. A. The nature and control of gastric motility in ruminants. **Annals of veterinary research**, v. 7, n. 2, p. 165–8, 1976.

TREVOR COTTRELL, G.; WU, Y.; BURT, J. M. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 282, n. 6 51-6, p. 1469–1482, 2002.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. New York, USA: Comstock Publishing Associates, 1994. 488 p.

VIVO, J. M.; ROBINA, A.; REGODÓN, S.; GUILLÉN, M. T.; FRANCO, A.; MAYORAL, A. I. Histogenetic evolution of bovine gastric compartments during the prenatal period. **Histology and histopathology**, v. 5, n. 4, p. 461–76, 1990.

ZEINALI, R.; KESHTKAR, A.; ZAMANI, A.; GHAREHAGHAJI, N. Brain Volume Estimation Enhancement by Morphological Image Processing Tools. **Journal of biomedical physics & engineering**, v. 7, n. 4, p. 379–388, 2017.

ZHAO, X. J.; LI, H.; CHEN, H.; LIU, Y. X.; ZHANG, L. H.; LIU, S. X.; FENG, Q. L. Expression of e-cadherin and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. 225–232, 2003.