



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA E FISIOTERAPIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA**

**DIETA DEFICIENTE EM DOADORES DE METIL ALTERA A DINÂMICA DA CÉLULA  
TRONCO INTESTINAL E AUMENTA A PROFUNDIDADE DE CRIPTA NO INTESTINO  
DELGADO: ESTUDO EM MODELO *IN VIVO* E EM ORGANÓIDES INTESTINAIS**

**FORTALEZA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A1d ALVES DA SILVA, ANTONIO VINICIOS.  
DIETA DEFICIENTE EM DOADORES METIL ALTERA A DINÂMICA DA CÉLULA TRONCO  
INTESTINAL E AUMENTA A PROFUNDIDADE DE CRIPTA NO INTESTINO DELGADO:  
ESTUDO EM MODELO IN VIVO E EM ORGANÓIDES INTÉSTINAIS / ANTONIO VINICIOS  
ALVES DA SILVA. – 2019.  
125 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Coorientação: Prof. Dr. Sean. R. Moore.

1. Organoides. 2. Metilação. 3. Célula tronco intestinal. 4. Ácidos pteroilpoliglutâmicos. I. Título.

---

CDD 615.1

ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA

DIETA DEFICIENTE EM DOADORES METIL ALTERA A DINÂMICA DA CÉLULA  
TRONCO INTESTINAL E AUMENTA A PROFUNDIDADE DE CRIPTA NO INTESTINO  
DELGADO: ESTUDO EM MODELO *IN VIVO* E EM ORGANÓIDES INTESTINAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt  
Coorientador: Prof. Dr. Sean Moore

FORTALEZA

2018

ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA

DIETA DEFICIENTE EM DOADORES METIL ALTERA A DINÂMICA DA CÉLULA  
TRONCO INTESTINAL E AUMENTA A PROFUNDIDADE DE CRIPTA NO INTESTINO  
DELGADO: ESTUDO EM MODELO *IN VIVO* E EM ORGANÓIDES INTESTINAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.  
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 16/10/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Alexandre Havt Binda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Sean Moore  
Universidade de Virginia (UVa)

---

Prof. Aldo Angelo Moreira Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Armenio Aguiar dos Santos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Pedro Marcos Gomes Soares  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, sempre, por tudo e por isso.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sean Moore por todo o acompanhamento e orientação nesse período de construção do trabalho, bem como sua família pelo apoio de ser um estrangeiro em terras alheias.

Ao Prof. Alexandre Havt pela orientação e apoio ao longo da jornada acadêmica de mestrado e doutorado.

Ao Prof. Aldo Ângelo que, junto com Prof. Alexandre e Prof. Sean Moore, compõe o a tríade forte de meus mentores na ciência.

À Stephanie Oliveira pela grande parceria na execução desse trabalho aqui realizado.

A Jill Rood, Liz Mayer, Kristi Betz e Hung Le, a equipe do Moore Lab no Cincinnati Children's por toda ajuda e horas agradáveis do convívio.

Aos *cores* e a todos os colaboradores do Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC) de quem muito aprendi.

A toda equipe de Professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infeciosas (LDI), Mara Prata, Paloma, Delvani, Carol, Herlice e Pedro Henrique.

À minha família por todo o apoio.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

## RESUMO

### DIETA DEFICIENTE EM DOADORES METIL ALTERA A DINÂMICA DA CÉLULA TRONCO INTESTINAL E AUMENTA A PROFUNDIDADE DE CRIPTA NO INTESTINO DELGADO: ESTUDO EM MODELO IN VIVO E EM ORGANÓIDES INTESTINAIS

Em populações infantis de países em desenvolvimento a alta prevalência de déficit de desenvolvimento físico e cognitivo são associadas com alterações histológicas encontradas no intestino delgado. Tais problemas estão inseridos num ambiente de desnutrição, onde a deficiência de micronutrientes desempenha grande relevância. Com base no exposto o presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito da deficiência de doadores de metil *in vivo* sobre a microestrutura do intestino delgado, verificando como estes afetam a dinâmica da célula tronco intestinal (CTI) *in vitro*. Camundongos grávidas foram randomizadas em grupos que foram expostos a uma das quatro diferentes dietas: dietas controle CD- e CD+; dietas isocalóricas deficiente em doadores, MDD- e MDD+. +/- indica presença/ausência de sulfametoxazol na formulação. Os filhotes foram amamentados pelas respectivas mães e registrou-se consumo de alimentos, peso, crescimento, folato sérico e morfologia da cripta intestinal. Após sacrifício, cultivou-se enteróides a partir da cripta intestinal isolada. Resultados revelaram proeminente redução de peso e crescimento dos animais expostos a dieta deficiente de doadores metil (MDD+ e MDD-) em relação aos controle ( $p < 0,05$ ) e significativo aumento da profundidade de cripta no jejuno em animais alimentados com dieta deficiente associada ao sulfametoxazol. Tais alterações estiveram associadas a reduções importantes de folato sérico no grupo MDD+. Enteróides de animais expostos à dieta deficiente apresentaram reduzido número do domínio de cripta e menor taxa de sobrevivência associadas à reduzida quantidade de células proliferativas marcadas com EdU. Em enteróides cultivados em meio deficiente de doadores metil, PCR-array mostrou expressivo aumento de *Atoh1* ( $p=0.02$ ) em relação aos cultivados em meio regular, indicando expansão do pool de progenitores comprometidos com a linhagem secretória. Não se verificou diferenças de transcrição para *Lgr5*; contudo, a redução transcricional de *Lrig1* ( $p=0.0460$ ), *Ascl2* ( $p=0.002$ ) e *Sox9* ( $p=0.009$ ) sugerem que a via Wnt encontra-se prejudicada. A metilação do DNA mostrou que, em relação ao controle, enteróides cultivados em meio reduzido em doadores metil apresentaram menor percentil de metilação dos genes relacionados a produção de mucinas intestinais *B4Galnt1* e *Phospho1*, alteração epigenética associada a menor expressão de tais genes. Do exposto conclui-se que no modelo utilizado a deficiência de doadores de metil é condição causal suficiente para induzir, em nível

tecidual, alterações histológicas intestinais associadas a redução de peso e crescimento. A nível celular tais alterações estão relacionadas a função prejudicada da CTI alterando também a composição celular no eixo cripta-vilus com maior predomínio da linhagem progenitora secretória. De forma geral, todas as alterações encontradas harmonizam-se com o papel bem delineado do folato e demais doadores de metil como cofatores essenciais a síntese, maturação e metilação de DNA.

**Palavras-chave:** Organoides. Metilação. Célula tronco intestinal. Ácidos pteroilpoliglutâmicos.



## ABSTRACT

### METHYL DONOR-DEFICIENT DIET CHANGES THE DYNAMICS OF INTESTINAL STEM CELL AND INCREASES CRYPT DEPTH IN THE SMALL INTESTINE: STUDY IN VIVO AND INTESTINAL ORGANOID MODELS

In child populations of the developing world, physical and cognitive development impairment are highly prevalent and are accompanied by altered small intestinal (SI) morphology. Such problems occur in an environment of malnutrition, a context where micronutrient deficiency plays a major role. Based on the above, the objective of this study was to investigate the effect of the deficiency of methyl donors (folate and choline) *in vivo* on the structure of the small intestine, verifying the impact of those nutrients on the intestinal stem cell (ISC) dynamics *in vitro*. We randomized pregnant dams to one of four different diets: control diet CD- and CD+; isocaloric methyl donor deficient diet, MDD- and MDD+. +/- means presence or absence of sulfamethoxazole in the formulation. We weaned pups to their dam's diet and measured growth, folate status and SI crypt morphology. Following the sacrifice, enteroids were cultured from the isolated intestinal crypt to assess ISC dynamics. Our results reveal a prominent reduction in weight and growth of the animals exposed to the MDD as well as significant increase of crypt depth in the jejunum and ileum segments of those animals. Such alterations were associated with significant reductions in serum folate and increase in red blood cell size mainly in animals exposed to a deficient antibiotic diet (MDD+). Enteroids from animals exposed to deficient diet showed reduced number of crypt domain and lower survival rate associated with reduced amount of EdU-tagged proliferative cells. PCR-array showed a significant increase of *Atoh1* suggesting expansion of the pool of progenitors compromised with the secretory lineage. Reduction of the transcriptional of *Lrig1*, *Ascl2* and *Sox9*, a subset of Wnt signaling target genes suggest that pathway is impaired. The impaired ISC function found in the enteroids from MDD- can be explained by the reduction of the quiescent ICS markers while *Lgr5*, the main marker for high cycling ICS, was intact. In comparison to the control, methylation of DNA in the ISC showed that enteroids cultivated in medium with low levels of methyl donors presented lower percentile of methylation of the genes involved in the production of intestinal mucin *B4Galnt1* and *Phosphol* in the 3'CGI, an epigenetic alteration associated to lower expression of those genes. From the above, we conclude that in the model used the deficiency of methyl donors is a sufficient causal condition to induce at the tissue level intestinal histological alterations associated with weight and growth impairment. At the cellular level, such alterations are related to impaired ISC function, also altering the cellular composition in the crypt-villus axis with

greater predominance of the secretory progenitor lineage. At the molecular level the alterations found were related to the reduction of DNA methylation in genes involved with mucin production. In general, all the changes found harmonize with the well-delineated role of folate and other methyl donors as essential cofactors for synthesis, maturation and methylation of DNA.

**Keywords:** Organoids. Metilation. Intestinal Stem Cell. Pteroylpoliglutamic Acids

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido Pteroilmonoglutâmico (ácido fólico), estrutura no qual baseiam a atividade vitamínica de todos os folatos.....	23
Figura 2 – Dois modelos propostos para explicar a natureza da célula tronco intestinal e como esta alimenta o vilos.. .....	28
Figura 3 – Progressão da célula tronco intestinal rumo a diferenciação.. .....	32
Figura 4 - Representação esquemática da via canônica de sinalização Wnt.....	34
Figura 5 - Diagrama mostrando uma representação geral de um enteroide .....	37
Figura 6 - metilação de DNA. Em mamíferos a principal alteração epigenética consiste da adição covalente de um grupamento CH <sub>3</sub> ao carbono 5 da citosina formando 5-metil-citosina (5-mC). .....	39
Figura 7 - Diagrama esquemático exemplificando a geração de grupos experimentais obtidos a partir do cultivo de criptas isoladas do jejuno. ....	49
Figura 8 – Camundongos expostos à dieta deficiente em doadores de metil durante o período pré-natal apresentam peso acentuadamente baixo.....	58
Figura 9 - Camundongos expostos à dieta deficiente de doadores de metil durante o período pré-natal apresentaram peso acentuadamente baixo.....	59
Figura 10 - Comprimento de cauda de camundongos expostos à dieta deficiente em doadores metil no período pré-natal é significativamente inferior aos animais expostos à dieta controle sem antibiótico.....	59
Figura 11 - Diferenças no peso dos camundongos submetidos à diferentes dietas não pode ser explicado com base na diferença da ingestão de alimentos entre os animais dos diferentes grupos da dieta.....	60
Figura 12 - Níveis séricos de folato em valores absolutos (A) e em valores relativos ao controle (B) em animais expostos a dieta deficiente em doadores metil durante o período pre-natal e nas 7 semanas seguintes de vida. ....	61
Figura 13 - Efeitos hematológicos decorrentes da deficiência de folato em camundongos expostos à dieta deficiente em doadores de metil sugerem quadro compatível com anemia megaloblástica.. .....	64
Figura 14 - Profundidade de criptas de Jejunio (A) e íleo (B) em camundongos expostos à dieta deficiente de doadores de metil.....	64
Figura 15 - Histologia de íleo e jejuno de camundongos expostos à dieta deficiente de doadores metil desde o período pré-natal e sacrificados com sete semanas de	

vida.....	66
Figura 16 - Ileo de camundongos expostos a dieta deficiente em doadores metil, onde as diferenças na profundidade de cripta mostraram-se mais pronunciadas que no jejuno.....	66
Figura 17 - Criptas do jejuno mostrando a quantidade células marcadas com BrdU.....	67
Figura 18 - Enteroides cultivados a partir de criptas isoladas de jejuno de camundongos expostos às dietas controles e deficiente de doadores metil, cultivados em meio minigut regular (A) e minigut sem doadores metil (B) em passagem 0 (3 dias idade).....	69
Figura 19 Número de criptas/enteroide em enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivadas em minigut regular (A) e minigut sem doadores de metil (B).....	70
Figura 20 - Sobrevivência de enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivados em minigut regular (A) e minigut sem doadores de metil (B) em passagem 0 (zero).....	70
Figura 21 - Microscopia confocal e quantificação de células positivamente marcadas com EdU em enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivados em minigut regular. Magnificação:20x.....	71
Figura 22 – Enteróides derivados de criptas de animais expostos a dieta deficiente em doadores de metil possuem tamanho aumentado dos núcleo celular.....	72
Figura 23 - Fotografias representativas de enteroides com 6 dias de idade cultivados em meio minigut regular (A) e meio minigut reduzido em doadores metil, MDR (B).....	74
Figura 24 - Resultados significativos de PCR encontrados entre o grupo cultivado em minigut regular e minigut MDR.....	75
Figura 25 - Metilação global em células tronco intestinal em enteroides cultivados em meio minigut regular e minigut reduzido em doadores metil (MDR).....	76
Figura 26 – Metilação de DNA em células tronco intestinal em enteroides cultivados em meio minigut regular e minigut reduzido em doadores metil (MDR).....	76
Figura 27 - Hipótese proposta para explicar o aumento da profundidade de cripta associado ao uso de antibiótico no modelo utilizado pelo presente estudo ( <i>in vivo</i> ).....	85
Figura 28 - Hipótese mecanística envolvendo sinalização Wnt e os efeitos encontrados pelo presente estudo em enteróides. ....	92
Figura 29 – Explicação proposta para alongamento de cripta na deficiência de doadores de metil.....	94

Figura 30 - Modelo de integração proposto para conciliar o papel dos doadores de metil, especialmente o folato, com os efeitos observados pelo presente estudo sobre cripta e célula tronco intestinal.....102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas utilizadas para alimentação dos animais.	43
Tabela 2 – Materiais utilizados na composição da matriz de crescimento de enteróides	48
Tabela 3 – Composição do minigut utilizado no cultivo de enteroides murinos	50
Tabela 4 – Primers comerciais utilizados para PCR array da célula tronco intestinal	51
Tabela 5 – Sequência de primers e iniciadores utilizados no sequenciamento dos genes avaliados no presente estudo	56
Tabela 6 – Resultados da transcrição de genes de célula tronco e seus respectivos valores de p	74
Tabela 7 - Comparativo entre algumas das características mais comuns entre a deficiência de folato sobre o intestino e deficiência de folato sobre linhagem vermelha eritroide (anemia megaloblástica)	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variâncias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RCF	Força centrífuga relativa
G	Gauge
BMP	Proteína morfogênica óssea
PBS	tampão fosfato salina
DPBS	Tampão fosfato salina modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Min	Minuto
Edu	5-Etínil-2-deoxiuridina
BrDU	5-Bromo-2-deoxiuridina
LINE-1	<i>Long interspersed nuclear elements-1</i>
IAP	<i>Intracisternal A particle</i>
DMEM	Meio de Eagles modificado por Dubecco
HEPES	Ácido N-2-Hidroxi-etilpiperazil-N-2-Etanosulfônico
Bp	Pares de bases
CpG	Dinucleotídeo Citosina-fosfato-Guanina
CGI	Ilha de CpG
PCR	Reação em cadeia da polimerase
MCV	Volume corpuscular médio
RDW	Amplitude de distribuição do volume de hemácias
vs	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

°	Graus Celsius
%	Porcentagem
<b>™</b>	<i>Trade mark</i>
®	Marca registrada
μL	Microlitro
mL	Militro



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1. Enteropatia e deficiência nutricional</b> .....	19
<i>1.1.1. Alterações histológicas intestinais encontradas em áreas geográficas em desenvolvimento estão associadas ao mal funcionamento do intestino e déficit de crescimento.</i>	19
<i>1.1.2. Fome oculta na infância está relacionada com mecanismos que impedem não apenas o desenvolvimento físico, mas também mental e intelectual</i> .....	20
<i>1.1.3. O intestino é um órgão chave para a compreensão de como a deficiência de micronutrientes pode afetar os demais sistemas e órgãos no organismo.</i> .....	21
<b>1.2. Folatos são importantes micronutrientes requeridos à metilação de vários processos.</b>	22
<b>1.3. O intestino e sua organização</b> .....	24
<i>1.3.1. A unidade viloso-criptária representa a estrutura anatômica básica do epitélio intestinal</i>	24
<i>1.3.2. O epitélio intestinal é composto por múltiplos tipos celulares</i> .....	25
<i>1.3.3. Todos os tipos celulares da epitélio intestinal derivam de uma única célula</i> .....	26
<i>1.3.4. Dois modelos de célula tronco propõem-se a explicar como a atividade proliferativa da cripta alimenta todo o epitélio intestinal com células funcionais</i> .....	27
<i>1.3.5. Progressão da célula tronco intestinal para célula madura epitelial envolve a expressão de marcadores adicionais específicos</i> .....	30
<i>1.3.6. A homeostase da célula tronco intestinal é dependente da via de sinalização Wnt/<math>\beta</math>-catenina</i>	32
<i>1.3.7. A modulação da via Wnt/<math>\beta</math>-catenina é fundamental para o estabelecimento e cultivo de organoides intestinais a partir de células Lgr5+</i> .....	35
<b>1.4. Metilação do DNA</b> .....	38
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	41
<b>2.1 Geral</b> .....	41
<b>2.2 Específicos</b> .....	41
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1. Modelo murino de deficiência de doadores metil</b> .....	42
<b>3.2. Imuno-histoquímica</b> .....	44
<b>3.3. Dosagem de folato sérico</b> .....	45
<b>3.4. Hemograma</b> .....	46
<b>3.5. Morfometria intestinal</b> .....	46
<b>3.6. Enteroides murinos</b> .....	46
<b>3.7. Imunofluorescência</b> .....	51
<b>3.8. PCR-array para célula tronco intestinal</b> .....	51

3.9.	Perfil de metilação .....	53
3.10.	Análise quantitativa da metilação do DNA por sequenciamento por bissulfito .....	54
3.11.	Análise Estatística de metilação dos genes .....	55
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	57
4.1.	Exposição pré-natal e pós-natal da dieta deficiente em doadores metil .....	57
4.2.	Status de folato sérico .....	60
4.3.	Índices hematológicos .....	62
4.4.	Histologia .....	64
4.5.	Imuno-histoquímica .....	67
4.6.	Enteroides .....	68
4.7.	PCR array .....	73
4.8.	Metilação do DNA .....	75
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
5.1.	Oscilação dos valores de folato sérico encontrados no presente estudo .....	79
5.2.	Alterações hematológicas encontradas harmonizam-se com um esperado quadro de deficiência de folato em animais expostos a dieta deficiente de doadores de metil .....	79
5.3.	A heterogeneidade de transportadores ao longo do intestino delgado pode fornecer potencial explicação para o íleo ter sido o segmento mais afetado com a dieta deficiente de doadores de metil.....	81
5.4.	A hipertrofia de cripta associada ao uso de antibiótico pode estar relacionado ao papel na microbiota na produção de folatos e na diferença de biodisponibilidade entre folatos.....	82
5.5.	Contribuição do presente estudo ao modelo as doenças relacionadas a pobreza .....	85
5.6.	Enteróides derivados de animais expostos a dieta deficiente em doadores metil apresentam dismorfismo e função da célula tronco intestinal prejudicada que persiste mesmo sob condições otimizadas de cultivo.....	87
5.7.	Deficiência de doadores metil causa aumento transcricional de Atoh1 relacionado ao aumento do compartimento de progenitores comprometidos com a linhagem secretória .....	89
5.8.	A manifestação da deficiência de folato sobre o epitélio intestinal encerra muitas semelhanças com a deficiência de folato sobre o tecido conjuntivo sanguíneo.....	95
5.9.	Em enteróides a deficiência de doadores de metil associada a redução da marcação epigenética de genes relacionados a produção de mucinas.....	97
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	102
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Enteropatia e deficiência nutricional

#### *1.1.1. Alterações histológicas intestinais encontradas em áreas geográficas em desenvolvimento estão associadas ao mal funcionamento do intestino e déficit de crescimento.*

Em países em desenvolvimento grandes problemas de saúde pública como subnutrição e déficit do crescimento físico encontram-se intimamente associados à alterações histológicas intestinais cursando com uma inflamação crônica subjacente da mucosa (FAGUNDES-NETO et al., 1984; MORAIS; FAGUNDES NETO, 2003; MCKAY et al., 2010). Apesar de que tais alterações histológicas do intestino delgado terem sido reportadas em praticamente todas as áreas geográficas em desenvolvimento do mundo, raros são os estudos explorando tal fenômeno. Embora em humanos este fato possa a princípio sugerir haver pouca diligência no guiamento de tão importante aspecto da saúde infantil global, isto é compreensível, dado que estudos de intervenção nas comunidades avaliando a melhora das alterações histológicas como principal variável encontrarem uma série de barreiras práticas e éticas decorrente, principalmente, da obtenção de amostras de tecido (MCKAY et al., 2010).

A exata causa e patogênese da enteropatia ambiental ainda é incerta. Apesar disso, a literatura científica apoia fortemente a noção de que enteropatia ambiental contribui de forma relevante para um menor crescimento e desenvolvimento de crianças que vivem em áreas geográficas economicamente desfavorecidas. O fator chave para subnutrição infantil é desordem subclínica do intestino delgado, conhecido como enteropatia tropical, que é caracterizado por atrofia de vilus, hiperplasia de cripta, aumentado da permeabilidade intestinal e modesta mal- absorção (HUMPHREY, 2009). Apesar disso, os indivíduos portadores desta condição são assintomáticos e raramente manifestam algum sinal ou sintoma gastrointestinal.

As consequências derivadas das alterações intestinais excedem àquelas já conhecidas decorrentes do déficit de crescimento e falência das intervenções nutricionais. Existem relatos e evidências fortes o suficiente que sustentam a baixa eficácia de vacinas orais nas áreas onde a enteropatia ambiental tem alta prevalência (KORPE; PETRI, 2012; HAQUE et al., 2014). Quando comparada com crianças dos países desenvolvidos, há constatação de que vacinas orais para pólio e rotavírus são menos imunogênicas em crianças de países em desenvolvimento, sugerindo que uma alteração da imunidade cursa com a alteração da estrutura intestinal

(LEVINE et al., 2010; PATEL; STEELE; PARASHAR, 2012). Há um conjunto complexo onde alterações na microarquitetura intestinal se associa com retardo de crescimento, reduzida imunidade e uma série de outros problemas daí decorrentes, que poderão se manifestar após longo tempo na vida dos indivíduos afetados.

No tocante ao déficit de crescimento, estimativas atuais projetam haver no mundo haja cerca de 178 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade que padecem desse mal (BLACK et al., 2008). Não obstante a magnitude de tal número, as reais estatísticas podem em muito superar a estimativa levantada, pois muitos casos não são sequer reconhecidos como tal. Considerando famílias onde todos os membros, principalmente os pais, apresentam sistematicamente retardo do crescimento, uma criança que vir a apresentar déficit em altura despertará pouca atenção por intervenção, pois será tida como normal no *pool* genético daquela família (BIESALSKI, 2016; ORIÁ et al., 2016). A maioria absoluta dessas crianças vive em condições socioeconômicas onde, embora seja difícil determinar com exatidão a causa do retardo de crescimento, pode-se afirmar que a deficiência nutricional apresenta um papel de altíssima relevância. Verifica-se que em países em desenvolvimento, os fatores de maior relevância para baixo peso em crianças são, dentre vários outros, o pobre status nutricional das mães e, dado o contexto socioeconômico em que estas estão inseridas, o subsequente fornecimento de dieta pobre em micronutrientes para a criança nascida a partir destas mesmas mães.

### ***1.1.2. Fome oculta na infância está relacionada com mecanismos que impedem não apenas o desenvolvimento físico, mas também mental e intelectual***

Estima-se que mais de três bilhões de pessoas sofrem de vários tipos de deficiência causada por um ou mais micronutrientes. Entre estas, mulheres e crianças perfazem a maior parte dos afetados. É interessante notar como o fator peso sofreu mudança importante em sua relevância para a saúde global no curso das últimas décadas. Pela primeira vez na história humana, o risco de sofrer de males causados por sobrepeso ou obesidade sobrepuja o risco de baixo peso, de maneira tal que impactos na morbimortalidade já existem. Hoje a maioria da população mundial vive em países onde o sobrepeso e obesidade mata mais pessoas que a desnutrição (WHO, 2017). Foi visando discriminar entre os diferentes tipos de nutrição inadequada que o termo faminto oculto (*hidden hunger*) foi introduzido. Este termo tem a vantagem de descrever melhor o novo tipo de fome da situação contemporânea, sendo utilizado

para descrever a condição onde 1 ou mais nutrientes não estão presentes na dieta (BIESALSKI, 2013).

Tamanha ênfase dada à falhas de crescimento em crianças tem por base um fator de enorme relevância: déficit de crescimento funciona como um biomarcador para o desenvolvimento cerebral (BIESALSKI; BLACK, 2016). Nesse contexto, os primeiros anos de vida são particularmente importantes devido ao desenvolvimento vital que ocorre em todos os domínios. É nos primeiros anos de vida que o cérebro se desenvolve muito rápido, pois a cinética de muitos processos está acelerada como neurogênese, sinaptogênese, gliogênese, mielinização e também rápido crescimento axonal e dendrítico (GRANTHAM-MCGREGOR et al., 2007). É também no mesmo período que o cérebro encontra-se mais vulnerável a qualidade do ambiente onde subnutrição, stress, toxinas ambientais e pouca estimulação social podem afetar a estrutura e função do órgão, de acordo com modelos animais (MEANEY et al., 2000; RODIER, 2011).

À medida que se realiza uma análise mais reflexiva sobre a deficiência de micronutrientes verifica-se que os prejuízos decorrentes da fome oculta não recaem apenas sobre o indivíduo, mas também sobre suas comunidades e países, pois uma sociedade é tão próspera quanto prósperos são seus cidadãos. A existência e persistência de tais barreiras que impedem o desenvolvimento do potencial pleno mental e intelectual do indivíduo reflete na sociedade como um todo e repercute em baixos níveis educacionais, baixa produtividade e baixo poder aquisitivo (BLEASE, 2011)

### ***1.1.3. O intestino é um órgão chave para a compreensão de como a deficiência de micronutrientes pode afetar os demais sistemas e órgãos no organismo.***

A deficiência de micronutrientes impacta de forma ampla em toda a saúde do organismo apresentando consequências duradouras para a vida dos indivíduos. Contudo, a forma como a deficiência de certos micronutrientes impacta especificamente na saúde do intestino tem particular importância para compreensão de tal fenômeno dada a particularidade desse sistema orgânico e seu papel em responder aos desafios causados pela pobreza, subnutrição e suas combinações (GUERRANT et al., 2013). Representando a maior superfície de interface entre corpo e meio ambiente, o epitélio intestinal deve absorver nutrientes ao mesmo tempo que proporciona uma grande barreira de proteção ao organismo. Tais funções implicam em um custo metabólico muito elevado e faz do intestino o primeiro órgão a ser afetado sob condições de

nutrição inadequadas (VAN DER SCHOOR et al., 2002). A forma como intestino responde a tais condições ambientais é de grande importância para todos os demais sistemas e órgãos, afinal de contas todos os nutrientes passam obrigatoriamente pela barreira seletiva que o intestino representa.

Inserida no contexto da fome oculta, as vitaminas hidrossolúveis representam uma importante classe de micronutrientes. Suas deficiências podem apresentar efeitos deletérios ao correto funcionamento do organismo humano, uma vez que tais compostos são criticamente envolvidos na regulação do metabolismo energético e das funções enzimáticas, importantes para expressão gênica como aquelas que envolvem a metilação de muitos processos bioquímicos (BIESALKI, 2016).

### **1.2. Folatos são importantes micronutrientes requeridos à metilação de vários processos**

A deficiência de folato é causada por vários fatores, tais como insuficiência dietética, mal-absorção (por exemplo devido ao alcoolismo), situações que aumentem a necessidade do folato (gravidez, por exemplo) e uso de medicamentos (drogas anti-folato) (STABLER, 2009). Em primatas o sintoma mais evidente da deficiência do folato é a anemia megaloblástica, condição onde a inibição da maturação dos precursores eritrocitários causa um aumento do volume das hemácias. Outras patologias associadas à deficiência de folato incluem o retardo do crescimento e defeito do tubo neural

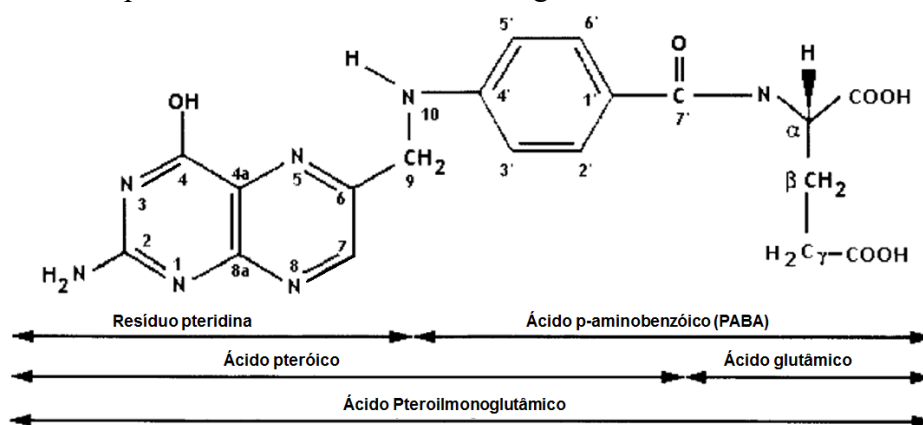
Células eucariotas e procariotas requerem o cofator folato como aceptor/doador de unidades de 1 carbono em uma variedade de processos biosintéticos (ROSSI; AMARETTI; RAIMONDI, 2011). Tais processos incluem a síntese de purinas e pirimidinas, precursores de ácidos nucleicos (WAGNER, 2001; CRIDER et al., 2012) e uma grande variedade de substâncias biológicas, incluindo fosfolípidios, aminoácidos, e neurotransmissores (TIBBETTS; APPLING, 2010). Folato entra ainda como cofator de importantes reações de metilação do DNA e assim contribui para efeitos epigenéticos (CRIDER et al., 2012).

É de grande relevância ressaltar a peculiaridade do folato ante aos demais substratos que podem ser doadores de grupos metil. Há algumas outras moléculas que também podem fornecer e transportar grupamentos metil (metionina, colina e vitamina B12); todavia, folato é o único capaz de geração *de novo* de grupos de 1 carbono. Daí advém a importância do folato

como o principal doador de substratos de 1 carbono (JACOB, 2000; CRIDER et al., 2012).

É importante ter em conta que o nome folato não designa uma molécula de estrutura específica e única, mas sim um termo genérico para todos os compostos de vitamina B hidrossolúveis cuja atividade vitamínica está baseada na estrutura comum do ácido fólico também nomeado como ácido pteroil-L-monoglutâmico (FINGLAS; WRIGHT, 2002). Como mostra a **figura 1**, a molécula do ácido pteroilmonoglutâmico consiste de um resíduo aromático de pteridina ligado através de uma ponte de metileno ao ácido p-aminobenzóico (PABA), principal precursor de folato na biossíntese bacteriana. A estrutura química resultante da união dessas duas moléculas, liga-se então um ou mais resíduos de ácido glutâmico. O ácido fólico é a forma mais oxidada e de maior estabilidade, não possui substituições no carbono e tem apenas um único resíduo de ácido L-glutâmico. Essa forma raramente acontece na natureza mas, devido sua estabilidade, é a forma mais adequada de folato para uso em suplementação vitamínica e para suplementação de alimentos (FINGLAS; WRIGHT, 2002; EBARA, 2017).

