



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 quatros 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 espermatozóides 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 >. 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



