



## 15° Congresso de Iniciação Científica

### **ANALISE IMUNOHISTOQUIMICA DAS PROTEÍNAS LIGANTES DE ÁCIDOS GRAXOS E COLESTEROL NA MUCOSA INTESTINAL DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E PÓS-NATA**

#### **Autor(es)**

LUIZ FERNANDO POSSIGNOLO

#### **Orientador(es)**

Adrienne Christine Palanch

#### **Apoio Financeiro**

FAPIC

#### **1. Introdução**

A mucosa intestinal é formada externamente por epitélio colunar simples que repousa sobre uma lâmina de tecido conjuntivo. O revestimento intestinal é caracterizado por invaginações e evaginações denominadas de criptas e vilosidades intestinais, respectivamente (WRIGHT; ALISON, 1984; OGRA et al, 1994). A mucosa intestinal possui uma alta taxa proliferativa que, durante a fase de desenvolvimento, passa por marcantes alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. Além disso, esta região apresenta grande capacidade adaptativa para as mudanças de nutrientes que ocorrem no conteúdo intraluminal durante as diferentes fases do desenvolvimento. Esse desenvolvimento pode ser dividido em 5 fases 1) morfogênese, 2) citodiferenciação e desenvolvimento fetal incluindo a preparação do epitélio para a absorção do leite e do colostro, nessas duas primeiras fases o lúmen do tubo gastrointestinal recebe líquido amniótico 3) nascimento e início do período de lactação onde na dieta predomina-se o leite materno 4) Período pré-desmame que possui uma dieta mista, composta por leite e alimentos sólidos e 5) do desmame até a ingestão de uma dieta sólida. (HENNING, 1981; MENARD; CALVERT, 1991) Os enterócitos diferenciam-se durante o processo de migração, que se inicia na cripta e termina no ápice da vilosidade intestinal (HERMISTON; GORDON, 1995). A absorção dos lipídios pela mucosa intestinal é um processo seletivo, sendo a maior parte desta intermediada por proteínas, fato que possibilita o estudo de intervenções específicas para fins terapêuticos (THOMSON et al, 2001). Um dos principais componentes lipídico da dieta é o colesterol. Após serem digeridos no estômago pela lipase ácida, os lipídios presentes no quimo chegam à mucosa intestinal. De todo colesterol absorvido pelos enterócitos um terço é proveniente da dieta, sendo o restante de origem endógena proveniente dos sais biliares. A mucosa intestinal absorve principalmente o colesterol na sua forma livre, o colesterol endógeno encontra-se na forma livre e por isso é absorvido mais rápido do que o

colesterol oriundo da dieta que está na forma esterificada (WILSON; RUDEL, 1994), portanto esse colesterol proveniente da dieta deve ser primeiro hidrolisado pela colesterol esterase (BORJA et al, 1964) para ser captado pelos enterócitos (TSO; FUJIMOTO, 1991). Alterações na composição da dieta influenciam o crescimento e o desenvolvimento do intestino (BUDDINGTON, 1994; VEEREMAN, 1996). Uma dieta rica em lipídios modifica algumas funções intestinais, como triglicerídios com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) ou por uma dieta contendo ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5n-3) e ácido docosahexanóico (DHA, 22:6n-3) (THOMPSON et al, 1986). Em virtude das informações apresentadas, nota-se a necessidade de estudo dos processos relacionados as mudanças morfológicas que ocorrem na mucosa intestinal durante seu desenvolvimento.

## 2. Objetivos

---

Este projeto de iniciação científica teve como objetivo analisar as mudanças morfológicas que ocorrem na mucosa intestinal durante o desenvolvimento de ratos nas idades de 15 e 20 dias fetais e 7 dias após o nascimento.

## 3. Desenvolvimento

---

Foi feita a análise do ciclo estral das ratas, a fim de caracterizar as diferenças dos quatro períodos do ciclo, por meio da análise do esfregaço vaginal. As fêmeas que se encontravam no período de estro, fase apta à fecundação, foram postas para acasalarem com os machos durante o período de 24 horas. As fêmeas que apresentaram espermatozoides no esfregaço vaginal foram consideradas como prenhes e isoladas em gaiolas individuais. Foram analisados três grupos experimentais: embriões fetos com 15 e 20 dias de vida intra-uterina e filhotes com 7 dias pós-natal. As amostras coletadas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por duas horas, desidratadas em soluções crescentes de álcool e diafanizadas em soluções crescentes de xilol. O material foi incluído em resina paraplast e seccionado em micrótomo na espessura de 6µm e corados com eosina/hematoxilina. As secções foram montadas em lâmina de vidro e cobertas por lamínulas. A análise morfológica foi feita em Microscópio de Luz (Zeiss, Standard 25).