Folato é amplamente distribuído em uma grande variedade de alimentos e grande



*Figura 1 - Estrutura do ácido Pteroilmonoglutâmico (ácido fólico), estrutura no qual baseiam a atividade vitamínica de todos os folatos. O resíduo de pteridina com o ácido p-aminobenzóico (PABA) forma o ácido pteróico, estrutura comum a qualquer folato. A presença de substituintes no carbono alpha ( $\alpha$ ) determina os múltiplos tipos de folatos existentes na natureza ou folatos sintéticos. Fonte: (LUCOCK et al., 1989)*

número de formas que diferem entre si na redução do grupamento pteroil, na presença de substituintes do 1-carbono e no número de resíduos glutamyl ligado ao grupamento pteroil. Os dois tipos de folatos de maior abundância são o 5-metiltetrahydrofolato, que é amplamente distribuído em todos os alimentos, e 5 ou 10-formiltetrahydrofolatos que tendem a ser encontrados em alimentos de origem animal (TIBBETTS; APPLING, 2010; VISENTIN et al., 2014; EBARA, 2017).

Folatos alimentares existem em sua maior parte na forma de poliglutamato e, portanto, necessitam de hidrólise prévia para forma de folato monoglutâmico para serem então absorvidos pela mucosa intestinal. Tal hidrólise é provida pela gama-glutamil hidrolase (em humanos, glutamato carboxipeptidase II), enzima presente na borda em escova dos enterócitos que tem funcionamento ótimo sob pH 6,5 (HALSTED, 1980; WAGNER, 2001; VISENTIN et al., 2014).

Apesar da importância da fonte alimentar, folato pode também ser obtido por síntese em diferentes quantidades realizada pela microbiota intestinal. *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* são capazes de produzir folatos em altas concentrações enquanto outras espécies de bifidobacterium produzem folatos em concentrações bem inferiores (ROSSI; AMARETTI; RAIMONDI, 2011; LEBLANC et al., 2013).

### **1.3. O intestino e sua organização**

#### ***1.3.1. A unidade viló-criptá representa a estrutura anatômica básica do epitélio intestinal***

No adulto saudável o intestino possui uma área de cerca de  $32\text{m}^2$ , representando uma das maiores interfaces que o organismo possui em contato com o meio ambiente (HELANDER; FÄNDRIKS, 2014). Anatomicamente é dividido em dois segmentos bem definidos: intestino delgado e intestino grosso (ou colón). O intestino delgado pode ser subdividido em 3 três segmentos proximal-distal: duodeno, jejuno e íleo. A área absorptiva do intestino delgado esta dramaticamente aumentada no duodeno graças a presença protruções semelhantes a dedos, que se projetam em direção ao lúmen, os chamados vilos. Rodeando os vilos há invaginações da submucosa conhecidas como criptas de Lieberkuhn. A mucosa do intestino grosso é desprovida de vilos enquanto as criptas lá existentes invaginam em grande profundidade na submucosa (BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008).

O trato gastrintestinal é revestido com uma camada de epitélio colunar simples que é crítico para digestão e absorção de nutrientes, bem como para prover uma importante barreira física e físico-química entre o lúmen intestinal e o organismo. A capacidade regenerativa do epitélio intestinal é crítico para a manutenção da homeostase tecidual e reparo que se segue após a injúria sendo este um processo que requer respostas apropriadas da célula epitelial incluindo proliferação, migração, diferenciação e apoptose (DUBÉ; SOH; POLK, 2014).



Os miofibroblastos epiteliais formam uma espécie de rede trabecular rodeando toda a extensão da cripta e desempenham um papel vital nas interações epitélio-mesênquima e na regulação da diferenciação das células epiteliais através da secreção de diversos fatores de crescimento. Dentre tais fatores, destacam-se fator de crescimento hepático (HGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), e outros fatores de crescimento como lipídios da via de sinalização Wnt (JALADANKI; WANG, 2016) discutida em detalhes mais adiante.

Células tronco dentro de muitos tecidos adultos residem dentro de um nicho formado por estruturas e células que a rodeiam. O nicho da célula tronco intestinal é uma estrutura anatômica composta por células tronco, sua progênie e elementos do microambiente. Juntos, estes elementos coordenam a produção homeostática das células funcionais maduras. Uma importante função do nicho é prover blindagem ambiental que sequestra as células tronco de vários estímulos, tais como diferenciação e apoptose, protegendo-as ainda do risco de produção excessiva ao isolá-las de potenciais substâncias mutagênicas (MOORE; LEMISCHKA, 2006; BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008).

### ***1.3.2. O epitélio intestinal é composto por múltiplos tipos celulares***

A camada epitelial que recobre o intestino é composta por múltiplos tipos celulares onde cada tipo é especializado no desempenho de atividades específicas. Quando completamente maduros, os principais tipos celulares que compõem a mucosa intestinal podem ser categorizados em duas linhagens: secretória e absorptiva.

A linhagem absorptiva é composta pelos enterócitos. A linhagem secretória é composta pelas células de Paneth, Globlet, enteroendócrinas e células Tuft (MORI-AKIYAMA et al., 2007). A abundância relativa de cada tipo celular varia ao longo de cada segmento intestinal. Enterócitos, que são as células absorptivas, perfazem o tipo celular mais abundante no intestino delgado, sendo responsáveis pela absorção de nutrientes a partir dos alimentos e pela secreção de um coquetel de enzimas hidrolíticas no interior do lúmen. Células enteroendócrinas representam uma pequena fração, sendo responsáveis pela secreção de um grande número de hormônios entre os quais estão incluídos serotonina, substância P e secretina (SCHONHOFF; GIEL-MOLONEY; LEITER, 2004). Células de Paneth são encontradas apenas na base da cripta do intestino delgado. Elas secretam agentes antimicrobianos como criptidinas (defensinas) e lisozima, que desempenham um papel essencial no controle do ambiente microbiológico do

intestino (PORTER et al., 2002). As células Goblet são responsáveis pela produção de mucinas e vários polissacarídeos que compõe o muco que reveste a mucosa intestinal, protegendo-a do contato direto com microrganismos e lubrificando o movimento do conteúdo luminal ao longo do tubo digestivo. Outros tipos celulares são encontrados com menor frequência na mucosa intestinal normal mas não serão abordados aqui.

Possuindo a mais rápida taxa de auto renovação no organismo, a capacidade da mucosa intestinal em manter-se íntegra depende em grande parte da capacidade de células responderem a contínua demanda de células para repor as que naturalmente morrem (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Essa rápida capacidade proliferativa é mantida graças a um *pool* heterogêneo de células tronco intestinais localizados na base de cada uma das criptas, que permite a regeneração e diferenciação de todos os tipos de células do epitélio intestinal. Essa população de células tronco consiste de células distintas expressando diferentes níveis de numerosos marcadores ao longo do eixo de comprimento da cripta (DUBÉ; SOH; POLK, 2014). Como as demais células tronco de tecidos adultos, a célula tronco intestinal apresenta duas características de grande relevância: (1) longevidade, a população de células tronco do tecido deve ser mantida por um longo período tempo, geralmente toda a vida do organismo; (2) pluripotência, muitas células tronco encontradas no adulto são capazes de gerar múltiplos tipos celulares (BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008).

### *1.3.3. Todos os tipos celulares do epitélio intestinal derivam de uma única célula*

A Teoria Unitariana foi proposta originalmente por Cheng e Leblong (1974) e afirma que todos os tipos de linhagens celulares existentes no epitélio que reveste o trato gastrointestinal é derivada de um único tipo de célula tronco intestinal comum a todas aquelas linhagens (CHENG; LEBLOND, 1974a). Este é um conceito de grande importância na compreensão de muitos fatores relacionados a natureza da célula tronco intestinal e de grande aplicação na patobiologia de muitas afecções do trato gastrointestinal e será referido amiúde pelo presente trabalho.

Evidências que apoiam a Teoria Unitariana derivaram da observação de que uma única célula sustentava em si a capacidade de regenerar todas as populações de células epiteliais da cripta e vilos após tratamento citotóxico que destruía todas as células tronco presentes na cripta de intestino de rato, experimentação demonstrada através do ensaio de microcolônia de cripta.

Uma técnica que consiste em radiação intensa e persistente de criptas intestinais até restar uma única célula por cripta. Desde que conte com pelo menos uma única célula tronco viva, a cripta é capaz de persistir produzindo regeneração de diversos tipos celulares que se encontram em condições fisiologicamente normais daquela cripta (WITHERS; ELKIND, 1970).

Mais recentemente o emprego da tecnologia de organoides demonstrou *in vitro* que uma única célula tronco intestinal pode dar origem ao chamados enteróides, capazes de manter a estrutura cripta-vilos do intestino e manter todos os diversos tipos celulares encontrados no epitélio intestinal (SATO et al., 2009).

#### ***1.3.4. Dois modelos de célula tronco propõem-se a explicar como a atividade proliferativa da cripta alimenta todo o epitélio intestinal com células funcionais***

A forma precisa pela qual as células tronco intestinais preservam sua identidade indiferenciada assegurando longevidade e pluripotência, ao mesmo tempo em que alimentam de forma contínua todo o corpo do vilos com células maduras e diferenciadas, tem sido objeto de debate por muitos anos (JALADANKI; WANG, 2016). Há décadas existem dois modelos que tentam explicar como esse mecanismo opera. Apesar de serem antigos, continuam sendo utilizados pela falta de marcadores específicos ou de prova definitiva capaz de confirmar ou rechaçar um ou outro conceito (JOHNSON, 1979; BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008). Os dois modelos são conhecidos como modelo da Posição +4 (também conhecido como modelo clássico) e modelo da zona de célula tronco, como mostrados na figura 2.

Evidências em suporte ao modelo clássico (posição +4) têm sido providas por Potten e colaboradores (1974) tendo por base um modelo animal murino que submetia à criptas a 8 dias de irradiação. Uma vez cessada a radiação e tratamento com pulsos de timidina tritiada, os autores verificaram que havia uma retenção dessa timidina em células localizadas na altura da posição +4, relativa ao ponto mais baixo da cripta, imediatamente superior a mais alta célula de Paneth, e que essa mesma célula era capaz de manter o *template* original de DNA (POTTEN; KOVACS; HAMILTON, 1974; MARSHMAN; BOOTH; POTTEN, 2002).

Em linhas gerais, o modelo clássico ou posição +4 afirma que a base da cripta é habitada por células de Paneth terminalmente diferenciadas estando as células tronco localizadas exatamente acima das células de Paneth (localizadas na posição +4 a partir da base da cripta). Ainda conforme o mesmo modelo, enterócitos, células Goblet e células enteroendócrinas são

derivadas de um progenitor oriundo da célula tronco localizada na posição +4 que vai diferenciando a medida que migra para fora da cripta em direção ao vilos. Por outro lado, a célula de Paneth se diferencia à medida que faz uma migração descendente da posição +4 em direção ao fundo da cripta (BARKER; CLEVERS, 2007; DOSSA et al., 2015; JALADANKI; WANG, 2016).

O modelo da Zona de célula tronco foi proposto por Leblond e colaboradores sendo baseado na descoberta de células colunares da base da cripta (CBC), que são células pequenas, indiferenciadas e proliferativas, que estão ocultas entre as células de Paneth ocupando a base da cripta abaixo da posição +4. A população destas duas células seriam as verdadeiras células tronco (CHENG; LEBLOND, 1974b).

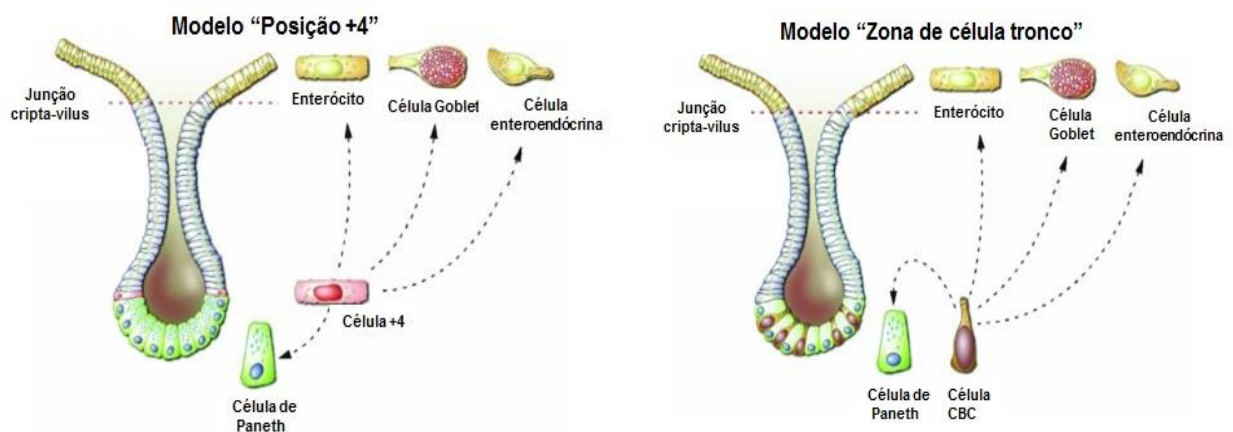


Figura 2 – Dois modelos propostos para explicar a natureza da célula tronco intestinal e como esta alimenta o vilos. À esquerda o modelo da “Posição +4” que assume que a base da cripta é habitada apenas por células de Paneth estando a célula tronco intestinal localizada na Posição +4, imediatamente acima das células das células de Paneth. À esquerda o modelo da “Zona de célula tronco” assume que a célula tronco residiria na base da cripta sendo intercaladas entre as células de Paneth. Apesar dos dois modelos terem sido propostos há quatro décadas, não há provas suficientes para rechaçar um ou outro modelo. Fonte: BARKER; WETERING; CLEVERS., 2008.

Embora a verdadeira identidade da célula tronco há muito tempo permanece um

problema a ser solucionado, há um consenso estabelecido de que existe pelo menos duas categorias funcionais de célula tronco intestinal (MUÑOZ et al., 2012; DOSSA et al., 2015; CUI; CHANG, 2016):

- (1) - células da base colunar da cripta (CBC) que são células de rápida ciclagem;
- (2) - células que compõe a reserva quiescente de célula tronco (no modelo clássico estas células estariam dispostas ao longo de um anel localizado na posição +4 da cripta; no modelo da “zona de célula tronco” tais células ocupariam a base da cripta intercalando-se com as células de Paneth).

A natureza e identidade precisa entre as células tronco intestinais quiescentes e de rápida ciclagem ainda carece de estudos mais efetivos, de forma a identificar possíveis marcadores capazes de distinguir entre os dois tipos. O gene *Lgr5* codifica um receptor transmembrana que representa um dos principais alvos da via Wnt, sendo expresso em células localizadas a base da cripta posicionadas entre as células de Paneth. Tais células respondem pelo rápido *turnover* homeostático intestinal requerido pelo organismo (CLEVERS, 2013). Colocadas em outras palavras, células *Lgr5*<sup>+</sup> representam o “cavalo de força” entre as células tronco, sendo responsáveis pelo suprimento diário de células à cripta requerido para a contínua auto renovação do epitélio intestinal. Enquanto isso um pool de células tronco quiescentes (pool de reserva) pode existir localizado acima da base da cripta (LI; CLEVERS, 2010).

Nos mamíferos o gene *Ascl2* é homólogo ao gene da mosca drosófila *Achaete scute complex* (JOHNSON; BIRREN; ANDERSON, 1990) e codifica um fator de transcrição cujo padrão de expressão é altamente restrito. Durante o desenvolvimento é encontrado em tecidos extraembrionários, mas no adulto *Ascl2* é altamente controlado e restrito apenas à célula tronco intestinal sendo sua expressão muito dependente de Wnt (VAN DER FLIER et al., 2007, 2009; MUÑOZ et al., 2012). Dado o fato de que a deleção de *Ascl2* resulta na completa perda de células *Lgr5*<sup>+</sup> e sua aumentada expressão transgênica induz o surgimento de criptas hiperplásticas e ectópicas no vilos (VAN DER FLIER et al., 2009), *Ascl2* é considerado um regulador mestre do programa transcricional da célula tronco intestinal (SCHUIJERS et al., 2015; YAN; KUO, 2015).

A proteína *Bmi1* é necessária para renovação de células neurais e de células hematopoiéticas e leucêmicas (LEUNG et al., 2004; BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008). Na cripta *Bmi1* é expresso sobretudo em células na posição +4 acima das

células de Paneth como confirmou estudos com camundongos transgênicos marcados com YFP-Bmi1+. Células Bmi1+ foram consideradas como as principais candidatas a célula tronco de reserva da cripta, mas trabalhos recentes têm questionado tal assertiva. Estudos de seguimento da linhagem a longo prazo mostrou que tais células possuem cinética similar a Lgr5+ e que possivelmente Lgr5+ e Bmi1+ apresentam alguma sobreposição de marcadores ou talvez sejam a mesma população de células (SANGIORGI; CAPECCHI, 2008), embora outros estudos afirmem que se trata de duas populações celulares muito distintas. Há também evidências em suporte de que células Bmi1+ são, de fato, células tronco quiescente; entretanto, difere da linhagem quiescente intestinal por não sofrer influências da concentração de Wnt secretado no meio (YAN et al., 2012).

Com evidências atestando contra Bmi1 como marcador da célula tronco quiescente, outras proteínas de outros três genes distintos foram propostas como potenciais alvos: Tert, Hopx e Lrig1 (MUÑOZ et al., 2012). O inibidor pan-Erb, *Lrig1*, identifica um tipo de célula bem distinto das células tronco Lgr5+ e que exibem um taxa de proliferação mais baixa que Lgr5+. *Lrig1*+ são células normalmente quiescentes e proliferam após a lesão ou dano da cripta, sugerindo que tais células desempenham um importante papel na proteção do epitélio intestinal (POWELL et al., 2012).

Apesar da falta de uma assinatura definida da célula tronco intestinal, é possível afirmar que Lgr5 certamente representa o principal marcador da célula tronco de alta ciclagem e desempenha importante papel no rápido *turnover* da cripta. A falta de consenso para Bmi1 o coloca como um marcador ambíguo para ambos tipos (alta ciclagem e quiescente), ao passo que *Lrig1* é apoiado por fortes indícios de ser um marcador associado apenas a reserva quiescente. Nesse contexto, *Ascl2* desempenha um importante papel ao reforçar a identidade da célula tronco de reserva respondendo a ativação através de Wnt.

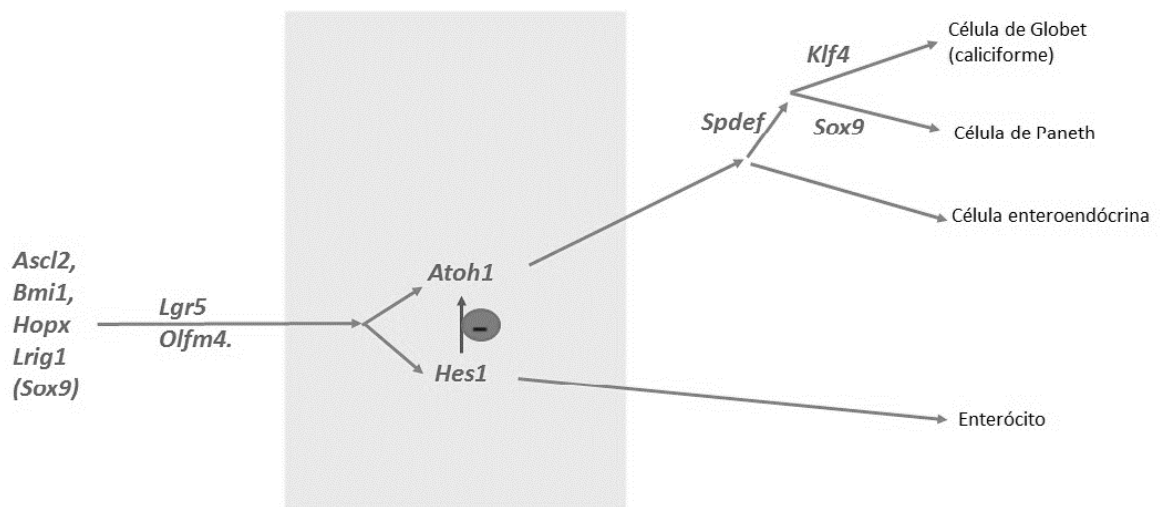
### ***1.3.5. Progressão da célula tronco intestinal para célula madura epitelial envolve a expressão de marcadores adicionais específicos***

Embora a assinatura da célula tronco intestinal baseada nos marcadores expressos por tais células continuem um problema ainda a ser superado, a identificação das células progenitoras e diferenciadas representam menor problema. A presente seção aborda como a expressão de diferentes marcadores está relacionado com o direcionamento de células tronco e progenitoras em direção a uma das linhagem maduras funcionais encontradas na mucosa

intestinal, como mostrada na figura 3.

Como discutido anteriormente as linhagens celulares da mucosa intestinal podem ser secretória ou absorptiva. Células da linhagem secretória derivam de progenitores expressando o gene *Atonal Homolog 1* (*Atoh1*, também chamado *Math1*). Em camundongos, a deleção de *Atoh1*, que é um fator de transcrição e componente terminal da via de sinalização Notch, depleta o número de Células de Goblet, de Paneth e células enteroendócrinas no intestino delgado. Tal dado indica que a transcrição de *Atoh1* é fundamental para o comprometimento da célula tronco intestinal para uma das três células epiteliais adultas (YANG et al., 2001). Altos níveis de Notch causa aumento da expressão do um repressor transcricional Hes1 que, por seu turno, bloqueia a expressão de *Atoh1* (*Math1*) levando as células progenitoras a se tornarem enterócitos absorptivos e reduz o número de células comprometidas com a diferenciação da linhagem secretória (SUZUKI et al., 2005). De forma recíproca, a baixa sinalização de Notch eleva a expressão de Hes1 o que leva a maior formação de progenitores comprometidos com a linhagem secretória (enteroendócrinas, Goblet e Paneth) (VAN DEN BRINK; DE SANTA BARBARA; ROBERTS, 2001).

Uma vez que a expressão de *Atoh1* leva ao comprometimento dos progenitores com a linhagem secretória, a posterior expressão de marcadores adicionais irá determinar a diferenciação terminal de tais progenitores com uma das três linhagens adultas: a expressão de Neurogenina (*Neurog 3*) leva a diferenciação em células enteroendócrinas (JENNY et al., 2002; SCHONHOFF; GIEL-MOLONEY; LEITER, 2004); a expressão de *SRY-box containing gene* (*Sox9*) responsável pela diferenciação e maturação de células de Paneth (BASTIDE et al., 2007; MORI-AKIYAMA et al., 2014); E, por fim, a diferenciação dos progenitores em células de Goblet exige a expressão do *Kruppel like factor 4* (*Klf4*) (KATZ et al., 2002). *SAM pointed domain containing Ets transcription factor* (*Spdef*) leva os progenitores da linhagem secretória para um passo à frente causando o comprometimento destes com um subtipo específico da linhagem que poderão se tornar células de Paneth ou Células Goblet (GREGORIEFF et al., 2009).



*Figura 3 – Progressão da célula tronco intestinal rumo a diferenciação. À esquerda da figura estão elencados alguns dos principais genes relacionados a expressão da célula tronco. Lgr5 e Olfm4 recebem especial destaque por serem os principais genes relacionados a célula tronco de alta ciclagem. O centro do retângulo hachurado dá destaque ao gene expresso nos progenitores da linhagem secretória (Atoh1) e absorptiva (Hes1). Destaca-se também a relação inibitória promovida pela expressão de Hes1 sobre Atoh1 o que causa redução da linhagem secretória. Mais à direita genes adicionais causam a diferenciação terminal para uma das quatro linhagens principais do epitélio intestinal. Fonte: elaborado pelo autor.*

### **1.3.6. A homeostase da célula tronco intestinal é dependente da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina**

Como comentado anteriormente, as células tronco de diferentes tecidos vivem em nichos específicos que, dentre muitos atributos, protegem-nas de agentes externos, tendo grande importância na manutenção da identidade de tais células. Outro ponto de grande relevância a ser considerado no nicho é a presença de diferentes vias de sinalização tais como Wnt, BMP (proteína morfogênica óssea), Notch, Ephrin, PI3 AKT e JAK/STAT1, que desempenham importante papel na regulação da renovação do epitélio intestinal e na função da célula tronco intestinal (BARKER; VAN DE WETERING; CLEVERS, 2008). Dentre estas, a via Wnt tem um papel de grande destaque na manutenção da célula tronco intestinal. Trata-se de uma via altamente conservada no reino animal controlando a especificação, destino e diferenciação celular em muitas espécies, desde a mosca drosófila até o homem (BISWAS et al., 2015).

A via de sinalização Wnt foi a primeira via a ser demonstrada ter papel na regulação de célula tronco intestinal. Hoje sabe-se que possui um papel central e único na regulação do



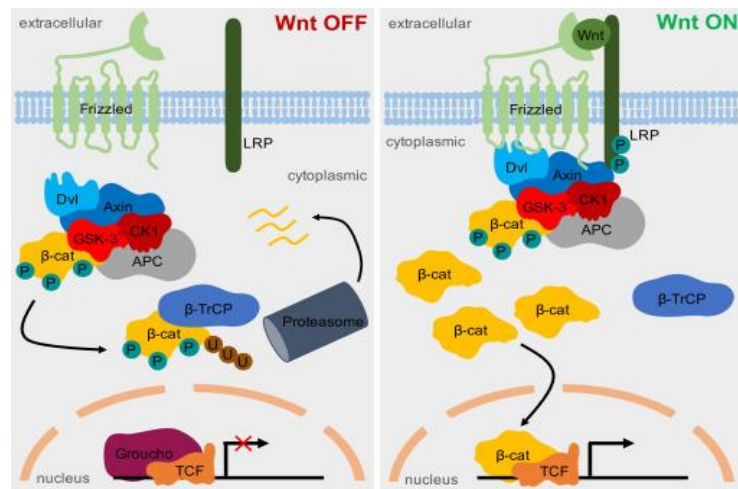
processo de renovação celular sob condições biológicas, representando a principal força dominante subjacente à atividade proliferativa da cripta e também a principal causa de câncer de colón ou de intestino após a ativação de sua mutação (JOHNSON, 1979; KRETZSCHMAR; CLEVERS, 2017), sendo descritos até o momento 19 genes de Wnt nos genomas de camundongos e de humanos (CLEVERS; NUSSE, 2012; PRESTON et al., 2014).

Embora a cripta seja também capaz de produzir Wnt, em grande parte secretada por células de Paneth, os miofibroblastos epiteliais representam uma importante fonte de Wnt *in vivo*. O funcionamento correto da via Wnt assegura o equilíbrio adequado da divisão celular entre progenitores e células tronco sendo também de grande importância para as novas células divididas e que se encontram em migração ao longo do eixo cripta-vilos (PINTO et al., 2003)

Além da importância para as células tronco, a sinalização de Wnt é necessária para a maturação e diferenciação das células de Paneth na base da cripta. As células de Paneth migram orientadas pelo alta concentração de Wnt existente na base da cripta, sendo também requerida concentrações maiores para que a célula de Paneth se diferencie e atinja o nível de maturação adequado.

Genes Wnt codificam moléculas de sinalização que são componentes de uma cascata de transdução (via de sinalização Wnt). Os ligantes Wnt iniciam a ativação da via através da interação com receptores de superfície da família Frizzled (FZD). A ativação da via canônica de Wnt, frequentemente referida como Wnt/ $\beta$ -catenina, tem como efetor intracelular chave a proteína  $\beta$ -catenina e requer a ativação do co-receptor LRP. As demais vias não-canônicas não serão tratadas aqui.

O mecanismo de ativação da via é mostrado na figura 4. Na ausência de ligantes, os receptores Frizzled e LRP permanecem inativos e  $\beta$ -catenina citoplasmática é sequestrada por um complexo de destruição contendo diferentes componentes como APC e Axina.  $\beta$ -catenina é presa e fosforilada por duas quinases do complexo de destruição, caseína quinase 1 (CK-1) e glicogênio sintase kinase 3 (GSK-3). Posteriormente a  $\beta$ -catenina fosforilada é reconhecida por uma E3 ligase que a ubiquitina para um proteossoma de degradação (KRETZSCHMAR; CLEVERS, 2017).



*Figura 4 - Representação esquemática da via canônica de sinalização Wnt, que é inativa na ausência de ligantes (painel à esquerda). No painel à direita, a ativação dos receptores Frizzled e LRP por Wnt determina a formação de um complexo que fosforila  $\beta$ -catenina, fazendo-a migrar para o núcleo e deslocar fatores de transcrição TCF/LEF, levando a expressão de vários genes alvos da via. Fonte: KRETZSCHMAR; CLEVERS, 2017*

A presença de ligantes une os receptores Frizzled e LRP levando a fosforilação da unidade de LRP com consequente formação de um complexo intracelular que inclui Dishevelled (Dvl), GSK-3, APC, CK-1 e Axina. O complexo formado liga-se a  $\beta$ -catenina e a fosforila. Uma vez fosforilada,  $\beta$ -catenina migra para o núcleo e desloca o complexo repressor Groucho, formado por TCF (fator de célula T) e LEF (fator linfóide amplificador). Assim, uma variedade de genes alvos da via Wnt podem ser expressos (KRETZSCHMAR; CLEVERS, 2017).

O silenciamento de TCF4 e  $\beta$ -catenina ou a inibição da atividade Wnt através do aumento de expressão do seu inibidor natural Dkk-1 inibe a proliferação de células tronco na cripta. Por outro lado, a mutação de APC (um regulador negativo de Wnt) ou a expressão de formas oncogênicas de beta-catenina causam hiperproliferação.

Os genes alvo da via de sinalização Wnt permanecem um objeto de intenso estudo. Até o momento estima-se que o genoma humano possua 89 genes alvo da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Contudo, novos genes alvos provavelmente serão identificados (HÖDAR et al., 2010). Dentre os genes alvos da via de sinalização Wnt, grande parte identifica marcadores de

célula tronco. Muitos dos genes que expressam marcadores já discutidos em seções anteriores do presente trabalho são controlados pela via Wnt, tais como *Sox9*, *Lrig1*, *Ascl2* e *Lgr5*. A expressão de *Lgr5*, que ocorre em células tronco em sítios de intensa proliferação, é uma consequência direta de sinalização ativa de Wnt (DE LAU et al., 2014).

### ***1.3.7. A modulação da via Wnt/ $\beta$ -catenina é fundamental para o estabelecimento e cultivo de organoides intestinais a partir de células Lgr5+***

Os recentes avanços na compreensão da dinâmica de manutenção e diferenciação de célula tronco têm permitido o estabelecimento de uma importante tecnologia de tecidos e órgãos: o cultivo de organoides. Tratam-se estes de estruturas multicelulares compostas por diversos tipos de células e capazes de auto-organização, representando função e estrutura do órgão de origem. São utilizados como modelos para o desenvolvimento do órgão, manutenção e reparo *ex-vivo*. Podem ser obtidos a partir de células tronco embrionárias (ESC), células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ou a partir de células tronco adultas (SCHUTGENS; VERHAAR; ROOKMAAKER, 2016). Organoides são chamados de diferentes nomes conforme o órgão que representam. No caso particular do intestino podem ser chamados de enteroides (intestino delgado) ou colonóides (intestino grosso).

O desenvolvimento dos enteroides tornou-se possível graças a identificação de células tronco intestinais adultas expressando *Lgr5*. Por outro lado, a modulação da via de sinalização Wnt mostrou-se de crucial importância no estabelecimento e manutenção de tais culturas. Por exemplo, R-Spondina e Noggin são dois fatores de crescimento essenciais para o cultivo de organoides a partir de células intestinais *Lgr5+* e agem modulando de forma direta ou indireta a sinalização da via Wnt. R-Spondina interage na superfície celular com membros da família do receptor *Lgr5* e potencializa a atividade da via de sinalização Wnt (GLINKA et al., 2011).

A atividade de Noggin na potencialização de Wnt acontece de forma menos direta. A via de sinalização BMP (proteína morfogênica óssea) tem vários receptores expressos em células epiteliais e mesenquimais; receptores estes cuja a ativação por seus respectivos ligantes causa a repressão da via Wnt, limitando a replicação da célula tronco *Lgr5+* e favorecendo a diferenciação terminal (BISWAS et al., 2015; QI et al., 2017). Noggin inibe a via BMP e, desta forma, favorece indiretamente o aumento da sinalização da via Wnt.

A geração de camundongos expressando *Lgr5*-GFP tem permitido a purificação de

células tronco intestinais Lgr5<sup>+</sup> utilizando técnicas de citometria de fluxo. No cultivo de enteroides, células tronco isoladas do epitélio crescem suspensas em Matrigel, uma matriz rica em colágeno e laminina, que mimetiza as propriedades da lamina basal (DE LAU et al., 2014). Adiciona-se ao meio de cultivo um coquetel contendo fator de crescimento epitelial (EGF), R-Spondin1 (Rspo1) e Noggin, tais são fatores suficientes para a manutenção dos sinais da célula tronco sem presença do nicho mesenquimal (SATO et al., 2009; SATO; CLEVERS, 2013; SCHUIJERS et al., 2015). Assim, cultivado a partir da célula tronco o enteroide apresenta os diferentes tipos celulares encontrados na mucosa intestinal adulta (SATO et al., 2009).

A figura 5 mostra uma representação geral de um enteroide. As células cultivadas multiplicam-se indefinidamente e formam esferas com um lúmen central e corpos em protrusão que correspondem às criptas. O lúmen central desses enteroides corresponde ao lúmen do intestino com as células epiteliais densamente unidas, polarizadas e completamente diferenciadas. Células diferenciadas descamam por apoptose e são descartadas no lúmen do

enteroide (SCHUIJERS; CLEVERS, 2012).

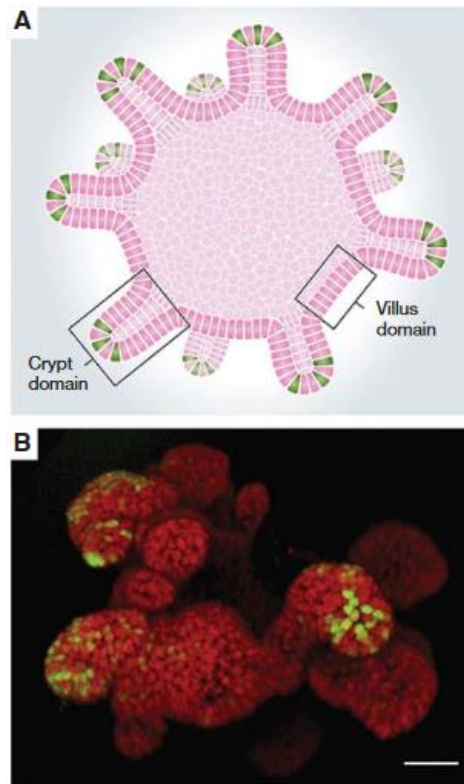


Figura 5 - A- diagrama mostrando uma representação geral de um enteroide onde podem ser vistos os domínios de cripta (protrusões que saem do corpo do enteroide) e o domínio d vilos. B – Fotografia microscopia confocal de um enteroide intestinal onde as células verdes no fundo do domínio de cripta indicam células *Lgr5+* Tamanho da escala = 50 $\mu$ m. Fonte: SCHUIJERS CLEVERS, 2012.

#### 1.4. Metilação do DNA

A sequência do genoma humano e de vários outros animais estão completas e encontram-se disponíveis em bancos de dados públicos. Porém, a sequência primária do DNA é apenas o básico alicerce necessário à compreensão de como o programa genético é lido e executado. Sobre a sequência de DNA existe uma outra camada hereditária de informação que desponta agora a ser lida e apreciada, trata-se da epigenética. Esta informação epigenética está armazenada como modificações químicas na sequência do próprio DNA sem que este tenha sua natureza alterada. Através da regulação da estrutura da cromatina e a acessibilidade ao DNA, tais alterações químicas influenciam como o genoma se faz manifestar através de uma ampla gama de estágios de desenvolvimento do organismo, tipo de tecido e estados fisiopatológicos (GOLL; BESTOR, 2005; BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007).

As modificações epigenéticas em genomas de mamíferos são classificadas em duas categorias principais: metilação de DNA e modificação de histonas (um dos principais componentes da cromatina). O core das histonas que compõem o nucleossomo são passíveis de sofrerem mais de 100 diferentes modificações pós-translacionais, inclusive acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Tais modificações acontecem na cauda amino-terminal das histonas (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). Há indícios de uma influência bidirecional entre metilação de histonas e DNA, onde a metilação de histonas pode influenciar a metilação de DNA e, por sua vez, o DNA metilado pode servir como molde para o estabelecimento de certas modificações de histonas após a replicação do DNA (ROBERTSON, 2005; JIN; LI; ROBERTSON, 2011). A modificação epigenética de histonas não será abordado nesse texto.

Do ponto de vista molecular, a metilação do DNA é a adição covalente de grupamentos metil (-CH<sub>3</sub>) diretamente na cadeia de DNA por uma família de enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMTs). Em mamíferos, a metilação do DNA é feita na posição C-5 do anel do resíduo de citosina formando 5-metilcitosina (5-mC) (ROBERTSON, 2005), como mostrado na figura 6. Em células somáticas de mamíferos, mais de 98% da metilação acontece na citosina (C) que encontra-se ligada a guanina (G) formando o que se chama CpG dinucleotídeo; em células tronco embrionárias, cerca de 25% acontece fora do contexto CpG (LISTER et al., 2009).

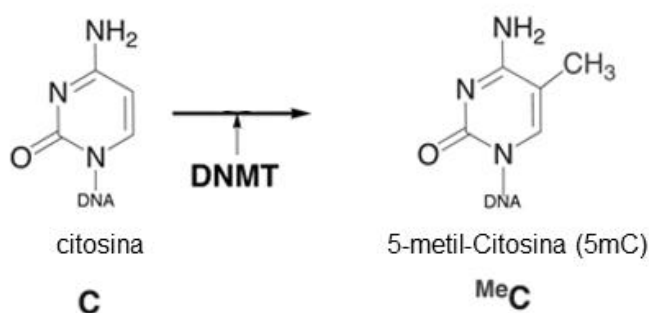


Figura 6 - metilação de DNA. Em mamíferos a principal alteração epigenética consiste da adição covalente de um grupamento  $\text{CH}_3$  ao carbono 5 da citosina formando 5-metil-citosina (5-mC). Este processo é catalisado por uma família de enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMT)

Em mamíferos a família de DNMTs é composta por quatro enzimas: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L (OKANO et al., 1999; CHENG; BLUMENTHAL, 2008). DNMT3a e DNMT3b têm preferência por CpG não metilados e catalisam metilação *de novo* durante a fase de desenvolvimento, sendo auxiliadas por DNMT3L, que não possuem atividade catalítica própria.

DNMT1 é o tipo de DNMT mais abundante no citoplasma celular. Sua ação primária é agir como uma metiltransferase de manutenção para metilar DNA semi-metilado após a replicação do DNA e, desta forma, exibir o padrão de metilação do DNA parental. Dessa forma, DNMT1 mantém e assegura a marcação epigenética como um fator estável e hereditário (ROBERTSON, 2005; CRIDER et al., 2012).

A aparente divisão entre metiltransferase de manutenção e metiltransferase para síntese *de novo* não é estanque. Cooperação entre diferentes tipos de DNMT é requerida para a metilação de algumas regiões genômicas, particularmente elementos repetitivos. Há indícios de que, durante a fase de replicação, DNMT1 também pode ser requerida para metilação *de novo* e que DNMT 3a/3b colaboram para a manutenção do padrão de metilação (RIGGS; XIONG, 2004; EGGER et al., 2006).

Em mamíferos a maioria dos CpGs são encontrados nas chamadas ilhas de CpG, regiões genômicas onde há alta densidade dinucleotídeos CG. Quase sempre tais regiões são encontradas associadas à promotores de genes. Entretanto, é importante lembrar que CpG encontrado em tais ilhas tendem a ser protegidos de metilação, pois de uma forma geral a metilação em ilhas CpG significa sinônimo quase universal do silenciamento daquele dado gene

(BIRD, 1986; SONG et al., 2005). Um exemplo de grande importância é a inativação do cromossomo X nas fêmeas de mamíferos, um fenômeno conhecido como compensação de dosagem. Fêmeas possuem dois cromossomos X, ao passo que o macho possui 1 X e 1 Y, mas nas células das fêmeas apenas um cromossomo X encontra-se ativo estando o outro cromossomo densamente compactado e inativo. Esse processo de inativação e compactação ocorre envolvendo a metilação nas ilhas CpG (JONES, 2012).

Existem alguns possíveis mecanismos pelos quais a metilação de dada sequência de DNA pode causar o silenciamento de genes. O primeiro deve-se ao fato de que os CpG's metilados encontram-se associados à condensação da cromatina e isso acontece porque existem proteínas que se ligam especificamente aos nucleotídeos quando metilados. Dentre tais proteínas, MeCP1 e MeCP2 são as mais estudadas. Uma vez ligadas aos sítios metilados, a transcrição pode ser alterada em decorrência do domínio de repressão transcricional presentes em MeCP1 e MeCP2 ou devido ao fato de que elas podem recrutar outras proteínas envolvidas na condensação da cromatina, impedindo o acesso de fatores de transcrição à sequência de DNA (ALLIS; JENUWEIN, 2016)

Genomas de mamíferos, como de todos os demais vertebrados, são globalmente metilados no sentido de que todas as categorias de sequências de DNA (genes, transposons e DNA intergênico) são alvos para metilação de CpG (SUZUKI; BIRD, 2008)

Recentes estudos apresentaram provas de que o corpo de genes ativos em plantas e animais são sempre densamente metilados. Embora desconheça-se o motivo preciso pelo qual o corpo de tais genes são metilados, especula-se que possa ser algum mecanismo para a supressão da iniciação de transcrição intragênica. Outro ponto importante é que a metilação em certas regiões do corpo de um gene encontra-se associado com a transcrição ativa daquele dado gene (RAKYAN et al., 2004; FENG et al., 2010). Este é um aspecto muito importante da epigenética, pois muitos estudos têm focado na metilação do DNA como sendo uma marca para o silenciamento genético. Porém, estudos apontam que metilação do DNA pode funcionar como um mecanismo de ativação de transcrição, como por exemplo a metilação em CGIs não promotoras como a região final 3' de genes que promovem a ativação de genes em camundongos ou células humanas *in vitro* (YU et al., 2013, 2015).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar o impacto da dieta deficiente de doadores metil sobre microestrutura do intestino delgado em nível tecidual, celular e molecular.

### **2.2 Específicos**

- Estudar se a deficiência combinada de doadores metil (folato e colina) é por si suficiente para de induzir aumento da profundidade de cripta no intestino delgado.
- Analisar o impacto da dieta deficiente de doadores metil sobre a dinâmica da célula tronco intestinal, especificamente os parâmetros de maturação, proliferação e diferenciação.
- Investigar as alterações na transcrição de marcadores relacionados a identidade de célula tronco intestinal bem como a marcação epigenética relacionadas com a dieta deficiente de doadores de metil.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Modelo murino de deficiência de doadores metil

Camundongos Wild-Type C57BL/6 grávidas com gestação entre 11-14 dias foram adquiridas (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, Estados Unidos) e mantidas em instalações de barreira máxima onde gaiolas estéreis eram individualmente ventiladas com ar filtrado. O acesso à instalação de barreira era feito apenas mediante a troca de roupas em sala limpa após vestimenta de protetor de sapatos, luvas, máscara facial, gorro e avental, seguido pelo banho seco em jato de ar. Todos os equipamentos e suprimentos eram desinfectados prévios ao seu uso. As condições ambientais contemplavam temperatura ambiente de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , humidade relativa entre 30-70% e ciclo claro escuro 14-10h.

Quando grávidas, fêmeas foram segregadas em gaiolas diferentes com livre acesso à água estéril e então randomizadas para uma das quatro dietas experimentais, cuja composição completa pode ser visualizada na Tabela 1. Cada dieta foi administrada *ad libitum* como dietas purificadas (Research Diets Inc, Estados Unidos). Tais dietas foram adquiridas devidamente formuladas e suplementadas com vitaminas e esterilizadas através de radiação gama antes de administradas aos animais, sendo todas isocalóricas e isonitrogênicas. Os animais foram agrupados em quatro grupos, de acordo com dieta que lhes eram administradas. Os grupos foram assim distinguidos:

1. CD- : controle da dieta, sem antibiótico na formulação;
2. CD+ : controle da dieta, acrescido de antibiótico (sulfametoxazol);
3. MDD- : Dieta deficiente em doador de metil, sem antibiótico;
4. MDD+ : dieta deficiente em doador de metil, acrescida de antibiótico (sulfametoxazol).

*Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas para alimentar os animais no modelo murino de deficiência de doadores de metil.*

	CD-		CD+		MDD-		MDD+	
	g%	kcal%	g%	kcal%	g%	kcal%	g%	kcal%
Proteína	19.0	20	18.8	20	19.0	20	18.8	20
Carboidrato	63.1	65	62.5	65	62.3	64	61.7	64
Gordura	6.5	15	6.5	15	6.5	15	6.5	15
Total		100		100		100		100
Kcal/g	3.77		3.77		3.77		3.77	
Ingredient	g	kcal	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Caseína	200	800	200	800	200	800	200	800
L-Cistina	3	12	3	12	3	12	3	12
Amido de milho	346	1384	346	1384	346	1384	346	1384
Maltodextrina10	45	180	45	180	45	180	45	180
Dextrose	250	1000	250	1000	250	1000	250	1000
Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0
Celulose, BW200	75	0	75	0	75	0	75	0
Inulina	25	25	25	25	25	25	25	25
Óleo de soja	70	630	70	630	70	630	70	630
Mineral Mix S10026	10	0	10	0	10	0	10	0
Mineral Mix S10026A	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfato de Cálcio	13	0	13	0	13	0	13	0
Carbonato de Cálcio	5.5	0	5.5	0	5.5	0	5.5	0
Citrato de Potássio, 1 H <sub>2</sub> O	16.5	0	16.5	0	16.5	0	16.5	0
Cloreto de sódio	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamina Mix V10001	10	40	10	40	0	0	0	0
Vitamina Mix V14901 (No Folate)	0	0	0	0	10	40	10	40
Bitartarato de colina	2	0	2	0	0	0	0	0
Succinilsulfatiazol	0	0	11	0	0	0	11	0
<b>Total</b>	1071.05	4071	1082	4071	1069	4071	1080.05	4071

Fonte: dados da pesquisa.

CD- : dieta controle sem sulfametoxazol; CD+ : dieta controle com sulfametaxazol; MDD- : dieta Deficiente em doadores de metil sem sulfametoxazol; MDD+ : dieta deficiente em doadores de metil com sulfametoxazol;

O motivo pelo qual sulfametoxazol foi adicionado à formulação da dieta, foi dado pela necessidade de reduzir a interferência da microbiota intestinal como um produtor e doador de outra fonte de doadores de metil. Sendo sulfametoxazol um antimicrobiano da classe das sulfonamidas, exerce ação bacteriostática através da inibição bacteriana de ácido dihidrofólico e tem espectro de ação sobre bactérias que habitam a área intestinal. Como as demais drogas da classe das sulfonamidas, não há relatos de efeitos teratogênicos com uso de sulfametoxazol (MICROMEDEX® SOLUTIONS, 2017)

Antes de iniciar o desmame, o peso de mães e filhotes foram aferidos três vezes por semana. Aos 23 dias de vida, filhotes foram desmamados para a mesma dieta de suas respectivas mães e, a partir de então, pesados duas vezes por semana. O consumo de alimento foi monitorado e registrado semanalmente. Animais em amamentação foram colocados juntos na mesma gaiola conforme gênero e grupo experimental de cada dieta.

Ao atingir sete semanas de idade, os animais foram eutanasiados através do uso de câmaras saturadas com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Após a morte por asfixia com CO<sub>2</sub>, foi executado deslocamento cervical nos animais, seguindo o protocolo estabelecido pela instituição. Amostras de sangue foram coletadas através de acesso retro-orbital e punção cardíaca e utilizado para quantificação dos níveis séricos de folato e realização do hemograma.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados e executados de acordo com as regras e recomendações estabelecidas pelo *Institucional Animal Care and Use Committee (IACUC)* do *Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC)*, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos.

### **3.2. Imuno-histoquímica**

Para avaliar potenciais diferenças no padrão de proliferação de cripta causada pelas dietas do estudo, utilizou-se o método de bromodeoxiuridina (BrdU), capaz de marcar células que estão replicando o DNA, ou seja, em estágio proliferativo. BrdU, um análogo da timidina, é incorporado ao DNA durante a replicação, sendo posteriormente detectado por anticorpos anti-BrdU (WOJTOWICZ; KEE, 2006). A incorporação desse análogo de timidina permite a marcação ainda

nos animais vivos.

Para este procedimento seguiu-se as recomendações do fabricante do reagente utilizado, Zymed® BrdU Staining kit (Invitrogen, Estados Unidos). Camundongos receberam injeção intraperitoneal contendo 1.0mL de reagente concentrado por cada 100g de peso corpóreo. Transcorrido 2h após a injeção, os animais foram sacrificados seguindo protocolo já descrito. Segmentos do intestino foram recolhidos, fixados em formalina tamponada neutra por 12-24h e então processados para serem embebidos em parafina.

Os tecidos foram cortados entre 3-4 $\mu$ m de espessura e colocados em laminas tratadas com poly-L-lisina. Após secagem em forno a 60 °C (50min), as lâminas foram desparafinizadas e coradas com BrdU.

Aquisição digital das imagens dos slides foram feitas digitalmente utilizando microscópio direto 3007<sup>a</sup> Nikon 90i. As imagens foram quantificadas por um terceiro operador sem que este tivesse acesso à identidade das amostras.

### **3.3. Dosagem de folato sérico**

O sangue utilizado para o processamento dos níveis de folato foi coletado em capilares e transferidos imediatamente para microtubos separadores de soro, Microtainer® Tubes (Beckton Dickson, Estados Unidos). Estes foram mantidos por 2h sob temperatura ambiente de forma a permitir a formação e retração do coágulo. O sangue foi centrifugado (4 °C, 1000RPM, 20min). O soro sobrenadante foi separado da porção celular sanguínea e armazenado imediatamente a -80 °C até o momento do processamento.

A dosagem das concentrações séricas de ácido fólico/folato foram feitas através de ELISA seguindo as recomendações do fabricante do kit utilizado, CEA610Ge (Cloud-Clone Corp., Estados Unidos). Após todo o preparo da placa e adição da solução de parada, os poços da placa tiveram seus valores de absorbância lidos imediatamente no leitor de microplaca em 450nm Synergy H1 (Biotek, Estados Unidos). Os dados de absorbância foram interpolados na curva padrão do ensaio para calcular os valores de folato em pg/mL.

### **3.4. Hemograma**

A quantificação dos parâmetros hematológicos foi feita utilizando contador hematológico automatizado Hemavet® 850 (Drew Scientific, Oxford, Estados Unidos). O sangue coletado dos animais foi diluído com solução diluente do equipamento utilizado na proporção de 1:2. Os valores obtidos eram multiplicados por 2. Antes de cada uso, sangue comercial controle era processado na máquina para verificar se os parâmetros de controle de qualidade do equipamento se encontravam dentro dos limites aceitáveis.

### **3.5. Morfometria intestinal**

Secções transversais do jejuno foram obtidos a partir de 1cm do estômago, secção de jejuno 5cm do estômago, secção do íleo 1cm a partir do cécum. As secções foram lavadas com PBS e imediatamente inseridas em cassetes histológicos que foram imergidos em formalina 4%. Após 24h, formalina foi substituída por etanol 70%. Os segmentos foram embebidos em parafina, seccionados em cortes de 5µm e, então, corados com hematoxilina-eosina. As dimensões de cripta foram medidos e quantificados de maneira cega por um segundo operador que não preparou as amostras. O software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) foi utilizado para fazer as medidas de profundidade de cripta.

### **3.6. Enteroides murinos**

Com o objetivo de observar e comparar comportamento das células da cripta de intestino isoladas dos animais, em face à condições ambientais ainda mais controladas, criptas de cada grupo de animais foram extraídas para gerar enteroides e cultivadas em meio regular e meio sem doadores de metil, ou seja, meio desprovido de folato e colina.

O método para isolamento da célula tronco intestinal e geração de enteroides a partir destas

foi executado conforme metodologia publicada anteriormente (SATO et al., 2009; MAHE et al., 2013; MOORE et al., 2015). Camundongos foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> seguido por deslocamento cervical. Utilizando algodão umedecido com álcool 70%, fez-se prévia limpeza sobre o abdômem dos animais e em seguida a cavidade abdominal foi aberta com o auxílio de tesoura. Com o objetivo de padronização, de forma a ter sempre a mesma porção do intestino em todos os animais, os procedimentos seguintes foram realizados em todos os animais. Removeu-se todo o seguimento intestinal compreendido entre o estômago e cécum. Com auxílio de uma régua calibrada, excluiu-se o duodeno, este foi considerado como sendo os primeiros 4cm proximais (mais próximo ao estômago). Os próximos 4-5cm após remoção do duodeno, foi a porção de jejuno utilizada para isolamento de criptas em todos os animais do estudo.

Utilizando uma seringa curva injetou-se tampão fosfato salina modificado (DPBS) gelado (4 °C) no lúmen do segmento intestinal isolado com o objetivo de remover todo o seu conteúdo luminal. Após limpeza, o segmento foi cortado longitudinalmente, lavado mais uma vez com DPBS gelado e então cortado em pequenos pedaços de 0,5-1cm. Os pedaços foram transferidos para um tubo cônico de 15mL contendo DPBS gelado. A suspensão foi mantida sob homogeneização 3D em câmara fria por cerca de 5 minutos. Findo esse tempo, o líquido do tubo foi substituído por 5mL do tampão de quelação (DPBS e EDTA 2mM). A suspensão foi novamente colocada sob homogeneização em câmara fria. Após 30 minutos, aspirou-se todo o tampão de quelação e adicionou-se 6mL do tampão de agitação (DPBS, sorbitol 54,9mM e sucrose 43,3mM). A suspensão foi cuidadosamente agitada com a mão em movimentos verticais durante 2 minutos, com o objetivo de reduzir a força das conexões entre os diferentes folhetos histológicos do intestino e assim liberar as criptas para a suspensão (STELZNER et al., 2012). Após dois minutos de agitação, um microscópio invertido era utilizado para visualizar se houve suficiente liberação de criptas para a suspensão. Em caso negativo, agitação por tempo adicional 0,5-1 minuto foi realizada. Caso a suspensão apresentasse número suficiente de criptas (cerca de 15-20/campo), todo o conteúdo era filtrado utilizando filtro com malha de nylon 70µm. O filtrado era coletado em um tubo cônico de 50mL. A quantidade de criptas presente em 10µL da suspensão filtrada era visualizada novamente ao microscópio invertido e, então, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 150RCF em 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, Matrigel® (matriz extracelular) e fatores de crescimento foram manipulados e adicionados às criptas isoladas com a finalidade de ressuspendê-las.

Para todos os experimentos foi utilizado Matrigel® sem fenol red e reduzido em fatores de crescimento (Corning Inc, Estados Unidos, Cat# 356231). Antes de ressuspender as criptas com Matrigel®, este precisou ser adicionado de fatores de crescimento conforme as concentrações mostradas na tabela 2.

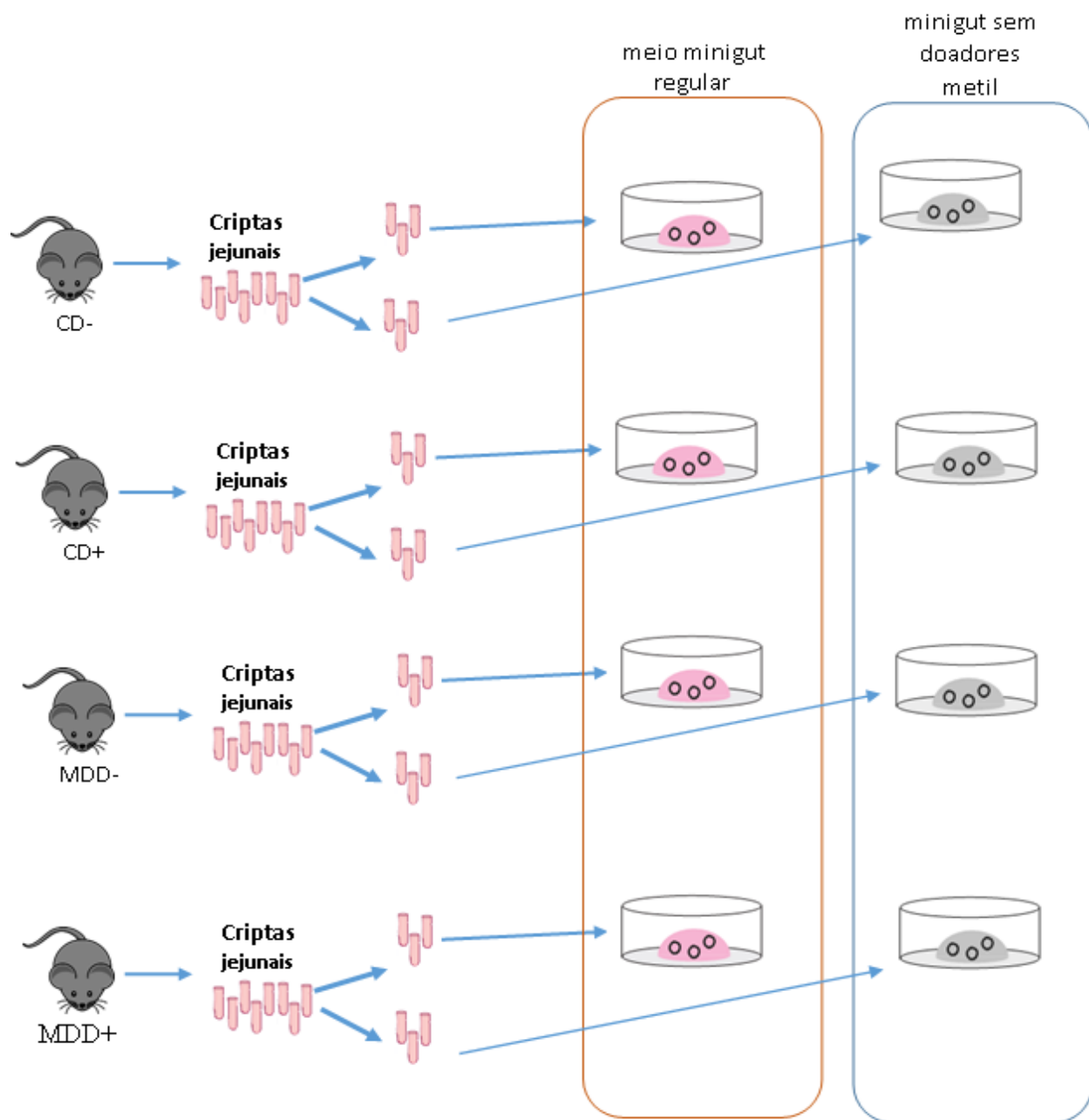
*Tabela 2 – Materiais utilizados na composição da matriz de crescimento dos enteroides.*

<b>Material</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Referência</b>	<b>Concentração/</b>
<b>mNoggin recombinante</b>	R&D systems	6997-NG/CF	0,625µg/µL
<b>mR-Spondin1 recombinante</b>	R&D systems	4120-RS	3,25µg/µL
<b>mEGF recombinante</b>	R&D systems	2028-EG	0,625µg/µL
<b>Matrigel®</b>	Corning	356231	-

Fonte: elaborado pelo autor

O material então foi aplicado em placas de cultivo celular de 12 ou 24 poços e colocados em incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% humidade) por 15 minutos para que o matrigel pudesse polimerizar. Após polimerização foi adicionado a cada poço 700µL de meio minigut requerido para o cultivo de enteroides. Aqui é de grande importância destacar que uma vez que criptas isoladas dos quatro grupos in vivo foram postas a crescer em dois tipos de meio minigut (meio regular e meio sem doadores de metil), foram criados oito grupos experimentais conforme figura 7.





*Figura 7 - Diagrama esquemático exemplificando a geração de grupos experimentais obtidos a partir do cultivo de criptas isoladas do jejuno de animais submetidos às dietas experimentais do presente estudo. CD-: dieta controle sem antibiótico (sulfametoxazol); CD+: dieta controle com antibiótico (sulfametoxazol); MDD-: dieta deficiente em doadores metil sem antibiótico (sulfametoxazol); MDD+: dieta controle com antibiótico (sulfametoxazol). Fonte: elaborado pelo autor.*

*Tabela 3 – Composição do minigut utilizado no cultivo de enteroides murinos.*

<b>Material</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Referência</b>	<b>Concentração/mL</b>
<b>Meio DMEM/F-12 advanced</b>	Gibco	*	-
<b>Penicillin-Streptomycin 100X (10.000U/mL)</b>	Gibco	15140148	10U
<b>N-2 Supplement 100x</b>	R&D systems	AR009	1x
<b>B-27 Supplement 50x</b>	Gibco	17504044	1x
<b>Glutamax® 100x</b>	Gibco	35050061	1x
<b>HEPES 100X</b>	Gibco	15630106	10mM

\*Para minigut regular foi utilizado Advanced DMEM/F-12 (Cat# 12634010). Para meio minigut sem doadores de metil, foi utilizado uma formulação customizada de DMEM/F12 que não continha folato nem colina.

A troca de meio foi feita a cada 3-4 dias. Antes de trocar o meio, estes eram aquecidos a 37 °C e eram suplementados com os três fatores de crescimento (mR-Spondin, mNoggin e EGF) antes de serem adicionados aos poços.

A cada 6-7 dias os enteroides eram submetidos a uma nova passagem. Nesse processo, os poços eram lavados com DPBS gelado e todo matrigel era aspirado com uma pipeta de 1000uL, sendo transferido para um tubo cônico sobre gelo. Após centrifugação (150RCF, 5min) e remoção do sobrenadante, os enteroides eram desestabilizados de sua estrutura com uma seringa de insulina (21G) com movimentos de up-and-down. Durante esse processo, a estrutura dos enteroides era fisicamente destruída. Contudo, cada fragmento de cripta pôde crescer e gerar um novo enteroide.

Após uso da seringa, adicionou-se mais DPBS gelado e seguiu-se nova centrifugação. Após remoção do sobrenadante, adicionou-se matrigel contendo as mesmas concentrações de fatores de crescimento utilizadas pela primeira vez durante o isolamento das criptas. A suspensão foi plaqueada e posta a polimerizar no interior de uma incubadora por 15 minutos antes de receber meio minigut, com ou sem doadores de metil.

### **3.7. Imunofluorescência**

Enteroides foram plaqueados em  $\mu$ -chamber com 8 poços (Ibidi, Alemanha) seguindo o protocolo descrito no item anterior. Para evitar eventuais distúrbios na atividade proliferativa dos enteroides, removeu-se apenas metade do meio em que estes se encontravam e em seguida adicionou-se aos poços uma solução contendo 5-ethynyl-2-deoxyuridine suficiente para reestabelecer o volume inicial. A solução foi preparada conforme instrução presente no manual do kit Click-IT® EdU Proliferation Assay (Invitrogen, Estados Unidos). Os enteroides permaneceram sob incubação durante 30 minutos e então foram lavados 3 vezes com PBS antes de serem fixados com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Seguiu-se mais 3 lavagens e os enteroides foram permeabilizados com Triton x-100 0,5% por 20min. A remoção do triton foi sucedida por 3 lavagens com PBS antes dos poços receberem 500 $\mu$ L do coquetel do kit contendo, dentre outros, tampões e o fluoróforo Alexa fluor® 594. A incubação com o coquetel tomou 30 min., sendo sucedida por 3 lavagens com albumina sérica bovina 3% (em PBS). Os núcleos foram contra-corados com DAPI 1/1000 por 3 min. As imagens foram adquiridas com o microscópio Nikon 3300 (Nikon, Japão).