## 4. Resultados

---

O ciclo estral de ratas dura em média de 4 a 5 dias, porém os mecanismos endócrinos envolvidos nesse processo se assemelham aos observados no ser humano. Este ciclo é dividido em 4 períodos que se distinguem por características próprias e identificáveis e são chamados de pró-estro, estro, metaestro e diestro. A fase de pró-estro que dura cerca de 12 horas é o período que se caracteriza pela preparação do organismo para a ovulação, fisiologicamente os níveis de hormônios gonadotrópicos LH e FSH estão elevados levando ao aumento do número de folículos o que se traduz em um aumento progressivo na produção dos estrógenos. O esfregaço vaginal apresenta um grande número de células nucleadas pequenas, poucas células corneificadas e tipos celulares intermediários, sendo característica dessa fase a ausência quase total de leucócitos. A ovulação ocorre na noite desse dia. A fase seguinte ao pró-estro, é o estro, nesse período que dura cerca de 24 horas os fluídos estão mais concentrados e em grandes quantidades, a ovulação ocorre aproximadamente na metade desse período, a vagina possui grande espessamento epitelial o que reflete altos níveis estrogênicos, especialmente se comparados aos de progesterona, no esfregaço vaginal a grande maioria das células apresenta-se corneificada e não se observa presença de células nucleadas ou de leucócitos é o período onde deve ocorrer à fecundação (despertando a receptividade da fêmea ao macho). Após o estro, ocorre a fase de metaestro com duração de cerca de 24 horas onde, após a ovulação, ocorre à formação do corpo lúteo, que proporciona elevação importante nos níveis de progesterona. Assim, inicia-se a fase secretória do ciclo, melhor caracterizada no metaestro, os ovários apresentam poucos folículos e numerosos corpos lúteos, e a vagina sofre redução na parede do epitélio. No esfregaço vaginal é possível observar células corneificadas, muitos leucócitos, e quase nenhum muco. Na rata, os corpos amarelos não são secretores e o metaestro é curto. A fase seguinte é o diestro com duração aproximada de 24 a 48 horas, os ovários apresentam pequenos folículos e grandes

corpos amarelos, ocorre atrofia glandular e predomínio de células mucosas e a vagina apresenta um epitélio delgado. É possível observar através do esfregaço vaginal no final dessa fase, no caso de não haver fecundação, surgirem as primeiras células epiteliais nucleadas pequenas, porém maiores que os leucócitos indicando o início de um novo pró-estro em decorrência da queda nas concentrações plasmáticas de estrógeno e progesterona (MARQUES, 2007; PINHEIRO et al, 2007). O período de gestação de ratos (*Rattus norvegicus*) tem duração de cerca de 22 dias. A embriogênese dos ratos é semelhante a dos seres humanos passando pelas mesmas fases, porém num período mais curto. Assim, durante os 5 primeiros dias de gestação ocorrem as sucessivas clivagens até a formação da blástula, do 6º ao 8º dia ocorre a gastrulação, nesse período ocorre a formação e organização das três camadas germinativas: mesoderme, endoderme e ectoderme. Na neurulação que vai do 9º até o 11º dia de gestação ocorre a formação e inicia-se o desenvolvimento do sistema nervoso. A partir do 11º dia o embrião passa a aumentar o número de somitos caudais dando início ao desenvolvimento da cauda, que provavelmente vai até o 16º dia de gestação. No período do 12,5º ao 16º dias, ocorre a formação completa do embrião, dando início ao período fetal no 17º dia, que é a última fase antes do nascimento do filhote que acontece no 22º dia de gestação. Após o nascimento, o filhote começa a respirar e inicia-se a fase de lactação que dura até o 16º dia após o nascimento, a partir daí o filhote começa a fase de desmame com duração de uma semana até passar para uma dieta sólida típica do adulto (HILL, 2007). Mesmo após o nascimento, o intestino não está completamente formado, passando por alterações marcantes em toda sua extensão (BUDDINGTON, 2004). O padrão do crescimento do intestino que se inicia no período fetal e continua no período pós-natal é a fissão binária da cripta intestinal (CLARKE, 1972; ST CLAIR; OSBORNE, 1985; SULLIVAN ET AL, 1991), promovida por fatores de crescimento que podem estar presentes no leite materno ou serem produzidos endogenamente e agem em receptores específicos para os mesmos que estão presentes nesta idade (CUMMINS; THOMPSON, 2002). É possível observar que os embriões com 15 dias pré-natais já apresentam o trato intestinal formado, porém este não está completamente desenvolvido, nota-se que ainda não há a presença das vilosidades intestinais. Mas os enterócitos já estão organizados de maneira a começar a formação das mesmas (anexo 1) A mucosa intestinal dos fetos de 20 dias pré-natal já está mais desenvolvida, podendo observar estruturas que irão se transformar nas vilosidades intestinais. Nesse período, sua formação ainda não está completa e por isso não se caracteriza como uma vilosidade verdadeira (anexo 2). Entretanto, o intestino dos filhotes com 7 dias pós-natal apresentam uma mucosa intestinal mais desenvolvida, uma vez que estes estavam no período de amamentação, e conforme descrito acima o leite materno é capaz de modular o desenvolvimento do intestino. Nota-se que a vilosidade intestinal já apresenta sua forma característica digitiforme, células típicas como enterócitos, caliciformes, e até mesmo linfócitos podem ser observados (anexo 3). Porém o epitélio intestinal ainda não se encontra completamente desenvolvido, e passará por alterações que serão marcantes durante o período de desmame com a introdução de uma dieta sólida. C