### **3.8. PCR-array para célula tronco intestinal**

Com a finalidade de avaliar o impacto da deficiência dos doadores de metil sobre a transcrição gênica da célula tronco intestinal, realizou-se um ensaio customizado de um painel especificamente elaborado de genes envolvidos na manutenção e identidade da célula tronco intestinal, conforme descrito na Tabela 4.

Para este fim, criptas do jejuno de camundongos *wild-type* foram isoladas seguindo metodologia já descrita acima. Após isolamento, as criptas foram cultivadas em meio minigut regular ou meio minigut contendo apenas 10% da concentração de doadores de metil presentes no meio regular (meio doador de metil reduzido), ou seja, depletado em 90% da concentração de doadores de metil. O objetivo foi recriar o fenótipo da deficiência de doador metil *in vitro*. Após três sucessivas passagens cultivadas em meio reduzido de doadores de metil, os enteroides assumiam padrão morfológico similar aos enteroides cultivados a partir da cripta de animais que recebiam a dieta pobre em doadores de metil. Após a terceira passagem, e uma vez que estes apresentavam a mesma morfologia, os enteroides eram coletados e tinham seu RNA extraído.

A extração total do RNA foi feita seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante do kit utilizado, Aurum™ Total RNA Mini Kit (Cat# 7326820, Biorad, Estados Unidos). Ao término da extração, uma alíquota de 1µL do RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria com o equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para fins da verificação da qualidade do RNA extraído e para a determinação da quantidade necessária para a construção do DNA complementar (cDNA).

O cDNA foi sintetizado utilizando 1µg do RNA total de cada amostra, incubada com a enzima transcriptase reversa iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit (Cat#17255038, BioRad, Estados Unidos) e com água reagente tipo I completando para volume total final de 20µL por reação. O cDNA sintetizado foi mantido em um freezer a -80 °C até sua amplificação por uma reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time-PCR).

Para este procedimento utilizou-se um conjunto de primers comerciais (PrimePCR™ SYBR® Green) que estão identificados na tabela 4 na coluna Identificação do ensaio.

RT-qPCR foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Cat#1725271, Biorad, Estados Unidos). Em resumo, 2µg de cDNA foi misturado a 2µL de mix para RT-qPCR perfazendo um volume de reação de 20µL. Volumes iguais da mistura (25µL) foram adicionados a cada poço da placa que foram adquiridas já contendo o set de genes específicos predispendados.

Tabela 4 – Primers comerciais utilizados para PCR array da célula tronco intestinal

Gene	Sigla	Código UniGene	Identificação do Ensaio
<i>SAM pointed domain containing ets transcription factor</i>	Spdef	Mm.26768	qMmuCED0046601
<i>SRY-box containing gene 9</i>	Sox9	Mm.286407	qMmuCED0044685
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1</i>	Lrig1	Mm.245210	qMmuCID0013023
<i>Kruppel-like factor 4 (gut)</i>	Klf4	Mm.4325	qMmuCED0045416
<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>	Hprt	Mm.299381	qMmuCED0045738
<i>HOP homeobox</i>	Hopx	Mm.181852	qMmuCID0007483
<i>Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)</i>	Hes1	Mm.390859	qMmuCED0045734
<i>Bmi1 polycomb ring finger oncogene</i>	Bmi1	Mm.289584	qMmuCED0040846
<i>Achaete-scute complex homolog 2</i>	Ascl2	Mm.196417	qMmuCED0001620
<i>Actin, beta</i>	Actb	Mm.391967	qMmuCED0027505

Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.9. Perfil de metilação

Com vistas a determinar o impacto da dieta deficiente em doadores de metil sobre o perfil de metilação da célula tronco intestinal, realizou-se análise quantitativa da metilação de DNA em células tronco a partir de enteroides cultivados em meio regular deficiente em doadores metil (folato e colina). Os enteroides utilizados para esta metodologia foram cultivados durante o mesmo set e na mesma placa que os enteroides utilizados para avaliar a RT-qPCR do item anterior.

DNA genômico foi isolado a partir do pool de 5 poços (cerca de 480 enteroides) por cada um dos dois grupos. DNA foi extraído seguindo as instruções do fabricante do kit utilizado, DNA Isolation Kit (Qiagen, Estados Unidos). Após breve sonicação, DNA genômico foi tratado com bisulfato de sódio utilizando EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Cat#D5020, Zymo Research, Estados Unidos).

O tratamento com bissulfito de sódio representa uma etapa fundamental do processo analítico pois o bissulfito desamina seletivamente a citosina do DNA convertendo-a em uracila, mas não interfere com 5-metilcitosina (5-mC). Este tratamento causa uma alteração na sequência primária do DNA permitindo que os processos analíticos posteriores possam distinguir entre citosina não metilada e 5-mC (SUSAN et al., 1994)

Após a conversão, o DNA modificado pelo bissulfito foi amplificado através da PCR. Através da utilização de primers adaptadores específicos isolou-se fragmentos de 200-500bp. Utilizando o instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Estados Unidos), realizou-se o ensaio de fluorescência com Pico Green<sup>TM</sup> (Molecular Probes, Estados Unidos) para determinar a quantidade e distribuição das bibliotecas de fragmentos geradas. O sequenciamento do DNA foi feito no equipamento Illumina Hi-Seq 2000 (Illumina Inc, Estados Unidos) conforme protocolo padrão do fabricante. Para cada biblioteca, o protocolo do Illumina foi utilizado para fazer um chamado por base do DNA, registrando os resultados gerados num arquivo fastq. Efetuou-se controle de qualidade da leitura do equipamento analisando os arquivos fastq com o programa FastQC e então as leituras foram alinhadas ao genoma de referência de camundongo.

### **3.10. Análise quantitativa da metilação do DNA por sequenciamento por bissulfito**

Metilação em regiões CpG específicas foram quantificadas utilizando a técnica de pirosequenciamento com bissulfito de sódio processada com auxílio do instrumento PyroMark<sup>TM</sup> Q96 MD (Qiagen, Estados Unidos). As sequências de primers e ensaios de sequenciamento estão sumarizados na tabela 5

Para fins de controle de qualidade analítico, para cada ensaio foram inclusos controle positivo (DNA genômico tratado com CpG metilase) e controle negativo (DNA não metilado) ao longo do set de processamento das amostras com vistas a reduzir os vieses e aumentar reprodutibilidade.

Considerando que em muitos genes a eficiência de amplificação para DNA metilado pode ser afetada por mudanças na temperatura de anelamento para PCR, as temperaturas de anelamento dos primers foram previamente otimizadas para também reduzir o viés do PCR, conforme publicado anteriormente (SHEN et al., 2007).

### **3.11. Análise Estatística de metilação dos genes**

Para determinar se as diferenças de metilação global foram significantes, os dados foram submetidos a um teste de proporções com a região 200-bp como a unidade de observação. Com vistas a verificar se houve significância estatística da sobreposição de cada categoria GO, aplicou-se o teste exato de Fisher e os valores de P foram ajustados com a correção de Bonferroni

Tabela 5 – Sequência de primers e ensaios de sequenciamento utilizados na análise de metilação do presente estudo

<b>Gene</b>	<b>Senso</b>	<b>Antisenso 5' biotilado</b>	<b>Primer de sequenciamento</b>	<b>Região sequenciada</b>
<b>Line1</b>	TGATAGTTTTTGAATAGGTAGAAGT	CCCAAATAATACAAACTCTCACTTAA	TTGAGGTAGTATTTTGTGTG	GGTYGGGGAT AGTYGGTT
<b>IAP</b>	AAGGAAAGGGGAGATGTTGG	CRCCTAAAACRTATCACTCCCTAA	ATTTTATGTGTTTTGTTTTT	TTYGTGAYGT TAATTYGGTY GATGG
<b>B4galnt1</b>	GGGGAGAGGGAAAAAGATGTTAGG	ACTCTCCTCCCCTACCAAAT	ATTTTTTTAGGGTTGGTT GGTGTTTTAAGTAATTATAAAT GGTTGAGAAGTTTGTG	YGTAGGTYGG AATTTGGYGG T AYGTGTTGTG GGTGGAYGAY GATTTTGT TTAYGGYGYG TA GAYGTGTTYG AGAAGAYGTT
<b>Lpar5</b>	TGTTTTTTTTTAGGTTTTTGTGTTAG	ACCTACCCTTCCACAATTC	GTGTGGGTTTTTATTTTGT	TGTTYGTTGT GTTYGTYGTT YGYGTGTATA GTTYGTTTTA
<b>Phospho1</b>	GAAGTAGGAGTTTTGTTGTTATGAA	CTTCCCCTACTCCCAAAA	TTGGTTATGAATTGTAATAAA GTTGTATGTATTTATTGTAGTAGT	TYGTTTATGT TTGGYGATAG GGGATGGTT TYGTAGATAG T TTYGYGATA GGTGGTAYGT AGGTTTTYGG GTAGTTGTTG



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Exposição pré-natal e pós-natal da dieta deficiente em doadores metil

A exposição a dieta deficiente em doadores metil durante o período pré-natal e vida pós-natal esteve associada de forma significante à redução de peso corpóreo em camundongos (**Figuras 8 e 9**). Esse resultado foi encontrado em ambas as dietas onde os doadores de metil estavam ausentes (não importando a presença ou ausência do antibiótico sulfametoxazol) quando comparadas às dietas controle com antibiótico ou sem antibiótico.

Em animais machos a média e erro padrão da média no grupo CD- para as primeiras três semanas foi  $6,52 \pm 0,52$ ; valor este muito próximo aos parâmetros do grupo CD+:  $6,92 \pm 0,47$ . No mesmo período avaliado os valores médios de MDD- ( $4,59 \pm 0,21$ ) e MDD+ ( $4,89 \pm 0,32$ ) mantiveram-se afastados dos valores do controle como mostra a Figura 8A. A mesma exata tendência foi observada para os filhotes fêmeas de camundongos expostos a dieta CD - ( $6,57 \pm 0,50$ ) e CD+ ( $6,91 \pm 0,45$ ) cujos valores de média sempre se mantiveram superior aos valores dos grupos MDD- ( $4,86 \pm 0,33$ ) e MDD+ ( $4,88 \pm 0,31$ ), como mostra a figura 8B.

A análise de variância bi-caudal (*two-way ANOVA*) comprova redução de ganho de peso corpóreo associada à deficiência de doadores metil verificada tanto na prole de animais machos como na prole de fêmeas, conforme mostra Figura 8. As diferenças mais importantes dizem respeito apenas a presença ou ausência de doadores metil na dieta, ou seja, não foram encontradas quaisquer diferenças importantes causadas pelo uso do antibiótico, seja quando comparadas as duas dietas deficientes (MDD+ e MDD-). Nos animais alimentados com dieta deficiente, o ganho de peso foi cerca de 46% menor comparado aos animais da dieta controle.

É importante ressaltar que apesar do peso entre os grupos recebendo dieta deficiente em doadores metil fosse marcadamente baixa em relação aos filhotes recebendo dietas controles durante o período de amamentação, estes resultados não estiveram associados a perdas fetais.

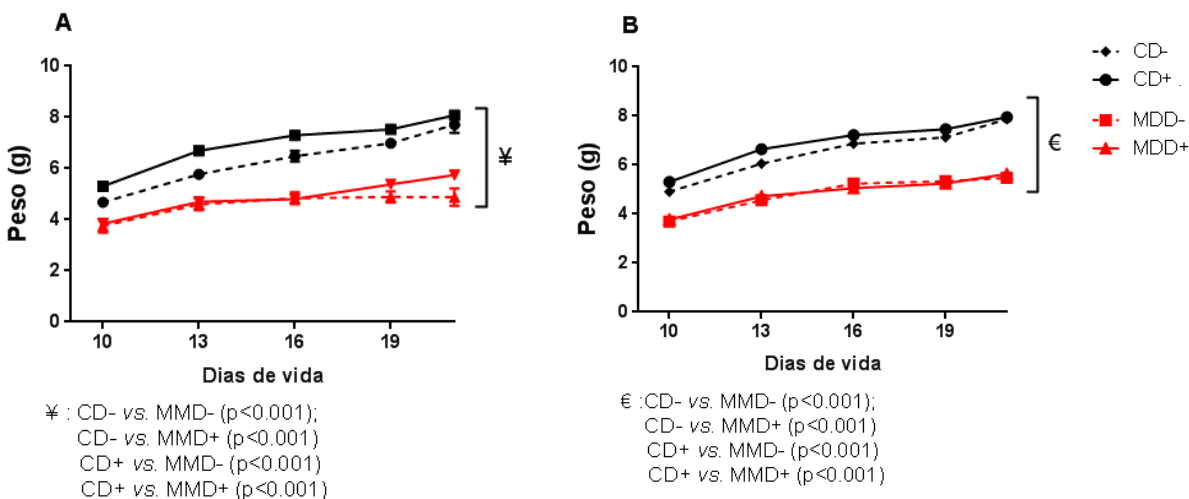


Figura 8 – Camundongos expostos à dieta deficiente em doadores de metil durante o período pré-natal e pós-natal apresentam peso acenuadamente baixo. Pesos dos animais estratificados por sexo durante as 3 primeiras semanas de vida. A - animais machos. B- animais fêmeas. \* indica diferença significativa entre os grupos controles (CD- e CD+) e os grupos da dieta deficiente em doadores metil (MDD- e MDD+), conforme o ANOVA bicaudal.

Em relação ao grupo controle sem antibiótico, CD- ( $6,84 \pm 0,07$ ), o comprimento médio da cauda em camundongos, um substituto equivalente ao crescimento linear nestes animais, foi significativamente inferior nos demais grupos, CD+ ( $6,44 \pm 0,13$ ), MDD- ( $6,00 \pm 0,01$ ) e MDD+ ( $6,04 \pm 0,11$ ), conforme mostra a figura 10, onde os valores médios e erro padrão da média aqui descritos podem ser visualizados.

Apesar dos resultados encontrados mostrarem que as dietas deficientes em doadores de metil foram associadas à animais de baixo peso e menor comprimento de cauda, não foram verificadas diferenças importantes entre o consumo de alimentos dentre animais que consumiam tais dietas (**Figura 11A e 11B**). O reduzido ganho de peso e crescimento linear dos animais expostos à dieta e/ou antibiótico não podem ser explicados por uma baixa ingestão de alimentos pois não foi encontrada significância importante de ingestão entre os diferentes grupos. Exceto pela hiperfagia verificada no grupo de animais alimentados com dieta deficientes de doadores de metil sem antibiótico (MDD-), a massa de alimentos consumida diariamente (g) ou a eficiência de alimentação não exibiram diferenças importantes entre os grupos avaliados (**Figura 11B**)

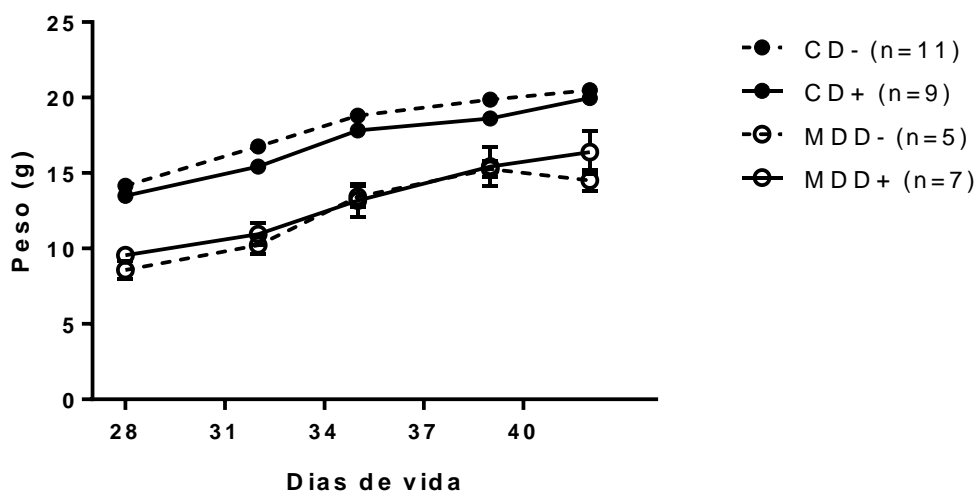


Figura 9 - Camundongos expostos à dieta deficiente de doadores de metil durante o período pré-natal e pós-natal (machos e fêmeas) apresentaram reduzido ganho de peso. O peso dos animais expostos a dieta deficiente seguiu prejudicado até a sétima semana de vida.

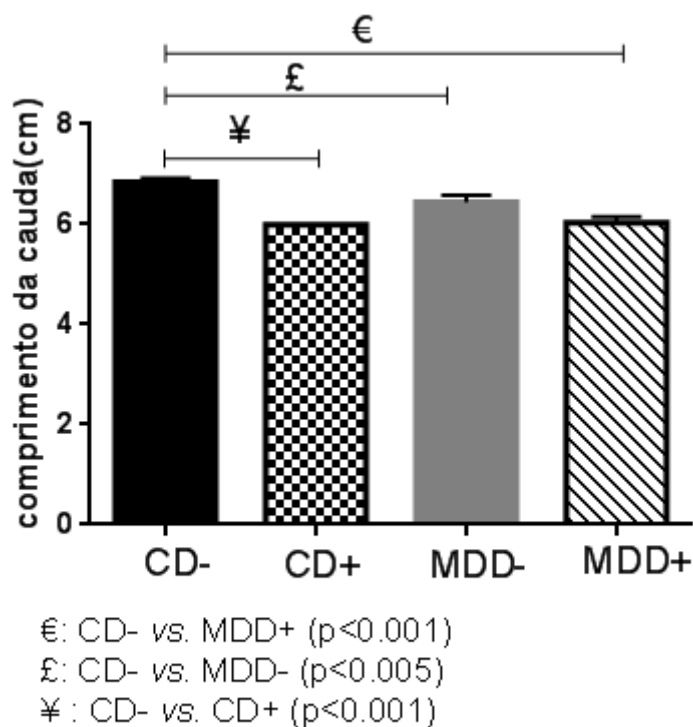


Figura 10 - Comprimento de cauda de camundongos expostos a dieta deficiente em doadores metil no período pré-natal e pós-natal é significativamente inferior em animais expostos a dieta controle com antibiótico (CD-) e em animais expostos a dieta deficiente em doadores metil com ou sem antibiótico (MDD- e MDD+). One-way-ANOVA com teste de correção de Tukey para múltiplas comparações.

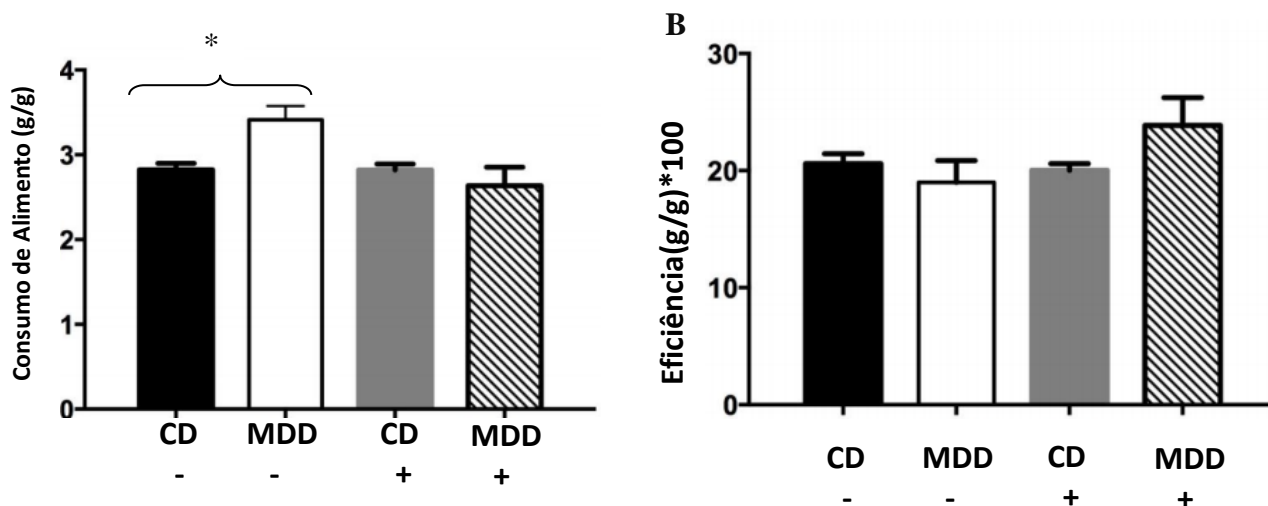


Figura 11 - Diferenças no peso dos camundongos submetidos a diferentes dietas não pode ser explicado com base na diferença da ingesta de alimentos entre os animais dos diferentes grupos da dieta. (A)- o grupo MDD- foi o único a exibir alguma diferença importante, no presente caso, mostrou aumento significativo do consumo de alimento ( $p < 0,05$ ) (B) – A eficiência alimentar, parâmetro que relaciona a quantidade de alimento consumida com o ganho de peso no corpo do animal, foi praticamente a mesma entre os diversos grupos avaliados. One-way ANOVA foi o teste utilizado para avaliar diferenças das médias.

#### 4.2. Status de folato sérico

A medida da concentração de ácido fólico sérico avaliada nos camundongos com 7 semanas de idade mostrou decréscimo acentuado dos níveis de folato nos animais submetidos a ambas as dietas pobres em doadores de metil (MDD- e MDD+). As concentrações de folato em tais dietas (MDD- e MDD+) foram cerca de 82% inferiores às dietas controles (CD+ e CD-) como mostra a **figura 12A e 12B**. Contudo, as análises estatísticas empregadas pelo presente estudo mostraram significância apenas no grupo MDD- em relação aos controles ( $p < 0,05$ ).

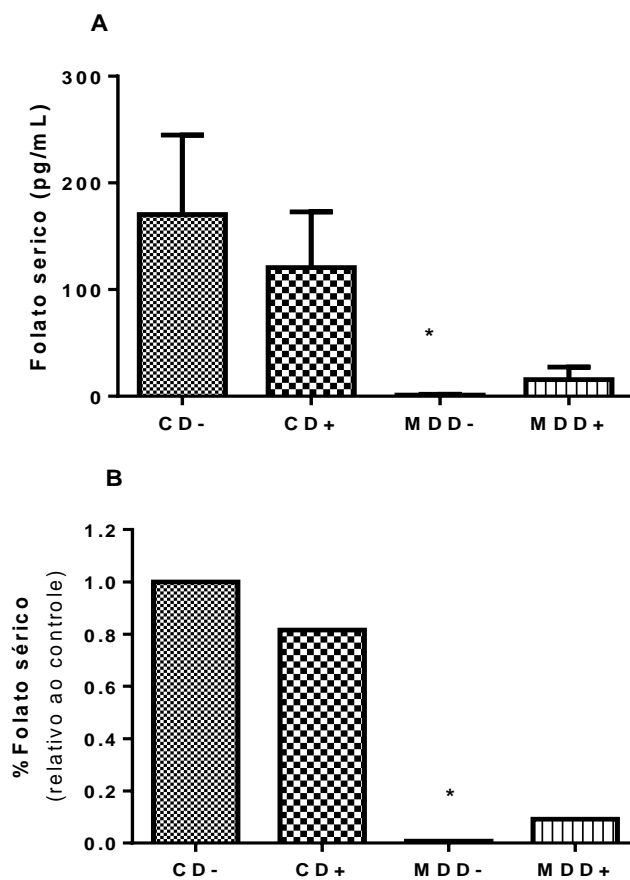


Figura 12 - Níveis séricos de folato em valores absolutos (A) e em valores relativos ao controle (B) em animais expostos a dieta deficiente em doadores metil durante o período pre-natal e nas 7 semanas seguintes de vida. Grupo deficiente de doadores metil com antibiótico (MDD-) reduz significativamente a concentração sérica de folato ( $p < 0,05$ ). Apesar da grande redução aparente também no grupo MDD+, tal diferença mostrou ser não significativa estatisticamente. Em termos relativos ao controle CD-, a depleção de folato no grupo MDD+ foi de 90% enquanto no grupo MDD- cerca de 99%. Fonte: dados do presente trabalho

### 4.3. Índices hematológicos

Apesar dos resultados sistêmicos, os achados hematológicos sugestivos de um quadro de deficiência de folato, ou seja, sugestivo de anemia megaloblástica, foram mais proeminentes no grupo MDD+ apenas. A figura 13B ilustra tais achados mostrando que, quando comparada ao grupo controle sem antibiótico, o volume corpuscular médio dos eritrócitos foi significativamente maior no grupo da dieta deficiente combinada com antibiótico (MDD+ :  $59,84 \pm 1,68$ ; CD-:  $53,90 \pm 0,36$ ;  $p=0,001$ ). Contudo, o valor da amplitude de distribuição do tamanho eritrocitário (RDW) mostrou-se particularmente elevado no grupo da dieta deficiente sem antibiótico grupos (MDD-:  $28,25 \pm 0,49$ ), estando este grupo com média significativamente superior quando comparado ao grupo controle sem antibiótico (CD-:  $24,05 \pm 0,81$ ;  $p = 0,003$ ) grupos (MDD+ :  $25,13 \pm 0,58$ ;  $p= 0,023$ ), como mostra a figura 13A.

Na figura 13C, a comparação dos valores de hemoglobina através do teste de ANOVA não mostrou diferenças entre os grupos avaliados. Entretanto, a comparação entre MDD+ e CD- pelo teste de T Student mostrou diferenças significativas entre os dois grupos (MDD+ :  $14,00 \pm 0,33$ ; CD-:  $15,36 \pm 0,36$ ;  $p=0,025$ ).

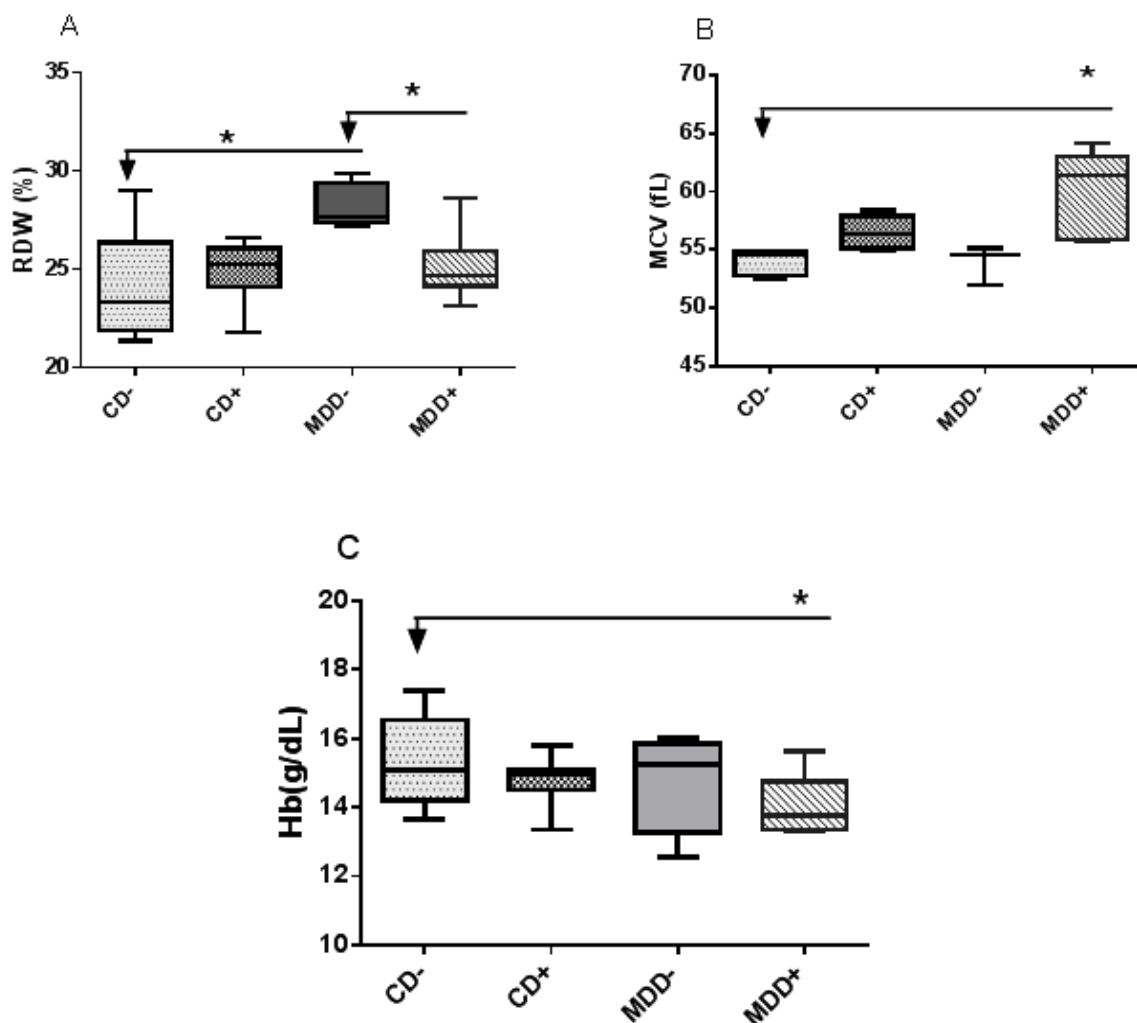


Figura 13 - Efeitos hematológicos decorrentes da deficiência de folato em camundongos expostos à dieta deficiente em doadores de metil sugerem quadro compatível com anemia megaloblástica. A – Amplitude de distribuição do volume eritrocitário (RDW) encontra-se significativamente elevado no grupo exposto a dieta deficiente sem antibiótico (MDD-) quando comparado ao controle sem antibiótico (CD-) ou comparado ao a dieta deficiente com antibiótico (MDD+). B - Volume corpuscular médio dos eritrócitos (MCV) encontra-se significativamente elevado no grupo MDD+ ( $p=0,001$ ), o volume eritrocitário aumentado encontra-se intimamente ligado a uma redução da concentração da hemoglobina na série vermelha (C).

#### 4.4. Histologia

Foram encontradas ao longo da mucosa intestinal, áreas circunscritas e delimitadas nos quais a profundidade de cripta era maior do que nas áreas vizinhas. Os resultados obtidos para o jejuno, quando submetidos ao crivo estatístico de significância mostraram que o alongamento de cripta esteve associado ao uso do antibiótico sulfametoxazol e não à exposição da dieta deficiente de doadores de metil (figura 14), muito embora as muitas áreas de alongamento de cripta estejam presentes no intestino de animais expostos à dieta. No íleo as alterações de cripta foram de forma qualitativa e quantitativa mais pronunciadas que aquelas encontradas no duodeno, como mostra a histologia desses animais (figura 15). Particularmente interessante também foi o fato de que o uso do antibiótico esteve associada à hipertrofia de cripta de forma significativa. Embora não quantificado, chamou atenção a redução no número de células de Paneth e aumento no número de células Goblet observado no íleo, como mostra a figura 16.

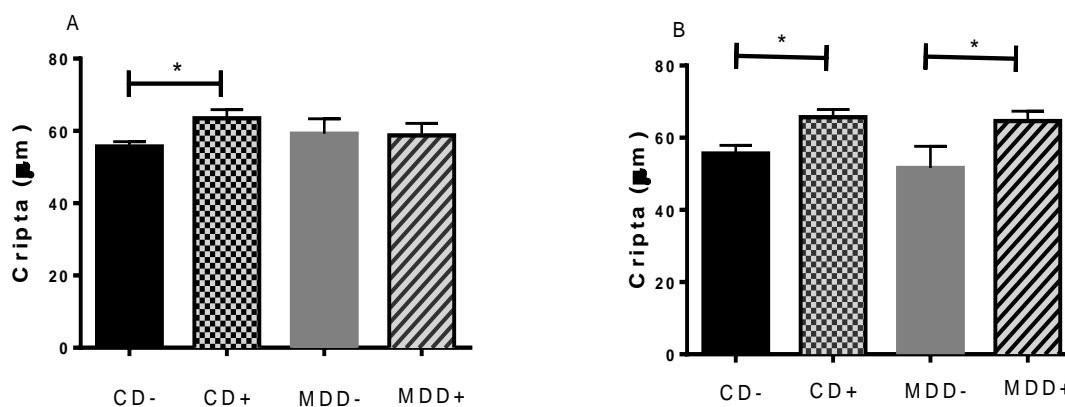


Figura 14 - Profundidade de criptas de Jejuno (A) e íleo (B) em camundogos expostos à dieta deficiente de doadores de metil. Em ambos (A e B) o uso do antibiótico induziu hipertrofia de cripta de forma significativa ( $p < 0,05$ ). A associação entre o uso crônico do antibiótico e o alongamento de cripta pode ser vista de forma mais evidente no íleo.

**JEJUNO**

**ÍLEO**



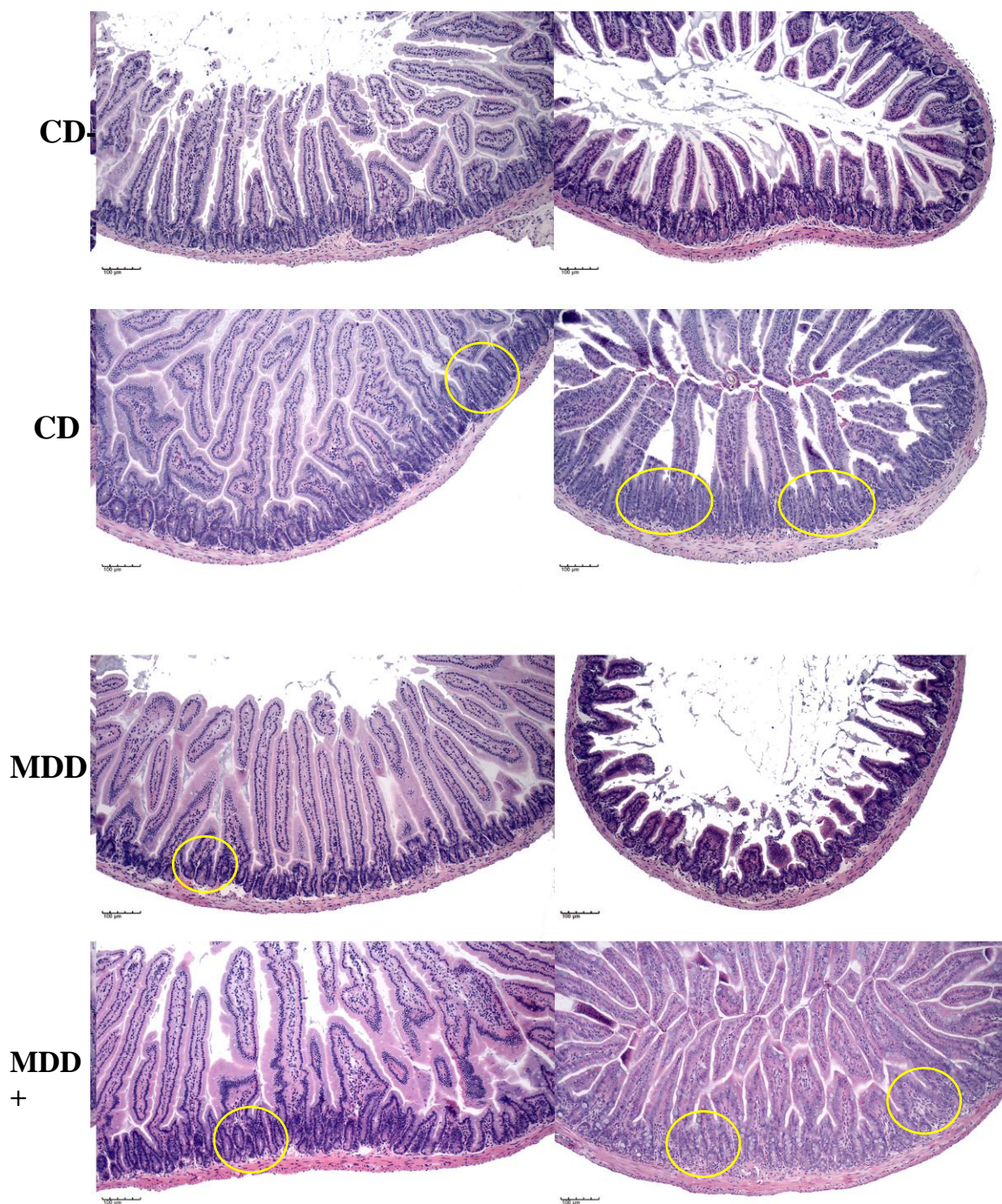
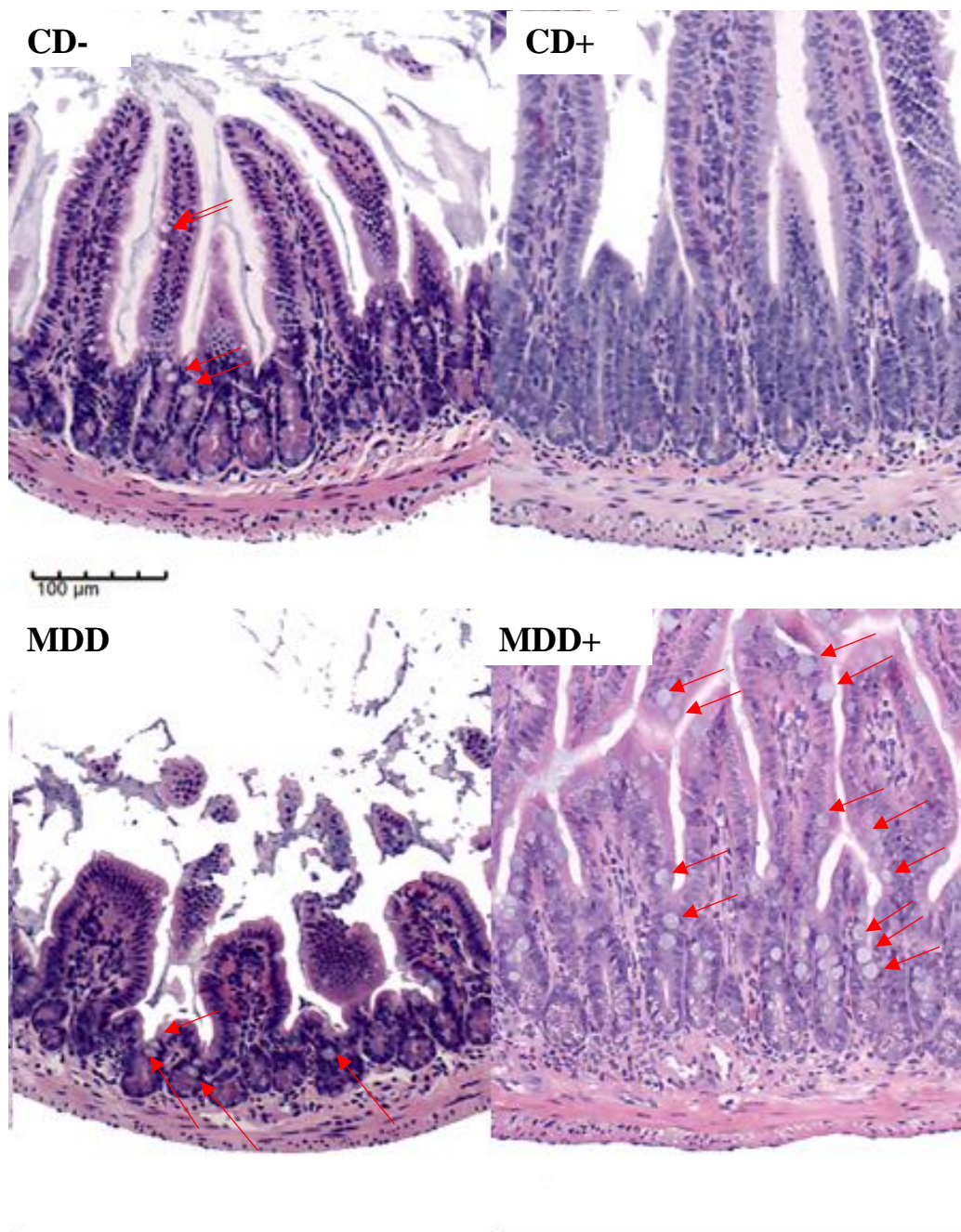


Figura 15 - Histologia de ileo e jejuno de camundongos expostos à dieta deficiente de doadores metil desde o período pré-natal e sacrificados com sete semanas de vida. Os círculos em amarelo chamam atenção para áreas com aumento da profundidade de cripta que aparecem na forma de patches. A presença de antibiótico na dieta mostrou ser um fator de maior relevância para hipertrofia de cripta do que a ausência de doadores de metil. Coloração hematoxilina e eosina. Magnitude do aumento em 20x.



*Figura 16 - Ileo de camundongos expostos a dieta deficiente em doadores metil, onde as diferenças na profundidade de cripta mostraram-se mais pronunciadas que no jejuno. Grandes diferenças no número de Goblet e Paneth (não quantificadas) foram registradas. Os grupos MDD+ e CD+ apresentam um considerável aumento do número de células Goblet e redução considerável das células de Paneth.*

#### 4.5. Imuno-histoquímica

O número de células marcadas com BrDU por cripta sugerem, à primeira vista, uma diferença entre os grupos onde a dieta CD+ e MDD+ possuem os mais altos números de células positivamente marcadas (figura 17). Entretanto a análise estatística mostrou não existir nenhuma diferença importante entre nenhum dos grupos.

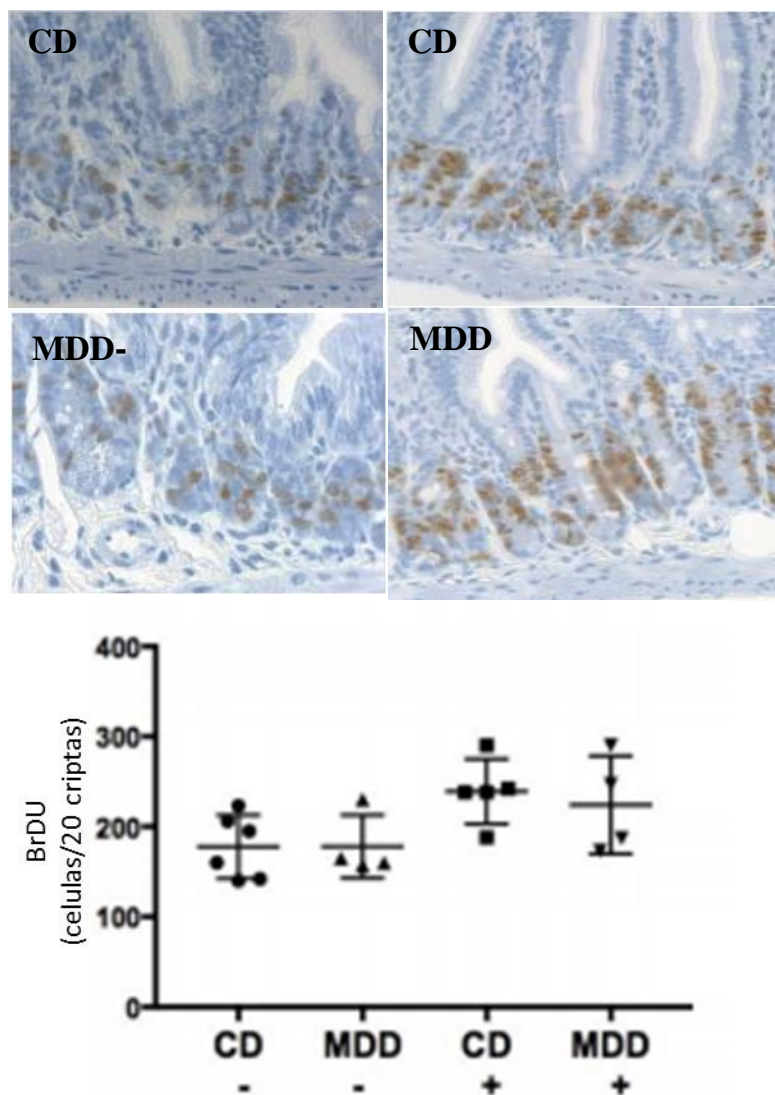


Figura 17 - Criptas do jejuno mostrando a quantidade células marcadas com BrDU. No topo cortes histológicos sugerem um aumento de células positivamente marcadas no grupo MDD+. Embaixo, número de células marcadas não mostrou diferenças significativas entre quaisquer dos grupos ( $p > 0,05$ )

#### 4.6. Enteroides

Uma vez isoladas e cultivadas como previamente descritas, criptas do jejuno dos quatro grupos de animais mostraram-se viáveis e capazes de proliferar adequadamente em meio minigut regular e minigut desprovido de doadores de metil (folato e colina). Grandes diferenças morfológicas foram encontradas entre as criptas isoladas dos diversos grupos quando crescendo entre os dois tipos de minigut.

Quando cultivados em meio minigut regular, os grupos oriundos da dieta sem doadores de metil (MDD+ e MDD-) apresentam com tamanho superior aos controles (CD+ e CD-), grande alongamento do domínio de cripta e tendência a menor quantidade de brotamento de criptas por enteroide (figura 19), assumindo uma morfologia próxima a de um padrão tubular. O padrão morfológico dos enteroides foi mantido mesmo após sucessivas passagens.

Quando cultivados em meio sem doadores metil, enteroides oriundos dos quatro grupos apresentaram tendência de se desenvolver na forma de um padrão tubular de crescimento, expandindo o tamanho do domínio de cripta e com tendência a reduzir o domínio de vilos. Em tal tipo de meio, MDD- e CD+ demonstram serem os grupos melhor adaptados a sobreviver em meio pobre em doadores de metil (figura 20)

A análise de células em estado proliferativo realizada com EdU também revelou diferentes padrões de proliferação quando as criptas cresciam em meio com doadores metil. Em meio minigut regular os grupos MDD+ e CD+ apresentaram redução considerável de células proliferativas comparadas ao controle CD- como mostra a figura 21.

A análise do tamanho nuclear foi realizada medindo-se a área mediana dos núcleos dos enteroides (Figura 22). Tal análise revelou diferenças significativas entre enteroides oriundos das dietas deficientes de doadores de metil (MDD- e MDD+) e a dieta controle, sendo destes últimos muito superiores em tamanho. Embora também tenha se verificado aumento do tamanho nuclear em enteroides do grupo CD+, tal aumento não foi significativo. O antibiótico revelou-se um importante discriminante entre as dietas deficientes em doadores metil, aumentando de forma significativa o tamanho nuclear do MDD+ em comparação ao grupo MDD-.

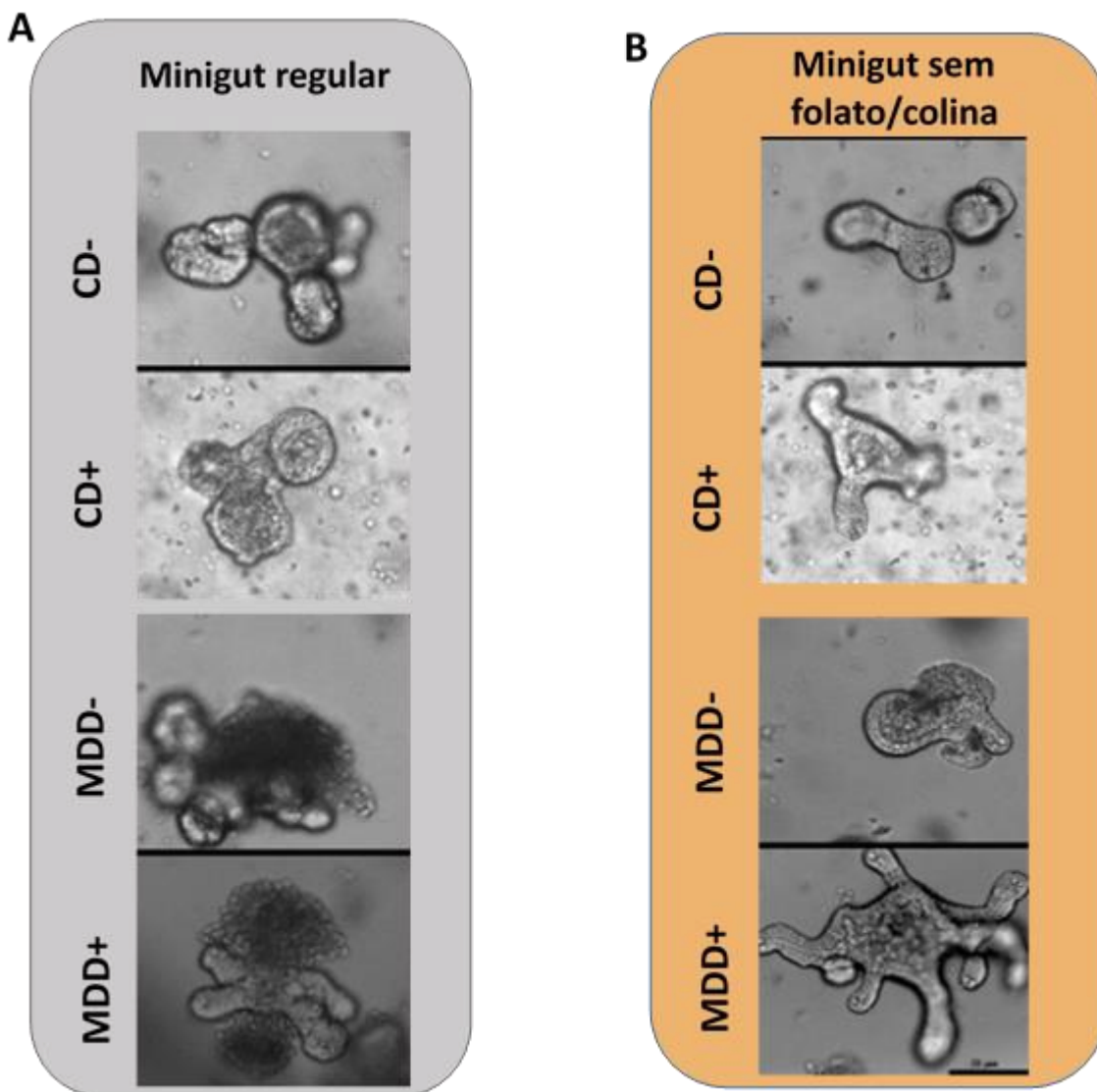


Figura 18 - Enteroides cultivados a partir de criptas isoladas de jejuno de camundongos expostos às dietas controles e deficiente de doadores metil, cultivados em meio minigut regular (A) e minigut sem doadores metil (B) em passagem 0 (3 dias idade). Cultivados em meio minigut regular (A), as dietas CD+, MDD- e MDD+ apresentam dismorfismo quando comparadas ao controle CD-. Quando cultivados em meio sem doadores metil (B), o dismorfismo, CD- reduz o número de domínios de cripta e embora tal parâmetro não seja alterado nos grupos CD+, MDD- e MDD+, a morfologia de tais enteroides sugere ainda mais dismorfismo.

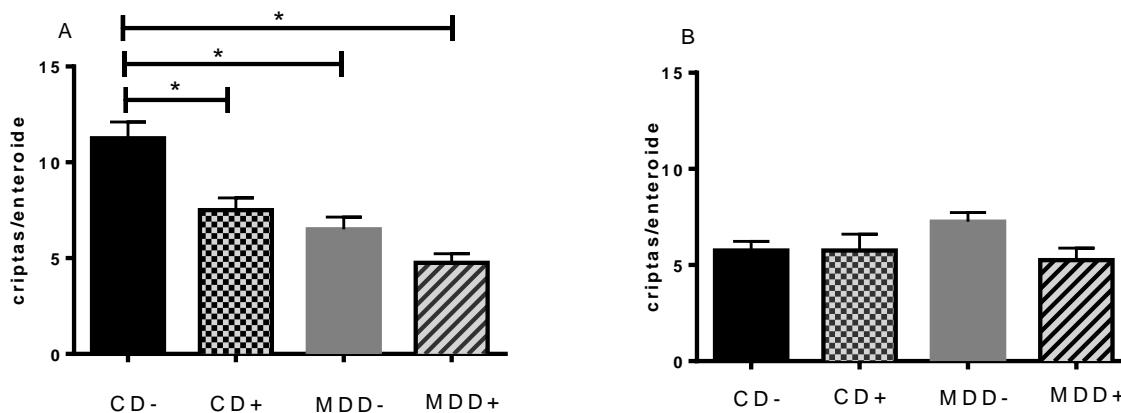


Figura 19 - Número de criptas/enteroide em enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivadas em minigut regular (A) e minigut sem doadores de metil (B). Em meio regular (A), enteroides do controle sem antibiotico (CD-), mostram número significativamente aumentado de criptas quando comparadas com qualquer um dos outros três grupos. Quando cultivados em meio sem doadores de metil (B), há um grande decréscimo no número cripta/enteroide no grupo CD- e assim, quaisquer diferenças importantes mostram-se inexistentes.

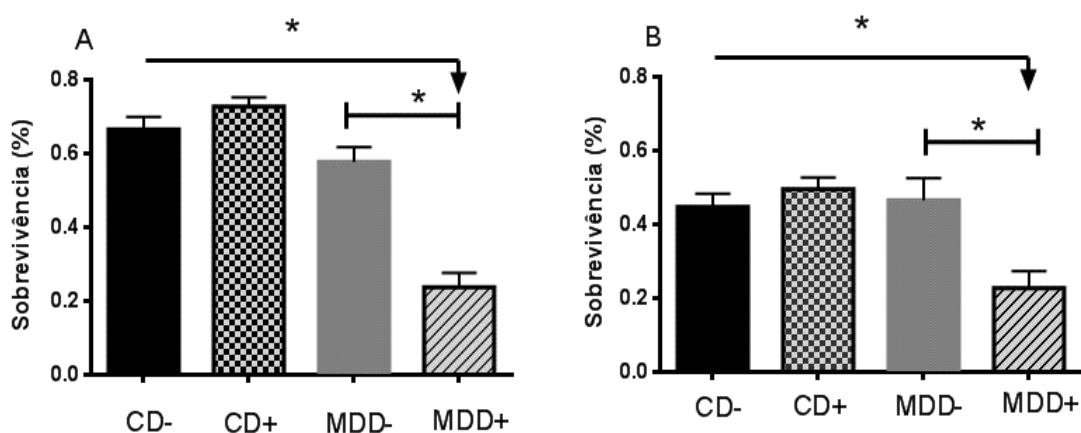


Figura 20 - Sobrevivência de enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivados em minigut regular (A) e minigut sem doadores de metil (B) em passagem 0 (zero). A sobrevivência foi calculada como a porcentagem de enteroides viáveis remanescentes após o sexto dia de cultivo. Seja cultivado em meio regular ou meio deficiente de doadores metil, MDD+ apresenta sobrevivência significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) comparada a dieta controle e também a MDD-

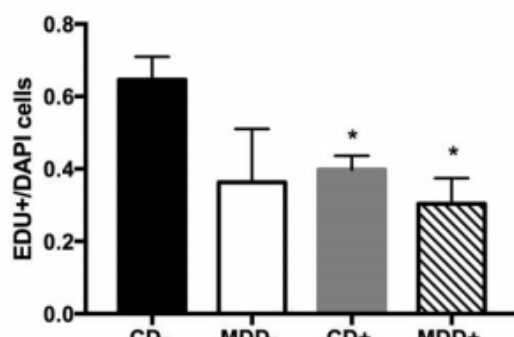
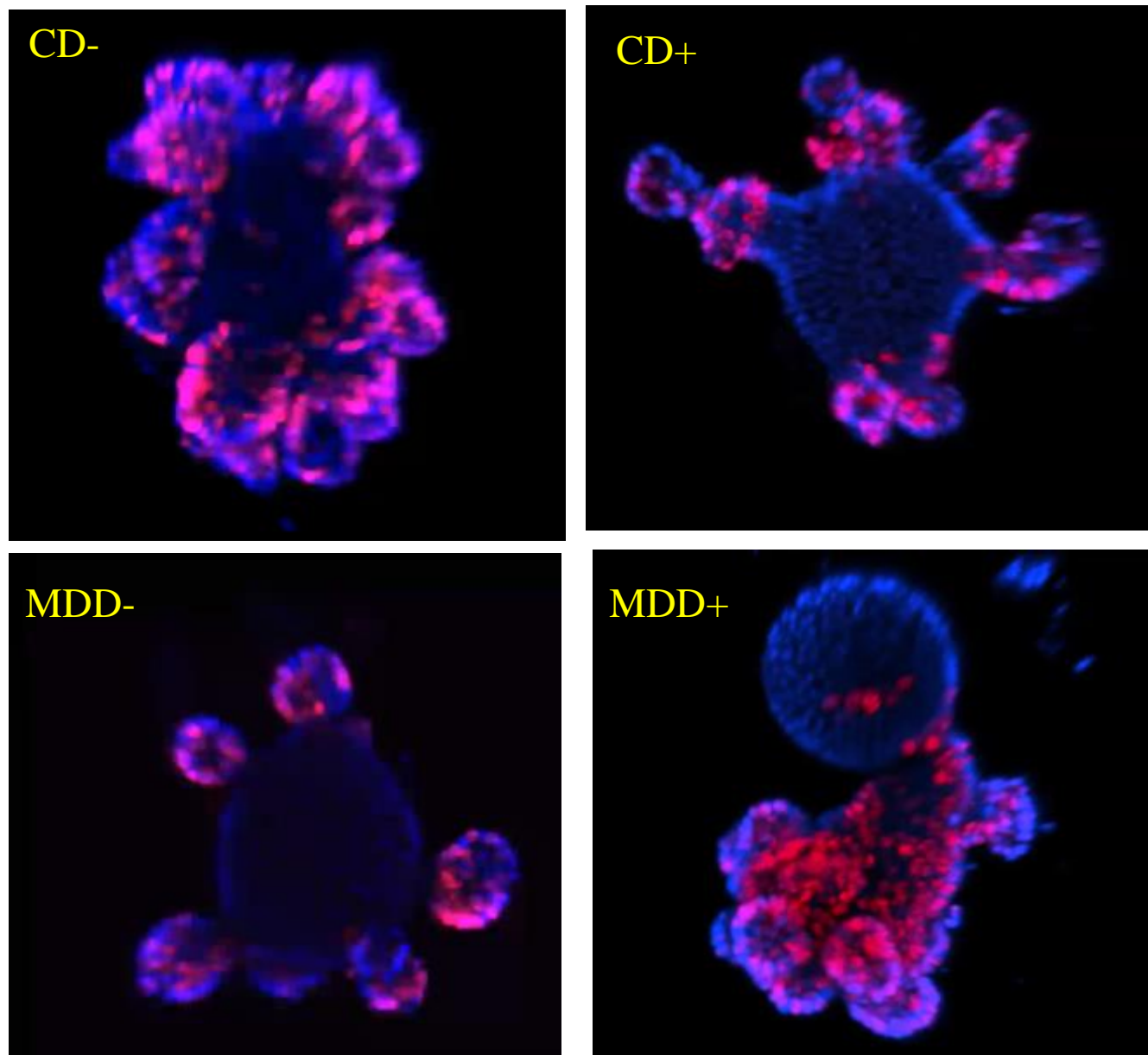


Figura 21 – Microscopia confocal e quantificação de células positivamente marcadas com EdU (células em vermelho) em enteroides obtidos a partir do isolamento de criptas de jejuno cultivados em minigut regular. Magnificação: 20x

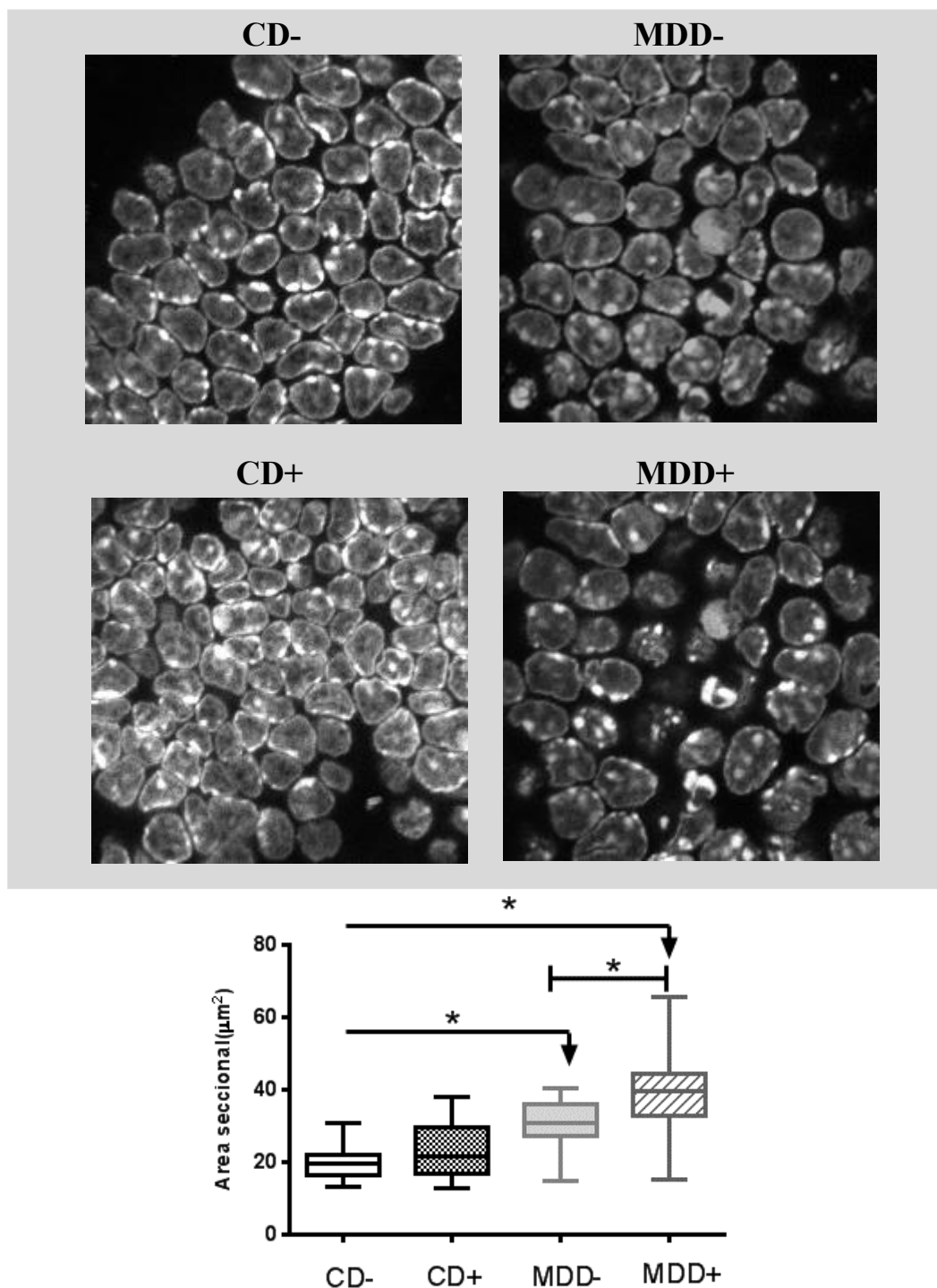


Figura 22 – Enteróides derivados de criptas de animais expostos a dieta deficiente em doadores de metil possuem tamanho aumentado dos núcleos celulares. Figura mostra a área de seções transversais de núcleos na base do domínio de vilos de enteróides cultivados em minigut regular. Enteróides oriundos de cripta de jejuno de animais submetidos a dieta deficiente em doadores de metil apresentam núcleos significativamente maiores em comparação ao controle CD- ( $p < 0,05$ ). MDD+ apresenta núcleos superiormente significativos em relação a MDD-



#### 4.7. PCR array

Após três sucessivas passagens crescendo em meios minigut regular e/ou meio reduzido em 90% de doadores de metil (minigut MDR), enteroides cultivados a partir de criptas do jejuno apresentaram-se visualmente diferentes com características morfológicas semelhantes às aquelas observadas em enteroides derivados da cripta de animais expostos a dieta deficiente de doadores metil (figura 23). Ou seja, controles apresentaram morfolologicamente normais, com um grande número de domínios de cripta distribuídos homoganeamente ao redor do domínio de vilos, ao passo que enteroides do meio minigut MDR apresentaram dismórficos com tendência a pouco domínios de cripta, padrão tuboide e grande alongamento dos domínios de cripta.