## 5. Considerações Finais

Conclui-se que durante o período fetal até uma semana pós natal todo o epitélio intestinal passa por alterações marcantes até que se forme por completo e seja capaz de realizar todas suas funções.

## Referências Bibliográficas

- BORJA, C.R.; VAHOUNY, G.V.; TREADWELL, C.R. Role of Bile and Pancreatic Juice in Cholesterol Absorption and Esterification. **Am. J. Physiol.** 206: 223-8, 1964
- BUDDINGTON, R.K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 72: 251-9, 1994.
- BUDDINGTON, R.K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 72: 251-9, 1994.
- CLARKERM. The effect of growth and of fasting on the number of villi and crypts in the small intestine of the albino rat. **J. Anat.** 112: 27–33, 1972.
- CUMMINS, A. G.; THOMPSON, F. M.** Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small

intestine in humans. **Gut**. 51: 748-754, 2002.

HENNING, S.J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am. J. Physiol.** 241: 199-214, 1981.

HERMISTON, M.L.; GORDON, J.I. Organization of crypt-villus axis and evolution of its stem cell hierarchy during intestinal development. **Am. J. Physiol.** 268: 813-822, 1995.

HILL, M. **Rat Development**. Disponível em: . Acesso em: 30 jan. 2007

MARQUES, R. M. **Relatório de fisiologia: o ciclo estral em ratas**. Disponível em: <<http://www.fortunecity.com/meltingpot/Park/627/resumos/FisioEstral.doc>>. Acesso em: 30 jan. 2007

MENARD, D. e CALVERT, R. Fetal and postnatal development of the small and large intestine: patterns and regulation. In: Growth of the Gastrointestinal Tract: Gastrointestinal Hormones and Growth Factors, editado por Morisset J. e Solomon TE. Boca Raton, FL: CRC, p. 159-174. 1991

Ogra, P. L.; Strober, W.; Mestecky, J.; McGhee, J.R.; Lamm, M.E.; Bienenstock, J. Handbook of Mucosal Immunology. **Academic Press**. Inc., , 766p, 1994.

PINHEIRO, A., CHAVES, A., PAIVA, H., CORREIA, L., ALEXANDRE, M., VILLAR, M. **Fisiologia das gônadas Femininas: Ovariectomia em ratas**. Disponível em: [http://members.tripod.com/~Medman\\_1/ovariectomia.html](http://members.tripod.com/~Medman_1/ovariectomia.html) >. Acesso em: 30 jan. 2007.

ST CLAIR, W. H.; OSBORNE, J. W. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rat. **Cell Tissue Kinet.** 18: 255-62, 1985.

SULLIVAN, P.B.; BRUETON, M. J.; TABARA, Z.B.; GOODLAD, R. A.; LEE, C. Y.; [WRIGHT, N.A.](#) Epidermal growth factor in necrotising enteritis. **Lancet.** 338: 54-3, 1991.

[THOMSON, A.B.](#) Defined formula diets alter jejunal and colonic uptake of lipids in rabbits with intact intestinal tract and following ileal resection. **Res. Exp. Med.** 186:413-426, 1986.

[THOMSON, A.B.](#); KEELAN, M.; THIESEN, A.; CLANDININ, M.T.; ROPELESKI, M.; WILD, G.E. Small bowel review: normal physiology part 1. **Dig. Dis. Sci.** 46:2567-87, Review 2001.

[TSO. P.](#); [FUJIMOTO, K.](#) The absorption and transport of lipids by the small intestine. **Brain Res. Bull.** 27:477-482, 1991.

[VEEREMAN-WAUTERS, G.](#) Neonatal gut development and postnatal adaptation. **Eur. J. Pediatr.** 155:627-32, 1996.

WILSON, M. D. & RUDEL, L. L. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. **Journal of Lipid Res.** 35: 943-955, 1994.

Wright, N.A. & Alison, M. The Biology of Epithelial Cell Populations. **Claredon Press**. Vol. I, 1247p, 1984.

## Anexos

---