Uma vez atingido o fenótipo acima descrito, procedeu-se a coleta do RNA total para análise transcriptômica. Esta análise, centrada essencialmente na transcrição de genes para identidade de células tronco intestinais e linhagens progenitores, não mostrou qualquer diferença para os genes de célula tronco da reserva +4: *Bmi1* ( $p=0,753$ ), *Lgr5* ( $p=0,1831$ ), e *Hopx* ( $p=0,4347$ ). Contudo, enteroides cultivados em minigut MDR mostraram valores significativamente baixo para os genes de células tronco *Ascl2* ( $p=0,0002$ ) e *Lrig* ( $p=0,0047$ ) comparados aos enteroides cultivados em minigut regular, conforme mostra tabela 6.

Enteroides cultivados em minigut MDR, exibiram significativo aumento transcricional do gene *Atoh1* ( $p=0,0305$ ), gene relacionado a identidade da reserva de precursores da linhagem secretória da mucosa intestinal. Em contrapartida, *Hes1* ( $p=0,6348$ ), associado ao precursor da linhagem absorptiva, não mostrou diferenças entre os dois grupos de enteroides avaliados (Tabela 6).

Entre os genes relacionados ao processo de maturação celular, apenas *Sox9* ( $p=0.0094$ ) mostrou diferença importante revelando-se significativamente baixo no grupo cultivado em minigut MDR.

A figura 24 mostra de forma sucinta as diferenças de transcrição mais importantes encontradas entre os dois grupos avaliados. De forma geral, o cultivo de enteroides em minigut MDR mostrou redução de genes relacionados à identidade de células tronco, seguido também por

redução transcricional de um gene associado a maturação celular (*sox9*). Tais reduções transcricionais foram acompanhadas do aumento de *Atoh1*, associado ao pool de reserva da linhagem secretória.

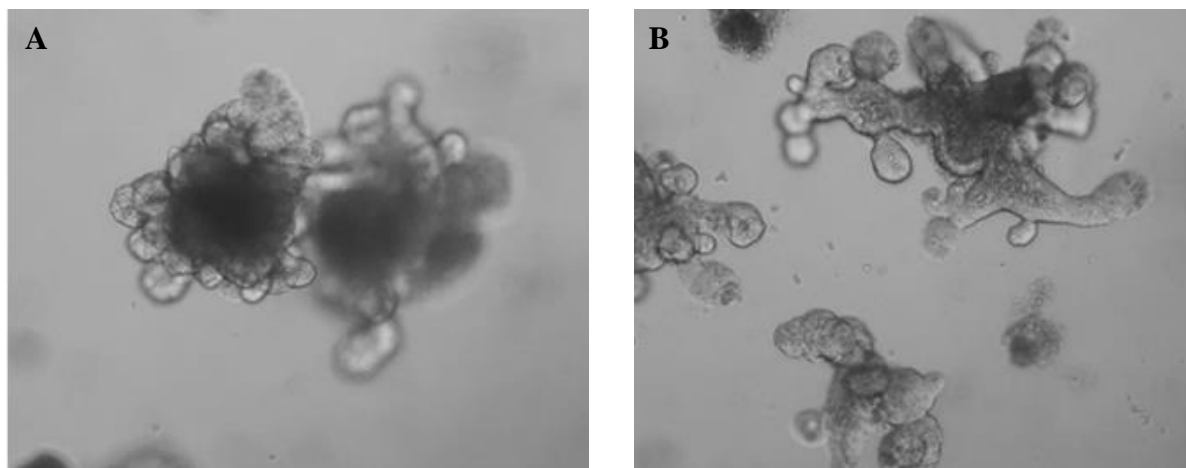


Figura 23 - Fotografias representativas de enteroides com 6 dias de idade cultivados em meio minigut regular (A) e meio minigut reduzido em doadores metil, MDR (B)

Tabela 6 - Resultados da transcrição de genes de enteroides cultivados em meio minigut regular e meio reduzido em doadores metil.

	Gene	p value
Células tronco intestinais	<i>Ascl2</i>	0.0002 *
	<i>Lrig1</i>	0.0047 *
	<i>Bmi1</i>	0.7530
	<i>Hopx</i>	0.4347
	<i>Lgr5</i>	0.1831
Progenitores	<i>Atoh1</i>	0.0305 *
	<i>Hes1</i>	0.6348
Diferenciação terminal	<i>Sox9</i>	0.0094 *
	<i>Klf4</i>	0.0181
	<i>Spdef</i>	0.2049

(\*) estatisticamente significativa

Fonte: Elaborado pelo autor

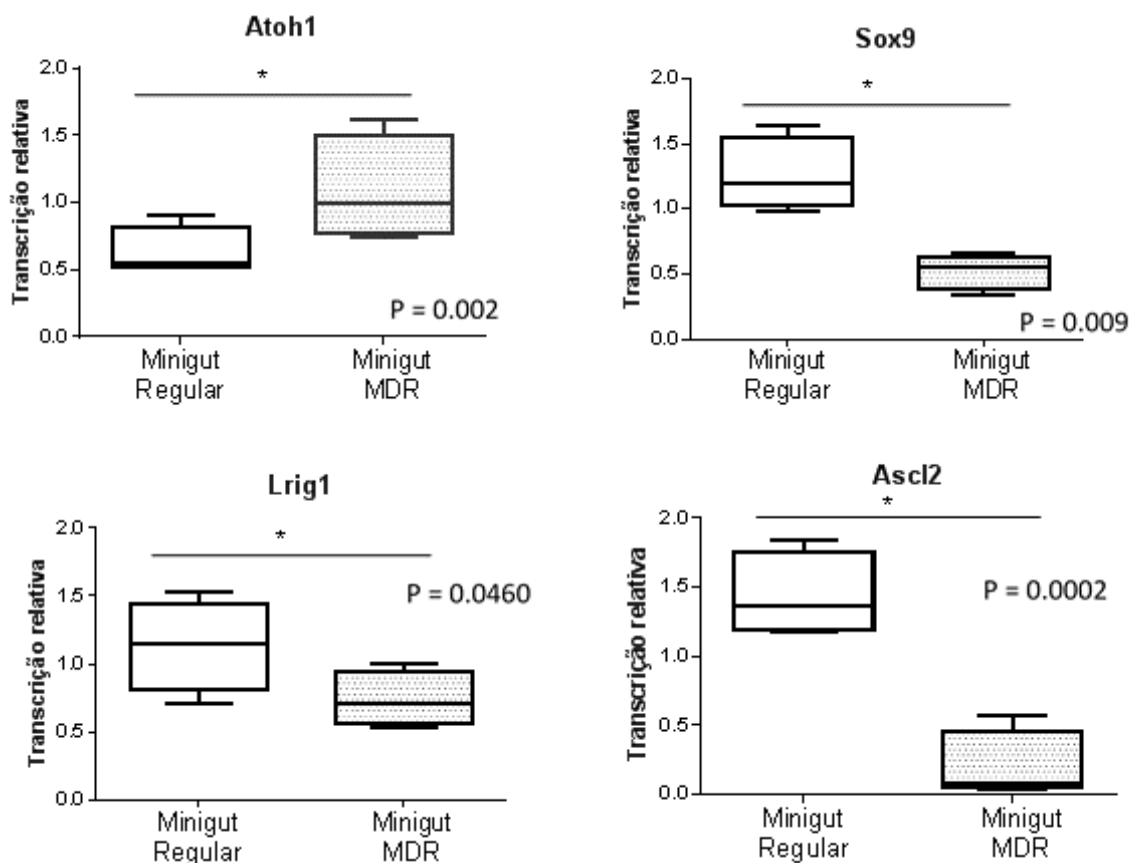


Figura 24 - Resultados significativos de PCR encontrados entre o grupo cultivado em minigut regular e minigut MDR. A deficiência de doadores metil reduz a transcrição de genes de célula tronco (*Lrig1* e *Ascl2*), aumenta gene da linhagem progenitora secretória (*Atoh1*) e reduz transcrição de gene relacionado a diferenciação terminal de células maduras encontrada em células de Paneth (*Sox9*)

#### 4.8. Metilação do DNA

A metilação global do DNA realizado em elementos repetitivos mostrou redução importante do nível de metilação do DNA no grupo cultivado com minigut reduzido em doadores metil (minigut MDR) somente para IAP ( $p=0,04$ ). O percentil de metilação de LINE-1 não revelou qualquer diferenças entre os dois grupos, conforme mostra a figura 25.

A análise do nível de metilação dos genes (realizado nas 3' CGIs) relacionados com a maturação e diferenciação não mostrou quaisquer diferenças de metilação para *Lpar5* entre os dois

grupos ( $p=0,1305$ ). Em contrapartida, *B4Galnt1* ( $p=0,0005$ ) e *Phospho1* ( $p=0,0020$ ) envolvidos na síntese de glicofosfolípidios mostrou-se que estes genes encontram-se significativamente menos metilado (figura 26).

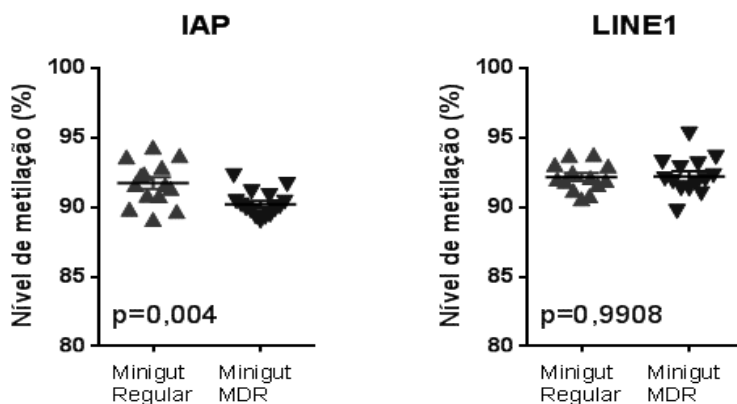


Figura 25 - Metilação global de DNA em células tronco intestinal em enteroides cultivados em meio minigut regular e minigut reduzido em doadores metil (MDR). IAP mostrou-se menos metilado ao passo que não foi encontrada qualquer diferença quanto ao nível de metilação para LINE-1

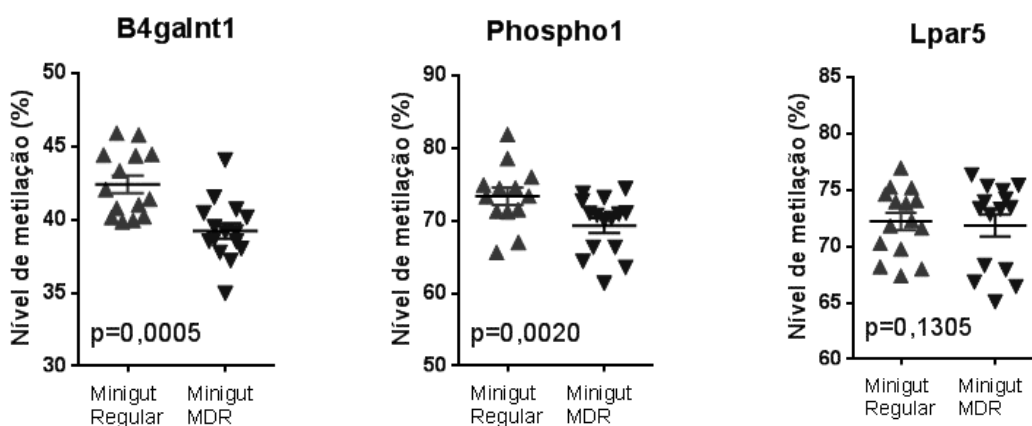


Figura 26 – Metilação de DNA em células tronco intestinal em enteroides cultivados em meio minigut regular e minigut reduzido em doadores metil (MDR). *B4galnt1* e *Phospho1* exibiram níveis de metilação significativamente mais baixos no grupo minigut MDR. *Lpar5* não mostrou qualquer diferença importante.

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi pensado com o objetivo de estudar os efeitos da deficiência na dieta de doadores de metil (referidos aqui como folato e colina) sobre a dinâmica da célula tronco intestinal. Para este objetivo, a prole de camundongos foi exposta ou não a dieta sem doadores metil ainda no período pré-natal, seguindo-se com tais dietas na amamentação e período de vida subsequentes. O estudo procurou focar essencialmente sobre o impacto de tal dieta no jejuno, segmento onde a maior parte da absorção de muitos nutrientes ocorre.

O uso de modelos experimentais animais para o estudo da deficiência de folato/ácido fólico constituiu um problema por longo tempo, pois embora tal nutriente seja de grande importância para todos os mamíferos, apenas primatas exibiam alterações hematológicas decorrentes da remoção de folato em suas dietas (WAGNER, 2001). A preocupação com alterações hematológicas como forma de certificação da deficiência de folato é justificável ante a mais evidente característica da falta de folato: anemia megaloblástica.

Em modelos murinos experimentais a remoção isolada de folato era raramente utilizada como estratégia para produzir dietas experimentais de deficiência deste micronutriente pois tais dietas têm como principal fonte de nitrogênio o fornecimento da proteína caseína; esta, por sua vez, contém concentrações adequadas de folato, que são requeridas para o crescimento normal dos animais (WALZEM; CLIFFORD, 1988; BILLS et al., 1992), muito embora tais concentrações sejam tidas apenas como residuais. Tal problema foi, pela primeira vez, contornado por Walzem & Clifford (1988) que empregaram a utilização de uma mistura de aminoácidos em substituição ao uso da proteína caseína como principal fonte de nitrogênio em dietas elaboradas para camundongos e ratos (WAGNER, 2001).

A formulação de todas as dietas utilizadas no presente estudo utilizou caseína purificada como fonte de nitrogênio, mas ainda assim mostrou-se eficiente em causar a deficiência de folato como demonstrado pelas dosagens séricas, achados hematológicos e por outros indícios como discutido adiante. Parte do êxito logrado pode ser imputado à qualidade do modelo utilizado, onde a privação iniciou-se no período pré-natal seguindo-se pelas semanas de vida subsequentes; outra parte do êxito pode ser atribuída às condições de barreiras físicas utilizadas pelo presente estudo, como o acesso altamente controlado ao ambiente dos animais feito somente sob paramentação com vestimentas estéreis, uso de ar purificado, manipulação asséptica, etc.

As diferenças de peso em animais expostos à dieta sem doadores metil é um fator de precoce destaque no presente estudo. A perda de peso em roedores submetidos a deficiência de folato já foi relatada anteriormente em outros trabalhos (TAGBO; HILL, 1977; WALZEM; CLIFFORD, 1988; BILLS et al., 1992; GOSPE et al., 1995). Em tais estudos, camundongos perderam peso de forma gradativa vindo a apresentar um pico de diferença por volta da quinta semana após a implantação da dieta (BILLS et al., 1992; GOSPE et al., 1995). Apesar das diferenças metodológicas entre os trabalhos citados e o presente estudo, vale salientar a reprodutibilidade de que o modelo aqui utilizado foi realmente capaz de induzir deficiência do micronutriente. No presente trabalho, a cinética observada na diferença de peso entre grupo controle e dieta deficiente (máxima de diferença entre 2-3 semanas) pode ser atribuído ao fato da prole ter nascido de mães com grau de deficiência nos dois micronutrientes utilizados e não apenas ácido fólico como nos demais estudos.

Em estudo publicado por Gospe e colaboradores (1995), camundongos com deficiência de folato não apenas consumiam maiores quantidades de alimento (sem ganho considerável de peso corpóreo), mas também derramavam frações significativas da porção de alimentos a eles diariamente ofertada. Dada a consistência destes resultados, os autores chegaram mesmo a propor que o comportamento associado à destruição de alimento poderia ser decorrente de alterações neuroquímicas subjacentes a deficiência de tal nutriente e que tal observação poderia, inclusive, ser utilizada como parâmetro para o monitoramento da deficiência severa de folato em camundongos (GOSPE et al., 1995). A hipótese de um componente neural alterado associado à deficiência do nutriente como um fator capaz de induzir modificação comportamental foi explorada por trabalhos mais recentes. Em um modelo de deficiência pré-natal de folato, similar ao utilizado no presente estudo, a prole de camundongos nascidos de fêmeas em dieta deficiente de folato mostraram-se significativamente pouco exploradores no teste de campo aberto. Adicionalmente, os mesmos animais gastavam mais tempo no braço fechado do labirinto e, conseqüentemente, menos tempo no braço aberto, uma clara evidência de que a deficiência gestacional de folato causou ansiedade nos camundongos (FERGUSON et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais os micronutrientes promoveram um apropriado ganho de peso não é completamente elucidado. Uma possível explicação seria que a má nutrição, ao proporcionar um aporte insuficiente de micronutrientes, pode interferir com as funções normais da microbiota explicando, assim, a relação existente entre desnutrição e disbiose (BIESALSKI, 2016). Uma vez

que a digestão de nutrientes e obtenção de energia são funções comuns atribuídas à microbiota intestinal (ROSSI; AMARETTI; RAIMONDI, 2011; FOXX-ORENSTEIN; CHEY, 2012), a interferência na microbiota proporcionada pela deficiência de micronutrientes poderia potencialmente prejudicar o balanço energético do hospedeiro.

### **5.1. Oscilação dos valores de folato sérico encontrados no presente estudo**

O uso de valores de referência para quaisquer parâmetros biológicos em camundongos é algo de difícil estabelecimento e padronização. Tais parâmetros oscilam ao sabor de uma ampla gama de variáveis que dificilmente seriam padronizáveis dada as próprias características biológicas da espécie. Portanto, a avaliação a deficiência de folato sérico com base em valores previamente estabelecidos é algo não factível.

Outros trabalhos que produziram deficiência de folato em camundongos reportaram valores de folato séricos diferentes daqueles encontrados pelo presente estudo. Tais discrepâncias podem ser explicadas por diversos fatores dentre os quais vale a pena destacar as diferentes nuances do modelo animal utilizado em cada estudo e, sobretudo, as diferentes metodologias analíticas empregadas. MacGregor e colaboradores (1990) relataram valores da ordem de  $0,69 \pm 0,06$  ng/mL; Bills et al (1992) encontraram valores  $2,54 \pm 0,69$  ng/mL; o método analítico utilizado por ambos foi um ensaio microbiológico com *Lactobacillus casei* capaz de quantificar os derivados do ácido fólico. Leamon et al (2008) encontraram valores da ordem de 35nM quantificado através de radioimunoensaio. O presente trabalho, fazendo uso da técnica de imunoensaio enzimático, encontrou valores inferiores a 10 pg/mL em animais que se alimentaram da dieta pobre em doadores metil. Tais valores sendo em média 15 vezes menor que o valor de folato encontrado nos animais da dieta controle (CD+ e CD-) demonstrou claramente que o fenótipo de deficiência de folato foi alcançado com sucesso.

### **5.2. Alterações hematológicas encontradas harmonizam-se com um esperado quadro de**

### **deficiência de folato em animais expostos a dieta deficiente de doadores de metil**

Em humanos e outros primatas é bem estabelecido a relação causal entre deficiência de folatos e o estabelecimento de anemia megaloblástica, doença cuja característica de maior evidência é a macrocitose eritrocitária, caracterizada pelo aumento do volume corpuscular médio (MCV) observado no hemograma ou visualizado através do esfregaço do sangue periférico. Em camundongos a mesma relação causal é aplicável; entretanto, apesar da doença hematológica decorrente da deficiência de folato em camundongos compartilhar muitas das características com a anemia deficiente de folato em humanos, a macrocitose, característica mais marcante, não está necessariamente presente em tais roedores (PORSE, 2010). Além do mais, deve ser considerada a limitação do método utilizado pelo presente estudo em quantificar com exatidão a presença de eritrócitos macrocíticos, pois sabe-se que inferir a presença de macrocitose por meio de índices hematimétricos obtidos de contadores automatizados pode levar a subestimar a presença desta em mais 30% dos casos (DAVIDSON; HAMILTON, 1978). Portanto, para as condições utilizadas pelo modelo animal utilizada no presente estudo o aumento da amplitude de distribuição de tamanho das hemácias (RDW) (figura 13A) e redução do valor de hemoglobina são indicativos de uma alteração de um quadro hematológico. A constatação da implantação da macrocitose no grupo MDD+ como vista na figura 13B não é uma condição necessária para anemia megaloblástica e no presente modelo pode ser explicada tanto pela exacerbação da deficiência de folato (efeito combinado da deficiência de origem dietética e deficiência de folato sintetizado pela microbiota) como também pode ser devido a um efeito colateral do uso de sulfametoxazol. Embora plausível, consideramos como pouco provável que a macrocitose seja produto uma reação adversa, dado que a mesma reação não foi verificada nos animais do grupo controle com antibiótico (CD+).

Ademais, é oportuno mencionar, uma avaliação laboratorial do perfil hematológico dos animais implicaria em adicionar análises que contemplassem, dentre outros, a atividade de órgãos hematopoiéticos, ferrocínica hepática e a quantidade das unidades formadoras de colônias de cada linhagem hematológica fugindo, dessa forma, ao escopo do presente estudo. O que deve ser plasmado de tal resultado é o efeito combinado da dieta pobre em doadores metil associado à presença do antibiótico sulfametoxazol. Sob tais circunstâncias parece haver um efeito sinérgico do antibiótico e dieta, que leva à exacerbação do fenótipo estudado, proporcionando visibilidade não apenas local (a nível de intestino), mas também visibilidade sistêmica como a que se observa



no hemograma. A administração do antibiótico comprometeu gravemente uma fonte extra de folatos (sintetizados pela microbiota) e, combinado com a dieta deficiente em doadores metil, produziu efeitos muito pronunciados também ao nível tecidual e celular como visto mais adiante.

No presente trabalho, a visibilidade das repercussões sistêmicas (entendidas aqui como as alterações hematológicas encontradas) verificada de forma contundente no grupo da dieta deficiente com o antibiótico, MDD+, ilustra a importância que a microbiota intestinal pode desempenhar em condições de deficiência de micronutrientes, bem como na fisiologia do trato gastrointestinal como um todo. Em condições fisiológicas normais, parte de alguns dos micronutrientes necessários ao organismo são obtidos através de uma relação mutualística por micro-organismos que habitam o trato gastrointestinal (FOXX-ORENSTEIN; CHEY, 2012; LEBLANC et al., 2013). A crônica administração de sulfametoxazol, um antibiótico de ação bacteriostática, causou mudanças na microbiota intestinal dos animais, possivelmente reduzindo de forma qualitativa e/ou quantitativa as bactérias lá presentes que, por sua vez, impactaram negativamente na produção de metabólitos de 1 carbono no grupo que recebeu antibiótico associado à dieta (MDD+).

### **5.3. A heterogeneidade de transportadores ao longo do intestino delgado pode fornecer potencial explicação para o íleo ter sido o segmento mais afetado com a dieta deficiente de doadores de metil.**

Os achados histológicos do presente estudo demonstraram que a deficiência de doadores de metil foi, de fato, capaz de causar alterações na microestrutura do trato do intestino delgado, tal como foi hipotetizado anteriormente no início do presente trabalho. Como já mostrado nos resultados, tais alterações estruturais vão além das simples diferenças de profundidade de cripta e passam por uma reestruturação no tamanho e disposição espacial ao nível celular.

A princípio, o presente trabalho foi delineado para investigar em maior profundidade as alterações a serem encontradas no duodeno, dado que este segmento constitui a parte do intestino delgado onde ocorre a maior parte da absorção de nutrientes. Isto foi planejado ao considerar que a enteropatia ambiental, dentre outras características, reduz a capacidade absorptiva do intestino e modifica a microestrutura da mucosa intestinal. Contudo, o resultado obtido foi levemente

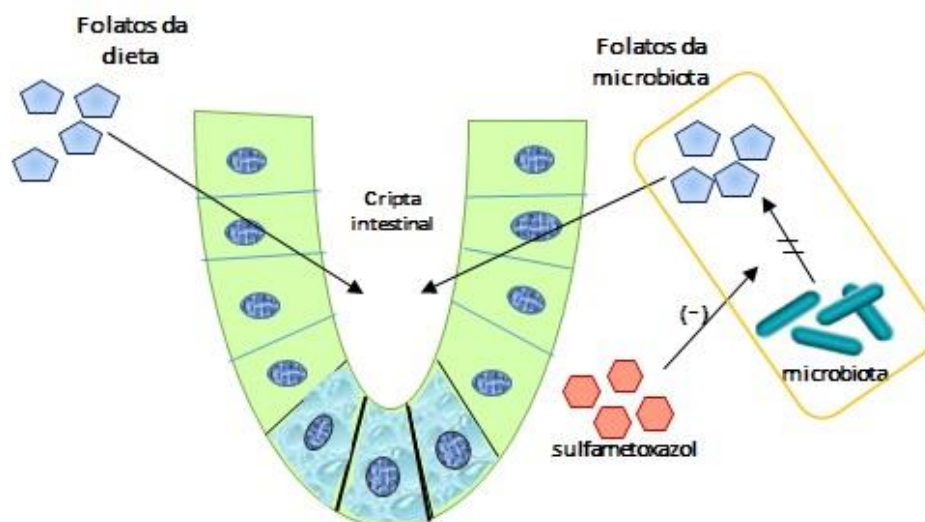
diferente daquele esperado.

Ao contrário do resultado reportado por Howards et al, onde as alterações no íleo provocadas pela dieta deficiente de doadores metil chegaram a ser irrisórias (HOWARD; WAGNER; SCHENKER, 1964), os achados do presente estudo encontraram no segmento ileal as alterações mais fortemente pronunciadas em termos de hipertrofia de cripta. Especulamos que a porção ileal foi mais afetada devido a própria disposição anatômica do íleo, ou seja, sob a condição de dieta pobre em nutrientes, as células da mucosa foram gradativamente absorvendo os nutrientes bem como nutrindo a si próprias no sentido proximal-distal, de forma tal que o bolo alimentar ao chegar no íleo dispôs de concentrações ainda mais inferiores daqueles nutrientes. Além da disposição anatômica, adicionaríamos o fato de que em roedores o íleo não expressa proteínas para realizar o transporte ativo de folatos (QIU et al., 2006). Enquanto no jejuno, onde o folato é majoritariamente absorvido, a absorção se dá por meio de transporte passivo, que segue um gradiente de concentração e também por meio de transporte ativo via transportador de folato reduzido 1 e 2 (RFT-1 e RFT-2) e proteína ligadora de folato (FBP) (BUTLER et al., 2006; MOESTRUP, 2006; QIU et al., 2006).

#### **5.4. A hipertrofia de cripta associada ao uso de antibiótico pode estar relacionado ao papel na microbiota na produção de folatos e na diferença de biodisponibilidade entre folatos.**

O uso do antibiótico sulfametoxazol por si foi suficiente para induzir uma moderada hipertrofia de cripta de forma similar àquela hipertrofia induzida pela dieta pobre de doadores metil. A este efeito, atribuímos ser uma ação indireta do sulfametoxazol que se dá através da mediação deste sobre a microbiota, não um efeito direto decorrente da ação da droga sobre as células da cripta. Isto pode ser afirmado com base em prévios experimentos *in vitro* onde utilizamos diferentes concentrações desse antibiótico sem que qualquer ação ao nível de cripta fosse observada. Mesmo nas concentrações mais altas (dado não mostrado). Portanto, acredita-se que tal efeito deve-se ao dano causado à microbiota por esse antibiótico; esta, uma vez danificada, reduziria a produção de doadores de metil ao hospedeiro. Uma representação diagramática da ação do antibiótico sobre o comprimento da cripta é mostrada na figura 27. Nesta figura a cripta é alimentada por duas fontes de folatos, uma fonte representa os folatos alimentares providos pela dieta, a outra fonte representa os folatos que são constantemente sintetizados pela microbiota. O

uso do antibiótico, por sua ação bacteriostática, prejudicaria o funcionamento de uma das fontes de folatos (microbiota). Por conseguinte, causaria uma deficiência parcial de folato com consequência para o comprimento da cripta.



*Figura 27 - Hipótese proposta para explicar o aumento da profundidade de cripta associado ao uso de antibiótico no modelo utilizado pelo presente estudo (in vivo). O aumento do comprimento de cripta associado ao sulfametoxazol seria decorrente de uma ação indireta do efeito bacteriostático do antibiótico sobre a microbiota intestinal e não uma ação direta sobre a célula intestinal. A ação sobre a microbiota determinaria um decréscimo na produção de folatos criando, dessa forma, algum grau de deficiência de folato no intestino. Hipótese proposta foi baseada principalmente na observação de que altas concentrações de sulfametoxazol in vitro não apresentou qualquer efeito sobre comprimento da cripta em enteroides, pois a concentração de ácido fólico no meio de cultivo fornecido foi constante e inalterável. Fonte: elaborado pelo autor.*

Complementando a explanação acima, outra explicação que se soma à moderada hipertrofia de cripta causada pelo sulfametaxozal diria respeito a diferença de biodisponibilidade entre folatos providos através da dieta e aqueles sintetizados pela microbiota. Embora em mamíferos a absorção de nutrientes aconteça primariamente no duodeno e na porção alta do jejuno, o folato produzido por bactérias que habitam o cólon excedeu a ingesta diária e pode potencialmente afetar o status de folato do hospedeiro. Em estudos realizados em crianças e filhotes de porcos, evidenciou-se que a microbiota colônica produziu principalmente folato monoglutamilado, que é a forma de folato que tem a maior taxa de absorção (KIM et al., 2004; ROSSI; AMARETTI; RAIMONDI, 2011). Em ratos, a administração cecal de ácido p-aminobenzóico (precursor do folato) radiomarcado resultou num aumento de folato radiomarcado em vários tecidos do hospedeiro (RONG et al., 1991). Mesmo em humanos, é sabido que a ingesta típica de folatos decorrentes da dieta é muitas vezes sub-ótima para muitos indivíduos; algo que é, com frequência, atribuído a pobre biodisponibilidade dos folatos naturais presentes nos alimentos (MCNULTY; PENTIEVA, 2004). Portanto, ao considerarmos tais achados na literatura e os dados obtidos pelo presente trabalho, especulamos que no modelo utilizado pelo presente estudo os folatos produzidos pela microbiota poderiam representar uma melhor fonte deste micronutriente e de outros doadores de metil para o intestino; fonte esta com maior biodisponibilidade do que a fonte de folatos alimentares providos através de dieta.

A redução na síntese de micronutrientes decorrentes da alteração na microbiota foi alvo de um interessante estudo realizado por Brown et al. (2014), onde os autores mostraram que em camundongos, o consumo de uma dieta moderadamente pobre em micronutrientes em combinação com exposição oral a espécies de Bacteroidales e *Escherichia coli* causa alterações no intestino delgado similares aquelas da enteropatia ambiental encontrada em humanos.

Há muito existem relatos sobre a relação clínica bem estabelecida entre a administração de ácido fólico e a melhora da Sprue tropical. Tais relatos datam de pelo menos 7 décadas (SUÁREZ; SPIES; SUÁREZ, 1947), mas desde então poucos estudos têm tentado explorar a recíproca de tal fenômeno, o que é em parte compreensível pois, como já discutido anteriormente, havia uma grande escassez de modelos animais disponíveis. Consideramos que o modelo aqui apresentado pode ser útil para estudar essa relação existente entre folatos e alterações na microestrutura

intestinal.

### **5.5. Contribuição do presente estudo ao modelo as doenças relacionadas a pobreza**

Os dados encontrados no presente estudo podem fornecer alguma contribuição ao ciclo vicioso das doenças da pobreza. Dentre outros, tal modelo afirma que as alterações intestinais observadas na enteropatia ambiental são uma resposta adaptativa da mucosa a um constante e sustentado desafio microbiológico, associada a um pobre status nutricional. Como parte de tal resposta haveria secreção de biomoléculas ativas (citocinas e quimiocinas), recrutamento e ativação de células do sistema imune inato, bem como células apresentadoras de antígenos para o sistema imune adaptativo. Outra consequência dessa resposta inclui o desvio de nutrientes para serem utilizados na síntese de proteínas de fase aguda e outros mediadores inflamatórios. Como consequência, haveria um desvio de energia retirada do anabolismo requerida para a construção de novos tecidos priorizando o catabolismo e assim causando o déficit de crescimento (HUMPHREY, 2009).

A literatura oferece inúmeros casos e exemplos que ilustram bem o papel da inflamação crônica como causa de anormalidades histológicas da mucosa intestinal comumente encontradas na enteropatia ambiental. Dentre tais estudos destacam-se os seguintes:

- O caso das crianças de Gâmbia cujo instalado déficit de crescimento naquela população pode ser explicado pela elevada permeabilidade intestinal e altas concentrações de IgG EndoCAb associado à inflamação bacteriana crônica (CAMPBELL; ELIA; LUNN, 2003);
- O pobre crescimento linear de frangos criados em ambientes altamente contaminados contrastando com o desenvolvimento normal dos controles em ambientes limpos ou tratados com antibióticos (SOLOMONS et al., 1993);
- Os dados de crianças com AIDS ou portadores da doença celíaca demonstram que a inflamação crônica e a integridade comprometida da mucosa constituíram elementos precursores das alterações histológicas comumente encontradas na enteropatia ambiental e associadas com déficit de crescimento (WITTENBERG et al., 2004)

Além dos estudos supramencionados, uma longa série de trabalhos adicionais poderiam ser

aqui citados para mostrar que o entendimento da relação de causalidade estabelecida entre inflamação, desestruturação da micro-arquitetura do intestino e associação com deficiência do crescimento em altura é algo bem estabelecido (STEPHENSEN, 1999; MORAIS; FAGUNDES NETO, 2003; CALDER et al., 2009; MCKAY et al., 2010; KORPE; PETRI, 2012). Uma vez mostrado tais relações na literatura, chama-se aqui atenção acerca das implicações que os dados obtidos com o presente estudo trazem sobre tal entendimento (inflamação-alteração histológica intestinal-redução de crescimento linear).

Embora seja limitado pela ausência de dados acerca da microbiota e dados concernentes a imunologia, as informações obtidas com o presente estudo sugerem que a resposta inflamatória crônica evocada por patógenos externos não representa, necessariamente, uma condição *sine qua non* para o estabelecimento das alterações encontradas na estrutura do intestino delgado (enteropatia ambiental). Os dados obtidos com o modelo do presente estudo apontam que a deficiência do doadores de metil são, *per si*, suficientes como fator de causalidade para tais alterações. E, como visto anteriormente, tais alterações na estrutura histológica mostrou-se satisfatoriamente associada à redução do crescimento linear no modelo utilizado no presente trabalho.

É de grande importância aclarar que ao propor que as alterações histológicas intestinais poderiam ser causadas com a deficiência dietética de doadores de metil, não implica na negação de outras relações causais e mecânicas que explicam o mesmo fenômeno. Nesse ínterim, é muito mais provável que sob condições clínico-epidemiológicas, múltiplos fatores estejam agindo de forma sinérgica e até mesmo síncrona no estabelecimento da enteropatia ambiental, como está bem ilustrado e proposto pelo ciclo vicioso das doenças relacionadas com o baixo poder aquisitivo (GUERRANT et al., 2013; ORÍA et al., 2016).

O fato de alterações histológicas intestinais e déficit de crescimento serem potenciais consequências apenas de deficiência de micronutrientes, como demonstrado no presente trabalho, joga-se mais luz sobre o fenômeno e chama-se por mais responsabilidade a todos os países, independente do status de desenvolvimento econômico que estes possam por ventura ostentar. É bem verdade que a subnutrição é altamente prevalente em países não desenvolvidos ou em desenvolvimento. Contudo, não chega a ser exclusividade de tais áreas geográficas. Mesmo no mundo industrializado, onde as condições sanitárias são otimizadas e, portanto, o fator

predisponente a infecções entéricas tem pouca relevância, a desnutrição pode acontecer, seja por limitações de justiça social ou ainda por más escolhas dos indivíduos acerca de sua alimentação (THUROW, 2016).

### **5.6. Enteróides derivados de animais expostos a dieta deficiente em doadores metil apresentam dimorfismo e função da célula tronco intestinal prejudicada que persiste mesmo sob condições otimizadas de cultivo.**

Com o objetivo de compreender os efeitos decorrentes da privação de doadores metil sobre a dinâmica da célula tronco intestinal, criptas intestinais foram isoladas a partir do jejuno dos animais submetidos às diferentes dietas com vistas ao estabelecimento de enteroides. Também chamados de mini-intestinos, tais enteroides são capazes de recapitular a complexidade dos diversos tipos celulares presentes no epitélio intestinal, mantendo as relações de diferenciação cripta-vilos e também muitas das maiores funções da mucosa intestinal como a secreção de íons sódio e excreção de cloreto (FOULKE-ABEL et al., 2014; ZACHOS et al., 2016).

No tocante ao cultivo de enteroides realizado no presente trabalho, chamamos atenção sobretudo ao fato de que criptas oriundas de animais expostos à dieta deficiente em doadores metil originavam sempre enteroides dimórficos, não importando o número de passagens a que fossem submetidos, não importando se doadores de metil estivessem ou não presentes no meio de cultivo. Isso demonstra de forma clara algum nível de informação gravada diretamente na memória da célula tronco intestinal. Embora não seja possível afirmar com precisão como esta memória opera, elucidamos mais adiante que um componente epigenético obtido a partir de um perfil de metilação diferencial do DNA da célula tronco desempenhou um papel de grande relevância para o fenômeno observado.

Todavia antes de adentrar em vias mecanísticas, é oportuno reclamar atenção para a conservação da morfologia altamente dimórfica dos enteroides mesmo após sucessivas passagens em condições normais de desenvolvimento. Um resultado *in vitro* que ainda de difícil extrapolação para o *in vivo*, leva ao questionamento sobre que momento se situaria o ponto de retorno ou não-retorno, ou seja, em que momento a intervenção *in vivo* seria capaz de lograr êxito ao reparar ou evitar toda a desorganização morfológica da microestrutura intestinal e as demais consequências a

ela associadas. Fica claro que tal ponto de retorno não é após o isolamento de criptas que aconteceu após a sétima semana de vida. A não intervenção ao longo do curso do estudo representou uma grande limitação do presente trabalho, pois assim não foi possível saber se existe ponto de retorno para além da período pré-natal. Mesmo assim, tais resultados veem a corroborar com outros estudos na importância de buscar compreender a dinâmica e tempo adequado a tais intervenções, pois a partir de certo ponto elas se mostram irreversíveis (ADAIR et al., 2013; LEROY et al., 2014). Status adequado de vitaminas é pré-requisito para o desenvolvimento saudável no início da vida. A não provisão de micronutrientes no tempo adequado tem consequências que perdurarão por toda a vida do indivíduo (ELMADFA; MEYER, 2012; LEROY et al., 2014).

No presente trabalho, o tamanho médio aumentado dos enteróides provenientes das dietas pobres em doadores de metil é decorrente de uma reação hiperplásica da cripta como demonstrado pelo tamanho aumentado do núcleo das células que compõe os enteróides. Resultados semelhantes obtidos *in vivo* foram reportados por Howards e colaboradores (1978) onde, ao estudar a deficiência de folato em ratos, encontraram o diâmetro de núcleos dos vilos de jejuno significativamente maiores nos animais expostos à dieta sem folato.

Embora sem informação acerca do tamanho do citoplasma, a área livre existente entre os núcleos do grupo MDD+ sugere-se que a relação núcleo/citoplasma também se encontrava aumentada. Tais mudanças megaloblásticas tais como núcleo grande e cromatina frouxa são sugestivos da presença de células jovens ainda em estado de maturação ou em diferenciação. De forma paralela, as alterações celulares pareceram induzir uma série de outras alterações na estrutura do enteróide que precisariam ser ainda melhor exploradas. Em outro estudo, a dieta pobre em doadores de metil feita ainda na fase fetal, induziu remodelamento da organização celular no estômago, onde as células secretoras de grelina assumiram uma posição aberrante localizando-se na região inferior das células oxínticas. Em consequência, houve disfunções na secreção do peptídeo gástrico grelina com dramáticos efeitos para o crescimento dos animais (MALONEY; HAY; REES, 2007). É provável que estudos futuros subsequentes mostrarão, para além das alterações de remodelamento gastrointestinal, alterações também de natureza funcional.

Uma série de evidências indicam que a célula tronco é elemento de grande importância na compreensão e intervenção de tais alterações. Afinal, o reparo e a contínua renovação da mucosa intestinal após dano ou lesão dependem, em última instância, da célula tronco intestinal. Tais



células são capazes de auto-renovação e produção de todos os tipos celulares indiferenciados necessários ao tecido (WEISSMAN, 2000; BARKER; CLEVERS, 2007).

Sendo o sistema organóide um modelo ensaio *ex vivo* que é reflexivo da função da célula tronco *in vivo* (BOJ et al., 2015), no presente trabalho o comportamento dos enteroides cultivados mostram esclarecimentos importantes do que acontece na mucosa intestinal a nível de célula tronco intestinal nos animais de onde as criptas derivam. O cultivo em meio minigut sem doadores metil reduziu a quantidade de domínio de criptas em enteroides de todos os grupos; em meio regular, número de domínios de cripta foi reduzido nos grupos CD+, MDD- e MDD+ quando comparados ao controle sem antibiótico (CD-). A redução da capacidade proliferativa em meio deficiente é um fenômeno esperado e trivial; contudo, chama atenção a permanência da redução do domínio de cripta mesmo no meio regular quando lhe são fornecidos os nutrientes e meios adequados para crescimento. De forma similar, o reduzido índice de sobrevivência de enteróides derivados de criptas de animais expostos a dieta deficiente de doadores metil (MDD+ e MDD-) quando comparados aos controles com ou sem antibiótico (CD+ e CD-), apontam para alterações a nível de célula tronco intestinal. Juntos, a alteração nos domínios de cripta e redução do índice de sobrevivência de enteróides obtidos pelo presente trabalho apontam para um declínio no potencial regenerativo da célula tronco intestinal e são reminiscentes da perda da capacidade de repovoar o eixo cripta-vilos nos grupos

Cripta e vilos formam uma estrutura que juntamente com miofibroblastos epiteliais (circulam a cripta) e mesênquima constituem a unidade anatômica do epitélio intestinal. Esta unidade anatômica gera continuamente 4 tipos celulares que podem ser classificados em duas linhagens: absorptiva e secretória. Células de Paneth, Goblet e enteroendócrinas pertencem a linhagem secretória. Os enterócitos que perfazem a maior quantidade de células da mucosa intestinal, pertencem a linhagem absorptiva (SATO et al., 2009; NOAH; DONAHUE; SHROYER, 2011; PRESTON et al., 2014). No modelo enteroide, há ausência de miofibroblastos e mesênquima, mas os demais fatores encontram-se conservados, de sorte que tais enteroides ou “mini-intestinos” recapitulam essencialmente todos os aspectos da auto renovação cripta-vilos enquanto permanecem geneticamente e fenotipicamente estáveis (SATO; CLEVERS, 2013).

### **5.7. Deficiência de doadores metil causa aumento transcricional de *Atoh1* relacionado ao**

### **aumento do compartimento de progenitores comprometidos com a linhagem secretória**

Há mais de 30 anos encontra-se em voga na literatura dois modelos relativamente opostos que se propõem a explicar como células tronco intestinais multipotentes alimentam a atividade proliferativa da cripta (JALADANKI; WANG, 2016). O primeiro modelo, também conhecido como modelo clássico, é chamado de “Posição +4”, uma referência direta a quarta posição de células a partir da base da cripta, local onde habita a célula tronco de mais alta multipotência (POTTEN; KOVACS; HAMILTON, 1974); o segundo modelo diz respeito ao conceito da “zona de célula tronco”, localizada abaixo da posição +4 (CHENG; LEBLOND, 1974a). Ainda que sejam objeto de uma grande falta de consenso e matéria para amplas e fecundas discussões, os marcadores avaliados pelo presente estudo representam pelo menos duas populações distintas de células tronco intestinais como sugerido seja pelo modelo da posição +4 seja pelo modelo da zona de célula tronco (DOSSA et al., 2015).

No presente trabalho, a redução transcricional dos marcadores de célula tronco *Lrig1* e *Ascl2* sugere que o pool de células tronco intestinais se encontra diminuído na ausência de doadores de metil. Em acordo com este achado, houve aumento da transcrição de *Atoh1* (progenitor das células da linhagem secretória intestinal) e redução de *Sox9*, um dos alvos da via Wnt, requerido para maturação de células de Paneth (MORI-AKIYAMA et al., 2007). Quando tomados juntos, tais resultados de biologia molecular indicam que a deficiência de doadores de metil induziu nos enteroides um rearranjo do número de células que os compõem, reduzindo o *pool* de células tronco e células de diferenciação terminal (Paneth no presente caso) mas aumentando o *pool* de reserva de células da linhagem progenitora secretória. Esta observação também se harmoniza com o fato da baixa sobrevivência de enteroides MDD+ ser inferior a qualquer outro enteroide (em qualquer meio de cultivo), pois MDD+ possui o menor número de células em proliferação, como demonstrado pelo presente trabalho através da incorporação de EdU.

Outro ponto de relevância sobre a redução dos genes de célula tronco *Lrig1* e *Ascl2* no grupo deficiente em doadores metil diz respeito ao fato de que tais genes, junto com *Sox9*, também pertencem a um agrupamento de genes alvo da via de sinalização Wnt (AL ALAM et al., 2015).

A secreção de Wnt é essencial para a manutenção do estado indiferenciado das células tronco intestinais e para maturação das células de Paneth (VAN ES et al., 2005; ANDREU et al.,

2008). Células de Paneth, por sua vez, são responsáveis pela secreção de Wnt (principalmente Wnt3) na base da cripta, criando um *loop* necessário à manutenção da zona de célula tronco intestinal (FARIN; VAN ES; CLEVERS, 2012). Os dados obtidos pelo presente trabalho sugerem duas evidências de que a via Wnt se encontra prejudicada em enteróides cultivados em meio pobre em doadores metil:

- (1) Baixa transcrição de *Sox9*, requerido à maturação da célula de Paneth que, por seu turno, representa a principal fonte de Wnt na cripta.
- (2) Baixa transcrição dos genes de célula tronco intestinal *Lrig1* e *Ascl2*, alvos da via Wnt.

A observação de que a via Wnt se encontra potencialmente prejudicada sob a deficiência de doadores de metil é importante para explicar não apenas a baixa sobrevivência de enteróides derivados da cripta de animais expostos a dieta MDD+ (manutenção de célula tronco prejudicada, figuras 19 e 20), mas pode vir a ser um fator crucial para explicar o padrão altamente dismórfico encontrado em enteróides MDD- e MDD+. A via de sinalização Wnt, como as demais vias de crescimento, promove proliferação e crescimento celular. Contudo, difere das demais vias dada a sua especial habilidade de dar formato à tecidos em crescimento, agindo no processo como um fator de crescimento direcional (HUANG; NIEHRS, 2014; LOH; VAN AMERONGEN; NUSSE, 2016; NUSSE; CLEVERS, 2017). Sinais da via Wnt são capazes de instruir novas células a se alocarem de forma ordenada de maneira a formarem estruturas organizadas em vez de meros corpos amorfos (WU et al., 2013; HUANG; NIEHRS, 2014). A relação existente entre a provável redução da sinalização da via Wnt e os baixos valores de transcrição de *Lrig1*, *Ascl2* e *Sox9* são exemplificados na figura 28.

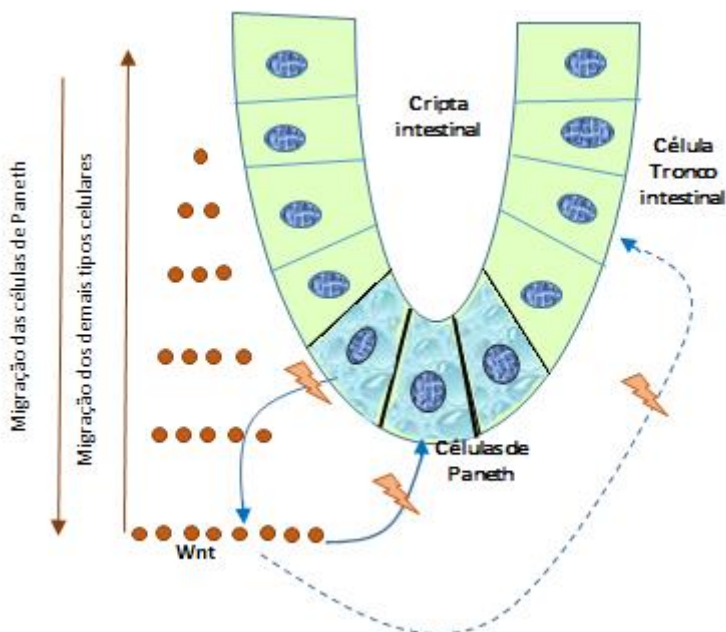


Figura 28 – Hipótese mecânica envolvendo sinalização Wnt e os efeitos encontrados pelo presente estudo em enteróides. Setas curvas contínuas representam a sinalização autócrina da via Wnt (pequenos círculos fechados marrons) que são secretados pelas células de Paneth e agem sobre elas para promover maturação das mesmas. A seta curva pontilhada mostra a alça parácrina, onde Wnt age sobre células vizinhas para manter a célula tronco intestinal indiferenciada, preservando a atividade proliferativa da cripta. As setas retas exemplificam o papel de fator unidirecional de Wnt responsável por dar forma aos tecidos. No presente caso a seta ascendente indica o gradiente de Wnt responsável por orientar a alocação de células progenitoras de enterócitos, células absorptivas e células de Goblet ao longo do eixo vertical da cripta. A seta descendente mostra o gradiente crescente de Wnt que é seguido pelas percussoras de células de Paneth que ocuparão a base da cripta. Os símbolos do relâmpago representam possíveis pontos de falha causados pela deficiência de doadores metil. Redução da atividade de célula tronco intestinal (observado pela redução dos genes alvo de Wnt *Lrig1* e *Ascl2*). Redução do marcador de maturação da célula de Paneth (*Sox9*). Fonte: elaborado pelo autor.

Recentemente a redução da via de sinalização Wnt foi reportada como causa das alterações na microestrutura intestinal relacionada com avanço da idade, sendo estas decorrentes da perda da capacidade regenerativa da célula tronco intestinal (NALAPAREDDY et al., 2017). Nalapareddy et al., (2017) demonstraram que em camundongos senescentes a alteração estrutural da mucosa intestinal esta associada a menor transcrição de *Wnt*, *Ascl2*, *Lrig1*, *Tert* e outros genes. Os enteróides gerados a partir de animais idosos apresentavam reduzido número de criptas por

enteroide. De forma muito interessante, através da adição de Wnt ao meio de cultivo, os autores conseguiram restaurar a morfologia e número de criptas/enteroides em enteroides derivados dos animais senescentes. Assim, o estudo de Nalapareddy et al., (2017) também oferece suporte de que a via Wnt pode também estar relacionada com a reduzida capacidade regenerativa associada a dieta deficiente de doadores metil (particularmente MDD+) encontrada pelo presente trabalho.

O dimorfismo do domínio de cripta observado nos enteroides cultivados a partir dos animais expostos a dieta sem doadores de metil (MDD- e MDD+) são bem mais pronunciados que nos tecido dos animais que deram origem às criptas. Esta diferença de intensidade entre *in vitro* (enteroide) e *in vivo* (histologia) pode ser explicada por uma característica básica do modelo enteroide: a ausência de miofibroblastos pericriptais que são importantes fontes de Wnt *in vivo*. Assim, em animais submetidos à dieta deficiente em doadores metil, apesar da pouca produção de Wnt pela cripta, há fornecimento de Wnt por tais miofibroblastos, o que minora o dano. Quando tal fonte é isolada, os danos tornam-se mais proeminentemente visíveis.

Resultados de biologia molecular estão em consonância com os resultados de biologia celular no presente trabalho, pois se há um aumento da quantidade de progenitores (linhagem secretória), explica-se o grande número de células imaturas com volumes aumentados na base do domínio de vilos nos grupos deficientes de doadores metil. Torna-se também explicável o aumento de profundidade das criptas, pois sabe-se que tais progenitoras ocupam uma porção da cripta chamada de zona de trânsito amplificante (*Transit-Amplifying Compartment*), formada por células oriundas do compartimento da base (onde habitam células tronco), e que possuem comprometimento para diferenciação em células maduras (JOHNSON, 1979). Estes achados estão exemplificados na figura 29.

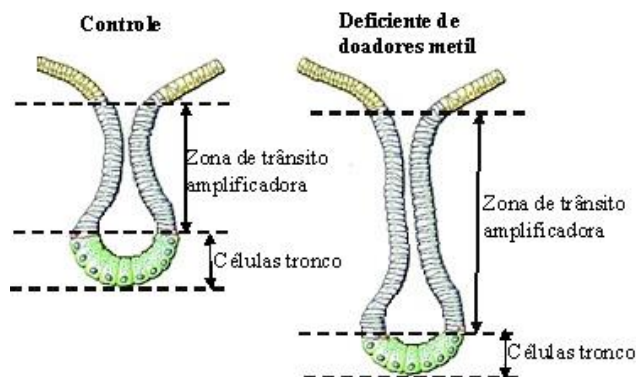


Figura 29 – Explicação proposta para alongamento de cripta na deficiência de doadores de metil. O aumento do tamanho dos enteroides sob ausência de doadores de metil é decorrente da expansão da zona de trânsito amplificadora e ocorre às expensas da redução do compartimento de células tronco intestinais e de células maduras. Adicionalmente, a zona de trânsito amplificadora também sofre alterações qualitativas, pois há um aumento da quantidade de progenitoras comprometidas com a linhagem secretória. Fonte: Elaborado pelo autor

Na figura 29 a dificuldade das células da zona de trânsito amplificadora em acessarem o vilos pode ser atribuída a baixa disponibilidade de folatos, pois tais células devem estar maduras e o folato é substrato fundamental não apenas para síntese de DNA mas também requerido para sua maturação (WAGNER, 2001). A via Wnt prejudicada pode ser outro fator de importância para explicar o dismorfismo das criptas.

O resultado da biologia molecular encontra-se de acordo também com o achado histológico *in vivo* do presente estudo, onde se verificou uma redução do número de células Paneth e aumento do número de células Goblets no intestino de animais que recebiam antibiótico associado ou não com a dieta deficiente de doadores metil. À biologia molecular faltou apenas evidenciar aumento de *Klf4*, gene associado a diferenciação terminal de células Goblets, que nos resultados obtidos no presente trabalho não mostraram diferenças entre os grupos avaliados.

Dados obtidos com o presente trabalho e também os resultados de outros estudos sugerem um arco bem mais amplo de resposta do epitélio intestinal ante a deficiência de certos micronutrientes, evocando respostas reacionais da mucosa intestinal no sentido de adaptar-se àquele ambiente. Convém citar trabalhos avaliando a importância da vitamina A para o epitélio

onde foi encontrado que em modelo *in vitro* a deficiência de retinóis foi capaz de perturbar a diferenciação de células epiteliais da mucosa causando a perda da função de barreira (BIESALSKI; NOHR, 2004). De forma similar aos resultados encontrados pelo presente trabalho, Cha e colaboradores (2010) encontraram que a deficiência de vitamina A foi capaz de alterar a composição celular do intestino delgado de camundongos, causando aumento no número de células Goblet e produção de mucinas concomitante à redução do número de células Paneth.

O porquê da deficiência de doadores metil causar uma expansão do compartimento progenitor da linhagem secretória e não a expansão do compartimento da linhagem absorptiva é um desafio de difícil explanação. Sem a posse de qualquer dado que possibilite lançar mão de alguma hipótese restaria apenas a grosseira especulação. Uma das especulações versa acerca do fato de que o estado nutricional afeta a microbiota e vice-versa (BIESALSKI, 2016). Tendo tal conceito por base, a deficiência de folato/colina demandaria, por meio de algum mecanismo genético, o aumento da produção de células Goblet para produzir e secretar mais mucinas e assim prover meio (camada externa do muco) e alimento para bactérias comensais, possivelmente produtoras de folato e outros nutrientes. Deve-se entretanto ressaltar que o presente estudo não dispôs de nenhum dado que minimamente corrobore tal explicação, de forma que estudos adicionais deveriam ser realizados para verificar a veracidade de tal hipótese.

#### **5.8. A manifestação da deficiência de folato sobre o epitélio intestinal encerra muitas semelhanças com a deficiência de folato sobre o tecido conjuntivo sanguíneo.**

Ainda sobre a natureza identitária das células que compõem os enteroides em meio deficiente em doadores metil, a alta transcrição de *Atoh1* sugere estarem as células *presas* em um estágio maturativo intermediário (não são funcionais/maduras nem células tronco) e, assim, é possível traçar alguns paralelos sobre como a deficiência de doadores de metil se manifestaria na mucosa intestinal e no tecido conjuntivo sanguíneo, especificamente na série vermelha mieloide, condição chamada anemia megaloblástica. A anemia megaloblástica é uma condição clínica caracterizada laboratorialmente por aumento do volume eritrocitário, hemoglobina corpuscular média e hipersegmentação de neutrófilos. A principal condição causal é a deficiência de folato e/ou

cobalamina (vitamina B12). Na patobiologia dessa condição clínica, se encontra a síntese ineficaz de DNA nas células precursoras hematopoiéticas e assincronismo de maturação das células progenitoras (GREEN; DATTA MITRA, 2017).

A comparação entre as duas condições encerra em si alguma utilidade, pois ambas decorrem da deficiência do mesmo micronutriente. Ambos tecidos, apesar de muito distintos em forma e função, possuem alta renovação. A diferença é que a deficiência no tecido sanguíneo foi altamente explorada em diversos estudos e encontra-se muito bem caracterizada e consolidada sob diversos aspectos, enquanto o efeito sobre a mucosa intestinal é relativamente pouco conhecida uma vez que vem sendo pouco explorada. As similaridades encontradas estão expostas na tabela e poderão futuramente sugerir o funcionamento de mecanismos ou vias conservadas.

*Tabela 7 - Comparativo entre algumas das características mais comuns entre a deficiência de folato sobre o intestino e deficiência de folato sobre linhagem vermelha eritroide (anemia megaloblástica)*

<b>Série eritroide<sup>&amp;</sup></b>	<b>Mucosa intestinal</b>	<b>Evidência experimental encontrada</b>
<b>Alta renovação (*45 dias)</b>	Alta renovação (3-5dias)	-
<b>Hiperplasia no compartimento de reserva (medula óssea)</b>	Hiperplasia no compartimento de reserva (cripta)	Aumento de profundidade de cripta in vivo e in vitro
<b>Aumento da reserva de precursores eritroides</b>	Aumento da reserva de precursores da linhagem absorptiva	Alta transcrição de <i>Atoh1</i> em enteroides
<b>Redução do número de células maduras (eritrócitos) circulantes</b>	Redução de células maduras	Redução da transcrição de Sox9 (Células Paneth) nos enteroides
<b>Aumento do volume nuclear</b>	Aumento volume nuclear	Aumento da área da secção transversal do núcleo de enteroides
<b>Produção e destruição de células (eritrócitos) não adequadamente maturadas</b>	Não investigado	Não investigado pelo presente estudo

Fonte: Elaborado pelo autor

<sup>&</sup> Dados hematológicos citados na tabela são de origem bibliográfica (WINTROBE; GREER, 2009)

\*Refere-se ao tempo de vida médio da hemácia de camundongo (GOTTLIEB et al., 2012) (CHENG; LEBLOND, 1974c)



### **5.9. Em enteróides a deficiência de doadores de metil associada a redução da marcação epigenética de genes relacionados a produção de mucinas**

Tendo em vista que o folato representa, dentre os demais substratos de 1 carbono, o maior e o principal doador de metil e por isso tem grande relevância na metilação do DNA (CRIDER et al., 2012), buscou-se avaliar a potencial contribuição da deficiência de doadores metil na metilação de DNA e sua correlação com os efeitos observados sobre os enteróides.

A análise do padrão global de metilação é uma técnica de elevado custo e demanda muito tempo, entretanto a análise da metilação de elementos repetitivos realizadas com o presente estudo (LINE-1 E IAP) pode servir como um marcador alternativo e confiável para a metilação global do DNA genômico (YANG et al., 2004). Essa análise foi de grande importância para que fosse possível verificar se o padrão diferencial de metilação dos genes avaliados aconteciam simplesmente porque o DNA encontrava-se globalmente metilado.

No presente estudo, a deficiência de doadores metil sobre a metilação global do DNA mostra, à primeira vista, um efeito dúbio:

- (1) O primeiro marcador de global do DNA, IAP, mostrou-se significativamente menos metilado em células tronco intestinal de enteróides cultivados em minigut MDR (reduzido em doadores metil), sugerindo que a deficiência de tais nutrientes (doadores de metil) de fato impactava de forma relevante e direta a metilação de DNA;
- (2) O segundo marcador global do DNA, LINE-1, não apresentou diferenças de metilação nas células tronco de animais do grupo controle e grupo cultivado em minigut MDR (reduzido em doadores metil). Tal informação sugere que as diferenças encontradas na metilação das demais áreas do DNA não poderiam ser explicadas apenas pela diferença da metilação global do DNA entre os dois grupos.

Estes resultados *in vitro*, aparentemente dúbios, sugerem que apesar do impacto direto que a deficiência de doadores metil apresentou sobre o perfil de metilação do DNA, mecanismos outros também operavam para criar um padrão diferente de metilação ante a falta de tais nutrientes. Em

outras palavras, as diferenças de metilação dos genes avaliados não podem ser explicados simplesmente por um baixo aporte de doadores de metil em um dos grupos.

Mesmo os resultados *in vivo* podem apresentar alguma dificuldade em conciliação com a metilacao do DNA. Vale mencionar a utilização do modelo de camundongo *agouti* com o qual evidenciou-se que o aumento no fornecimento de doadores de metil na dieta de camundongos grávidas aumentou a metilação em determinados *loci* na prole dos animais e vice-versa (COONEY; DAVE; WOLFF, 2002; WATERLAND; JIRTLE, 2003). Utilizando ratos, Maloney e colaboradores (2007) encontraram resultado totalmente diverso ao constatar que a deficiência de doadores de metil durante a gravidez não impactava no perfil global de metilação do DNA na prole dos animais. Assim, com vistas a conciliar o papel dos doadores de metil sobre o DNA, os citados autores propuseram que a dieta deficiente em doadores metil não influenciaria a metilação do DNA de forma direta, mas talvez através de um mecanismo secundário. Sob o mecanismo proposto, a deficiência de tais nutrientes causariam alterações no metabolismo, incluindo o metabolismo de certos aminoácidos tais como glicina, homocisteína, treonina e serina. Por sua vez, tais alterações exerceriam efeitos indiretos sobre o genoma, que poderiam vir a mudar o padrão de metilação (MALONEY; HAY; REES, 2007).

Frequentemente o nível de metilação do DNA encontra-se associado diretamente a expressão de um dado gene, de forma que quanto mais metilado é uma dada região do DNA menos expressa será aquela região. Entretanto, o presente trabalho, ao estudar a metilação em célula tronco intestinal, analisou especificamente a metilação de DNA nas 3' CGIs. Demonstrou-se que a metilação de tais áreas está diretamente associada ao aumento da transcrição de genes (YU et al., 2015), de forma que quanto menor o nível de metilação 3' CGIs de um dado gene, menos transcrito será aquele gene.

No presente estudo, a diminuída metilação de DNA nas 3' CGIs dos genes *Phospho1* e *B4galnt1*, induziu a redução transcricional dos mesmos genes. Logo, o cultivo de enteroides em meio minigut MDR causou a redução transcricional dos genes *Phospho1* e *B4galnt1*. Isto é interessante pelo fato de que tais genes estão relacionados com a produção de mucinas intestinais ligando-os ao resultado *in vivo* sobre aumento do número de células Goblet. O gene *Lpar5* que codifica um dos receptores para o ácido fosfolipídico não apresentou diferenças no percentil de metilação entre os grupos. No intestino a expressão de *Lpar5* encontra-se associado aos

enterócitos, sendo de grande importância para a regulação do trocador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 3 (NHE3), expresso na superfície de tais células (LIN et al., 2010).

*B4galnt1* é um gene que codifica uma das galactosiltransferases importantes para síntese de mucina tipo-O (PATSOS et al, 2009). *Phosphol*, um gene correlato, adiciona grupamentos fosfatos à carboidratos. Os resultados obtidos com redução da metilação de tais genes em enteroides cultivados na deficiência de doadores de metil apontam, mais uma vez, para parâmetros ligados à natureza da maturação da mucosa, pois tais genes estão relacionados com a biossíntese dos glicosíngolipídios, e são intimamente ligados à maturação intestinal por estarem envolvidos na modulação da função de barreira intestinal através, principalmente, da produção de muco. De forma adicional, tais lipídios podem modular receptores para vírus, bactérias e toxinas (KIM; HO, 2010)

Carboidratos expressos em superfícies celulares desempenham papel de grande relevância no reconhecimento célula-célula, incluindo a adesão de microrganismos à células do hospedeiro (KARLSSON, 1995). Em modelos animais foi demonstrado que modificações qualitativas ou quantitativas do muco têm importância no sucesso da colonização intestinal por bactérias. Tem sido postulado que alterações nos mecanismos pelos quais o intestino regula os padrões de glicosilação da mucosa intestinal tem impacto direto sobre o organismo e na susceptibilidade deste à infecções por certas bactérias, doença inflamatória intestinal e alguns tipos de cânceres, ajudando, potencialmente, a explicar a aumentada ou reduzida sensibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas específicas durante a infância (DAI et al., 2000; CAMPBELL; YU; RHODES, 2001). Ante tal perspectiva, o achado do presente estudo de que há uma reduzida metilação do DNA nas 3' CGIs dos genes *Phosphol* e *B4galnt1*, reduzindo a ativação transcricional destes genes, harmoniza-se bem com tal conjectura. Dessa forma, a deficiência de doadores de metil ao causar uma redução transcricional de genes envolvidos nos processos de glicosilação que, por seu turno, poderia contribuir para a susceptibilidade à infecção, pode ter alguma potencial relevância patofisiológica.

Por outro lado, a hipometilação nas 3' CGIs de *Phosphol* e *B4galnt1*, por ser uma marcação epigenética associada a redução de transcrição de tais genes parece contradizer-se com o aumento de *Atoh1* verificado através de PCR-array. Em outras palavras, se há aumento do número de progenitores comprometidos com a linhagem secretória como indica o aumento de

*Atoh1*, por que genes da produção de mucinas expressos por células diferenciadas da linhagem secretória seriam marcados para serem menos expressos? Estudos adicionais se fazem necessários em vistas a compreender a associação entre os dois achados.

Todos os resultados encontrados pelo presente estudo harmonizam-se com o conhecimento já consolidado bem estabelecido na literatura sobre a bioquímica do folato no que concerne a sua importância para síntese e maturação de DNA bem como a relevância de sua metilação. A figura 30 representa um diagrama proposto para conciliar o papel estabelecido e consolidado de doadores metil como fatores essenciais na maturação do DNA e os resultados encontrados pelo presente trabalho.

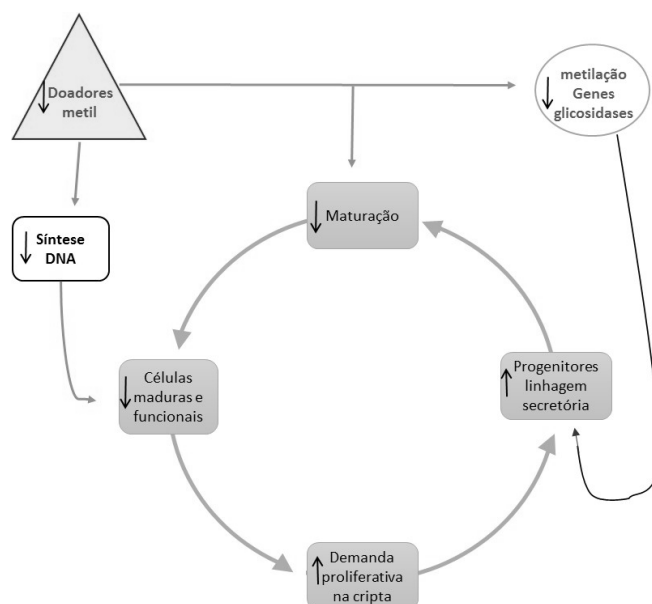


Figura 30 - Modelo de integração proposto para conciliar o papel dos doadores de metil, especialmente o folato, com os efeitos observados pelo presente estudo sobre cripta e célula tronco intestinal. A deficiência de folatos reduz o aporte de células funcionais maduras nos vilos, forçando a cripta a responder com o aumento da produção de células progenitoras. A redução da metilação nas 3'CGIs de genes envolvidos com a metilação estaria envolvido no aumento seletivo de progenitores da linhagem secretória sobre a linhagem absorptiva. A cripta responde com o aumento da produção de progenitores, mas estes são impedidos de tornarem-se plenamente funcionais dado que a deficiência de folato impede a maturação da célula. Por conseguinte, a deficiência de células persiste ativando mais uma vez o mesmo mecanismo criando, dessa forma, um ciclo vicioso. Fonte: elaborado pelo autor.

Sob tal perspectiva, dado o essencial papel do folato para síntese de DNA, a deficiência de doadores metil reduziria o aporte de células maduras e funcionais nos vilos da mucosa intestinal. Por sua vez, a redução de células maduras, causaria um aumento da demanda da atividade proliferativa da cripta intestinal e, como consequência, haveria uma expansão da linhagem progenitora secretória aumentando a zona amplificadora de trânsito que, por seu turno, causaria o alongamento da cripta observado na deficiência de tais nutrientes. A seletiva expansão da linhagem secretória pode ser uma potencial resposta compensatória ao efeito que a deficiência de doadores metil exerceria sobre a metilação de alguns genes envolvidos na síntese de glicosídeos (*B4GalT1* e *Phospho1*). Uma vez expandido a linhagem de progenitores secretórios, um reduzido número de células seria capaz de ascender ao corpo do vilão, dado que a deficiência de folato possuiria efeito inibitório direto sobre a maturação do núcleo de tais células. Impedidas de ascender no vilão, o déficit de células maduras e funcionais persistiria ativando mais uma vez esse mecanismo como um ciclo vicioso que se retroalimenta e manteria o fenótipo da deficiência de doador metil observado nos enteróides e em menor extensão *in vivo*.

## 6. CONCLUSÃO

No modelo de deficiência de doadores metil utilizado pelo presente estudo foi possível concluir que dieta pobre em tais nutrientes (folato e colina) é uma condição causal suficiente para estabelecer redução do ganho de peso e déficit de crescimento linear, alterações estas que se mostraram associadas a aumento da profundidade de cripta no intestino delgado. Outrossim, a administração de antibiótico sulfametoxazol revelou-se um fator capaz de induzir aumento do comprimento de cripta a nível tecidual e agravar alguns parâmetros da célula tronco intestinal *in vitro*. Tais efeitos devem-se provavelmente a modulação da microbiota causada pelo antibiótico mas para tanto estudos adicionais devem ser realizados.

O aumento da profundidade de cripta em nos animais expostos a dieta deficiente de doadores metil encontrou correlação com a função de célula tronco prejudicada em enteróides cultivados a partir daquelas criptas. A persistência do dimorfismo dos enteróides derivados de criptas de animais expostos a dieta deficiente em condições otimizadas de cultivo sugere que a exposição *in vivo* a deficiência de doadores metil induz algum tipo de memória na célula tronco intestinal que persiste mesmo após diversas passagens.

A redução da função de célula tronco intestinal verificada em enteróides derivados de animais expostos a dieta deficiente em doadores metil encontra-se relacionada com redução transcricional de marcadores de célula tronco intestinal da reserva quiescente (*Ascl2*, *Lrig1* e *Sox9*), mas não com a redução de células tronco de alta ciclagem como *Lgr5*. Nesse contexto os achados de biologia celular e molecular sugerem haver redução da via de sinalização Wnt mas para tanto estudos adicionais deverão ser realizados.

Em enteróides cultivados em condições deficitárias de doadores de metil a alta transcrição de *Atoh1* aponta uma expansão da reserva de progenitores comprometidos com a linhagem secretória, resultado este condizente com o aumento qualitativo das células Goblet verificadas em animais expostos a dieta deficiente.

Ainda a nível molecular, a análise de metilação de DNA em células tronco de enteróides revelou redução do percentil de metilação em genes envolvidos com produção de mucinas, alteração está associada a redução transcricional deste genes. Gene de proteína transportadora *Lpar5* não se encontrou alterado. A expansão dos progenitores da linhagem secretória concomitante à marcação epigenética associada a redução transcricional de genes relacionados a

produção de mucinas nos mesmos enteróides, parece contraditório e estudos adicionais se fazem necessários a melhor compreensão deste fenômeno.

De forma geral todas as alterações encontradas pelo presente estudo harmonizam-se com o papel bem delineado do folato e demais doadores de metil como cofatores essenciais a síntese e maturação e metilação DNA.

## REFERÊNCIAS

ADAIR, L. S.; FALL, C. H.; OSMOND, C.; STEIN, A. D.; MARTORELL, R.; RAMIREZ-ZEA, M.; SACHDEV, H. S.; DAHLY, D. L.; BAS, I.; NORRIS, S. A.; MICKLESFIELD, L.; HALLAL, P.; VICTORA, C. G. Associations of linear growth and relative weight gain during early life with adult health and human capital in countries of low and middle income: findings from five birth cohort studies. **The Lancet**, v. 382, n. 9891, p. 525–534, ago. 2013.

AL ALAM, D.; DANOPOULOS, S.; SCHALL, K.; SALA, F. G.; ALMOHAZEY, D.; FERNANDEZ, G. E.; GEORGIA, S.; FREY, M. R.; FORD, H. R.; GRIKSCHIT, T.; BELLUSCI, S. Fibroblast growth factor 10 alters the balance between goblet and Paneth cells in the adult mouse small intestine. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 308, n. 8, p. G678-90, 15 abr. 2015.

ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 2016.

ANDREU, P.; PEIGNON, G.; SLOMIANNY, C.; TAKETO, M. M.; COLNOT, S.; ROBINE, S.; LAMARQUE, D.; LAURENT-PUIG, P.; PERRET, C.; ROMAGNOLO, B. A genetic study of the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in Paneth cell differentiation. **Developmental Biology**, v. 324, n. 2, p. 288–296, 2008.

BARKER, N.; CLEVERS, H. Tracking Down the Stem Cells of the Intestine: Strategies to Identify Adult Stem Cells. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 1755–1760, dez. 2007.

BARKER, N.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes & development**, v. 22, n. 14, p. 1856–64, 15 jul. 2008.

BASTIDE, P.; DARIDO, C.; PANNEQUIN, J.; KIST, R.; ROBINE, S.; MARTY-DOUBLE, C.; BIBEAU, F.; SCHERER, G.; JOUBERT, D.; HOLLANDE, F.; BLACHE, P.; JAY, P. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal



epithelium. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 4, 2007.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The Mammalian Epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–681, fev. 2007.

BIESALSKI, H. K. Hidden Hunger. In: **Hidden Hunger**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 25–50.

BIESALSKI, H. K. Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1372, n. 1, p. 53–64, 2016.

BIESALSKI, H. K.; NOHR, D. New aspects in vitamin a metabolism: the role of retinyl esters as systemic and local sources for retinol in mucous epithelia. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3453S–3457S, dez. 2004.

BILLS, N. D.; KOURY, M. J.; CLIFFORD, A. J.; DESSYPRIS, E. N. Ineffective hematopoiesis in folate-deficient mice. **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2273 LP-2280, 1 maio 1992.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n. 6067, p. 209–213, 15 maio 1986.

BISWAS, S.; DAVIS, H.; IRSHAD, S.; SANDBERG, T.; WORTHLEY, D.; LEEDHAM, S. Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. **The Journal of pathology**, v. 237, n. 2, p. 135–45, out. 2015.

BLACK, R. E.; ALLEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; EZZATI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243–260, 2008.

BLEASE, G. Hidden hunger: How much can farming really improve people's health? **The economist**, p. 23–24, mar. 2011.

BOJ, S. F.; HWANG, C.-I.; BAKER, L. A.; CHIO, I. I. C.; ENGLE, D. D.; CORBO, V.; JAGER, M.; PONZ-SARVISE, M.; TIRIAC, H.; SPECTOR, M. S.; GRACANIN, A.; ONI, T.; YU, K. H.; VAN BOXTEL, R.; HUCH, M.; RIVERA, K. D.; WILSON, J. P.; FEIGIN, M. E.; ÖHLUND, D.; HANDLY-SANTANA, A.; ARDITO-ABRAHAM, C. M.; LUDWIG, M.; ELYADA, E.; ALAGESAN, B.; BIFFI, G.; YORDANOV, G. N.; DELCUZE, B.; CREIGHTON, B.; WRIGHT, K.; PARK, Y.; MORSINK, F. H. M.; MOLENAAR, I. Q.; BOREL RINKES, I. H.; CUPPEN, E.; HAO, Y.; JIN, Y.; NIJMAN, I. J.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; LEACH, S. D.; PAPPIN, D. J.; HAMMELL, M.; KLIMSTRA, D. S.; BASTURK, O.; HRUBAN, R. H.; OFFERHAUS, G. J.; VRIES, R. G. J.; CLEVERS, H.; TUVESON, D. A. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. **Cell**, v. 160, n. 1, p. 324–338, 2015.

BROWN, E. M.; WLODARSKA, M.; WILLING, B. P.; VONAESCH, P.; HAN, J.; REYNOLDS, L. A.; ARRIETA, M.-C.; UHRIG, M.; SCHOLZ, R.; PARTIDA, O.; BORCHERS, C. H.; SANSONETTI, P. J.; FINLAY, B. B. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature communications**, v. 6, p. 7806, 4 ago. 2015.

BUTLER, C. C.; VIDAL-ALABALL, J.; CANNINGS-JOHN, R.; MCCADDON, A.; HOOD, K.; PAPAIOANNOU, A.; MCDOWELL, I.; GORINGE, A. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. **Family Practice**, v. 23, n. 3, p. 279–285, 3 fev. 2006.

CALDER, P. C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J.-M.; BLUM, S.; BOURDET-SICARD, R.; FERNS, G. A.; FOLKERTS, G.; FRIEDMANN, P. S.; FROST, G. S.; GUARNER, F.; L?VIK, M.; MACFARLANE, S.; MEYER, P. D.; M'RABET, L.; SERAFINI, M.; VAN EDEN, W.; VAN LOO, J.; VAS DIAS, W.; VIDRY, S.; WINKLHOFFER-ROOB, B. M.; ZHAO, J. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. S1, p. 1, 9 maio 2009.

CAMPBELL, B. J.; YU, L.-G.; RHODES, J. M. Altered glycosylation in inflammatory bowel

disease: A possible role in cancer development. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, n. 11/12, p. 851–858, 2001.

CAMPBELL, D. I.; ELIA, M.; LUNN, P. G. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1332–8, maio 2003.

CHA, H.-R.; CHANG, S.-Y.; CHANG, J.-H.; KIM, J.-O.; YANG, J.-Y.; KIM, C.-H.; KWEON, M.-N. Downregulation of Th17 Cells in the Small Intestine by Disruption of Gut Flora in the Absence of Retinoic Acid. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, 2010.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 4, p. 537–561, dez. 1974a.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 4, p. 537–561, dez. 1974b.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 4, p. 461–479, dez. 1974c.

CHENG, X.; BLUMENTHAL, R. M. Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. **Structure**, v. 16, n. 3, p. 341–350, mar. 2008.

CLEVERS, H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 274–284, jul. 2013.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192–1205, jun. 2012.

COONEY, C. A.; DAVE, A. A.; WOLFF, G. L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2393S–2400S, ago. 2002.

CRIDER, K. S.; YANG, T. P.; BERRY, R. J.; BAILEY, L. B. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 1, p. 21–38, 1 jan. 2012.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349–359, maio 2006.

CUI, S.; CHANG, P.-Y. Current understanding concerning intestinal stem cells. **World J Gastroenterol August World J Gastroenterol**, v. 21, n. 22, p. 7099–711031, 2016.

DAI, D.; NANTHKUMAR, N. N.; NEWBURG, D. S.; WALKER, W. A. Role of Oligosaccharides and Glycoconjugates in Intestinal Host Defense. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, 2000.

DAVIDSON, R. J.; HAMILTON, P. J. High mean red cell volume: its incidence and significance in routine haematology. **Journal of clinical pathology**, v. 31, n. 5, p. 493–8, maio 1978.

DE LAU, W.; PENG, W. C.; GROS, P.; CLEVERS, H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. **Genes & development**, v. 28, n. 4, p. 305–16, 15 fev. 2014.

DOSSA, A. Y.; SCHALL, K. A.; GRIKSCHAIT, T. C.; GAYER, C. P. Tissue Engineering: Intestine. In: WARBURTON, D. (Ed.). **Stem Cells, Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Singapore: WORLD SCIENTIFIC, 2015. p. 295–312.

DUBÉ, P. E.; SOH, U. J. K.; POLK, D. Cytokine Regulation of Intestinal Stem Cells. In: **Stem Cells, Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2014. p. 261–272.

EBARA, S. The Nutritional Role of Folate. **Congenital Anomalies**, 11 jun. 2017.

EGGER, G.; JEONG, S.; ESCOBAR, S. G.; CORTEZ, C. C.; LI, T. W. H.; SAITO, Y.; YOO, C. B.; JONES, P. A.; LIANG, G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14080–5, 19 set. 2006.

ELMADFA, I.; MEYER, A. L. Vitamins for the First 1000 Days: Preparing for Life. **Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. J. Vitam. Nutr. Res**, v. 82, n. 825, p. 342–347, 2012.

FAGUNDES-NETO, U.; VIARO, T.; WEHBA, J.; PATRICIO, F. R. d. S.; MACHADO, N. L. Tropical Enteropathy (Environmental Enteropathy) in Early Childhood: a Syndrome Caused by Contaminated Environment. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 30, n. 4, p. 204–209, 1 ago. 1984.

FARIN, H. F.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H. Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. **Gastroenterology**, v. 143, n. 6, p. 1518–1529.e7, dez. 2012.

FENG, S.; COKUS, S. J.; ZHANG, X.; CHEN, P.-Y.; BOSTICK, M.; GOLL, M. G.; HETZEL, J.; JAIN, J.; STRAUSS, S. H.; HALPERN, M. E.; UKOMADU, C.; SADLER, K. C.; PRADHAN, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8689–94, 11 maio 2010.

FERGUSON, S. A.; BERRY, K. J.; HANSEN, D. K.; WALL, K. S.; WHITE, G.; ANTONY, A. C. Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 73, n. 4, p. 249–252, abr. 2005.

FINGLAS, P. M.; WRIGHT, A. J. A. Folate bioavailability and health. In: *Phytochemistry*

Reviews, Amsterdam. **Anais...** Amsterdam: Kluwer Academic Publisher, 2002.

FOULKE-ABEL, J.; IN, J.; KOVBASNJUK, O.; ZACHOS, N. C.; ETTAYEBI, K.; BLUTT, S. E.; HYSER, J. M.; ZENG, X.-L.; CRAWFORD, S. E.; BROUGHMAN, J. R.; ESTES, M. K.; DONOWITZ, M. Human enteroids as an ex-vivo model of host?pathogen interactions in the gastrointestinal tract. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 9, p. 1124–1134, set. 2014.

FOXX-ORENSTEIN, A. E.; CHEY, W. D. Manipulation of the Gut Microbiota as a Novel Treatment Strategy for Gastrointestinal Disorders. **Am J Gastroenterol Suppl**, v. 1, n. 1, p. 41–46, jul. 2012.

GLINKA, A.; DOLDE, C.; KIRSCH, N.; HUANG, Y.-L.; KAZANSKAYA, O.; INGELFINGER, D.; BOUTROS, M.; CRUCIAT, C.-M.; NIEHRS, C. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. **EMBO reports**, v. 12, n. 10, p. 1055–61, 30 set. 2011.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 481–514, jun. 2005.

GOSPE, S. M. J.; GIETZEN, D. W.; SUMMERS, P. J.; LUNETTA, J. M.; MILLER, J. W.; SELHUB, J.; ELLIS, W. G.; CLIFFORD, A. J. Behavioral and Neurochemical Changes in Folate-Deficient Mice. **Physiology & behavior**, v. 58, n. 5, p. 935–941, nov. 1995.

GOTTLIEB, Y.; TOPAZ, O.; COHEN, L. A.; YAKOV, L. D.; HABER, T.; MORGENSTERN, A.; WEISS, A.; CHAIT BERMAN, K.; FIBACH, E.; MEYRON-HOLTZ, E. G. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. **Haematologica**, v. 97, n. 7, p. 994–1002, jul. 2012.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.; CHEUNG, Y. B.; CUETO, S.; GLEWWE, P.; RICHTER, L.; STRUPP, B. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 60–70, jan. 2007.

GREEN, R.; DATTA MITRA, A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 297–317, 2017.

GREGORIEFF, A.; STANGE, D. E.; KUJALA, P.; BEGTHEL, H.; VAN DEN BORN, M.; KORVING, J.; PETERS, P. J.; CLEVERS, H. The Ets-Domain Transcription Factor Spdef Promotes Maturation of Goblet and Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1333–1345.e3, 2009.

GUERRANT, R. L.; DEBOER, M. D.; MOORE, S. R.; SCHARF, R. J.; LIMA, A. A. M. The impoverished gut--a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.

HALSTED, C. H. INTESTINAL ABSORPTION AND MALABSORPTION OF FOLATES. **Ann. Rev. Med.**, v. 198, n. 31, p. 79–87, 1980.

HAQUE, R.; SNIDER, C.; LIU, Y.; MA, J. Z.; LIU, L.; NAYAK, U.; MYCHALECKYJ, J. C.; KORPE, P.; MONDAL, D.; KABIR, M.; ALAM, M.; PALLANSCH, M.; OBERSTE, M. S.; WELDON, W.; KIRKPATRICK, B. D.; PETRI, W. A. Oral polio vaccine response in breast fed infants with malnutrition and diarrhea. **Vaccine**, v. 32, n. 4, p. 478–482, jan. 2014.

HELANDER, H. F.; FÄNDRIS, L. Surface area of the digestive tract – revisited. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. 6, p. 681–689, 2 jun. 2014.

HÖDAR, C.; ASSAR, R.; COLOMBRES, M.; ARAVENA, A.; PAVEZ, L.; GONZÁLEZ, M.; MARTÍNEZ, S.; INESTROSA, N. C.; MAASS, A. Genome-wide identification of new Wnt/ $\beta$ -catenin target genes in the human genome using CART method. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 348, jun. 2010.

HOWARD, L.; WAGNER, C.; SCHENKER, S. Malabsorption of thiamin in folate-deficient rats. **The Journal of nutrition**, v. 104, n. 8, p. 1024–1032, 1964.

HUANG, Y.-L.; NIEHRS, C. Polarized Wnt Signaling Regulates Ectodermal Cell Fate in *Xenopus*. **Developmental Cell**, v. 29, p. 250–257, 2014.

HUMPHREY, J. H. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. **The Lancet**, v. 374, n. 9694, p. 1032–1035, 2009.

JACOB, R. A. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 4, p. 903–4, out. 2000.

JALADANKI, R. N.; WANG, J.-Y. Intestinal Stem Cells. In: JALADANKI, R. N.; WANG, J.-Y. (Ed.). **Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth, Second Edition**. 2nd. ed. Baltimore: Morgan & Claypool, 2016. 8p. 11–20.

JENNY, M.; UHL, C.; ROCHE, C.; DULUC, I.; GUILLERMIN, V.; GUILLEMOT, F.; JENSEN, J.; KEDINGER, M.; GRADWOHL, G. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 23, p. 6338 LP-6347, 1 dez. 2002.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? **Genes & Cancer**, v. 2, n. 6, p. 607–617, 1 jun. 2011.

JOHNSON, J. E.; BIRREN, S. J.; ANDERSON, D. J. Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 858–861, 30 ago. 1990.

JOHNSON, L. R. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. **World Journal of Surgery**, v. 3, n. 4, p. 477–486, 1979.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, jul. 2012.



KARLSSON, K.-A. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 5, p. 622–635, out. 1995.

KATZ, J. P.; PERREAULT, N.; GOLDSTEIN, B. G.; LEE, C. S.; LABOSKY, P. A.; YANG, V. W.; KAESTNER, K. H. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. **Development**, v. 129, n. 11, 2002.

KIM, T. H.; YANG, J.; DARLING, P. B.; O'CONNOR, D. L. A Large Pool of Available Folate Exists in the Large Intestine of Human Infants and Piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1389–1394, 1 jun. 2004.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 13 out. 2010.

KORPE, P. S.; PETRI, W. A. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 328–336, 2012.

KRETZSCHMAR, K.; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. **Developmental Biology**, v. 428, n. 2, p. 273–282, ago. 2017.

LEAMON, C. P.; REDDY, J. A.; DORTON, R.; BLOOMFIELD, A.; EMSWELLER, K.; PARKER, N.; WESTRICK, E. Impact of High and Low Folate Diets on Tissue Folate Receptor Levels and Antitumor Responses Toward Folate-Drug Conjugates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 3, 2008.

LEBLANC, J. G.; MILANI, C.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.

LEROY, J. L.; RUEL, M.; HABICHT, J.-P.; FRONGILLO, E. A. Linear Growth Deficit Continues

to Accumulate beyond the First 1000 Days in Low- and Middle-Income Countries: Global Evidence from 51 National Surveys. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 9, p. 1460–1466, 1 set. 2014.

LEUNG, C.; LINGBEEK, M.; SHAKHOVA, O.; LIU, J.; TANGER, E.; SAREMASLANI, P.; VAN LOHUIZEN, M.; MARINO, S. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. **Nature**, v. 428, n. 6980, p. 337–341, 18 mar. 2004.

LEVINE, M. M.; GABBAY, Y.; MASCARENHAS, J.; FREITAS, R. de; OLIVEIRA, C.; BELLESI, N.; MONTEIRO, T.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F.; VALENTE, S.; CLEMENTS, J.; NABORS, G.; TO, S.; CAMPBELL, J.; STOCKWELL, E.; SCHULTSZ, C.; SIMMONS, C.; GLOVER, C.; LAM, W.; MARQUES, F.; MAY, J.; UPTON, A.; BUDHRAM, R.; DOUGAN, G.; FARRAR, J.; NGUYEN, V.; DOLECEK, C.; HEATON, P.; TORNIEPORTH, N.; SAEZ-LLORENS, X. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 129, 2010.

LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. **Science**, v. 327, n. 5965, 2010.

LIN, S.; YERUVA, S.; HE, P.; SINGH, A. K.; ZHANG, H.; CHEN, M.; LAMPRECHT, G.; DE JONGE, H. R.; TSE, M.; DONOWITZ, M.; HOGEMA, B. M.; CHUN, J.; SEIDLER, U.; YUN, C. C. Lysophosphatidic Acid Stimulates the Intestinal Brush Border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 and Fluid Absorption via LPA5 and NHERF2. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 649–658, 2010.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.-M.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315–22, 19 nov. 2009.

LOH, K. M.; VAN AMERONGEN, R.; NUSSE, R. Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. **Developmental Cell**, v. 38, n.

6, p. 643–655, 2016.

LUCOCK, M. D.; WILD, J.; SMITHELLS, R. W.; HARTLEY, R. In vivo characterization of the absorption and biotransformation of pteroylmonoglutamic acid in man: A model for future studies. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 42, n. 1, p. 30–42, ago. 1989.

MACGREGOR, J. T.; SCHLEGELT, R.; WEHR, C. M.; ALPERIN, P.; AMES, B. N. Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine (chromosomal damage/micronucleus). **Medical Sciences**, v. 87, p. 9962–9965, 1990.

MAHE, M. M.; AIHARA, E.; SCHUMACHER, M. A.; ZAVROS, Y.; MONTROSE, M. H.; HELMRATH, M. A.; SATO, T.; SHROYER, N. F. Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. **Current protocols in mouse biology**, v. 3, n. 4, p. 217–40, 19 dez. 2013.

MALONEY, C. A.; HAY, S. M.; REES, W. D. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1090, 16 jun. 2007.

MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. The intestinal epithelial stem cell. **BioEssays**, v. 24, n. 1, p. 91–98, jan. 2002.

MCKAY, S.; GAUDIER, E.; CAMPBELL, D. I.; PRENTICE, A. M.; ALBERS, R. Environmental enteropathy: new targets for nutritional interventions. **International Health**, v. 2, n. 3, p. 172–180, 1 set. 2010.

MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 529–536, 2004.

MEANEY, M. J.; LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 799–806, 1

ago. 2000.

MICROMEDEX® SOLUTIONS. **Drug Result Page - SULFAMETHOXAZOLE**. Disponível em: [http://www-micromedexsolutions-com.ez11.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/CS/327BC8/ND\\_PR/evidencexpert/ND\\_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/210521/ND\\_PG/evidencexpert/ND\\_B/evidencexpert/ND\\_AppProduct/evidencexpert/ND\\_T/evidencexpert/PFact](http://www-micromedexsolutions-com.ez11.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/CS/327BC8/ND_PR/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/210521/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFact)>. Acesso em: 22 maio. 2017.

MOESTRUP, S. K. New insights into carrier binding and epithelial uptake of the erythropoietic nutrients cobalamin and folate. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 3, p. 119–123, maio 2006.

MOORE, K. A.; LEMISCHKA, I. R. Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 311, n. 5769, 2006.

MOORE, S. R.; GUEDES, M. M.; COSTA, T. B.; VALLANCE, J.; MAIER, E. A.; BETZ, K. J.; AIHARA, E.; MAHE, M. M.; LIMA, A. A. M.; ORIÁ, R. B.; SHROYER, N. F. Glutamine and alanyl-glutamine promote crypt expansion and mTOR signaling in murine enteroids. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 308, n. 10, p. G831-9, 15 maio 2015.

MORAIS, M. B. de; FAGUNDES NETO, U. Enteropatia ambiental. **Estudos Avançados**, v. 17, n. 48, p. 137–148, ago. 2003.

MORI-AKIYAMA, Y.; HAMILTON, S. R.; CLEVERS, H.; DE CROMBRUGGHE, B. The transcription factor Sox9 is required for the differentiation of Paneth cells in the intestinal epithelium. **Cancer Research**, v. 66, n. 8 Supplement, 2014.

MORI-AKIYAMA, Y.; VAN DEN BORN, M.; VAN ES, J. H.; HAMILTON, S. R.; ADAMS, H. P.; ZHANG, J.; CLEVERS, H.; DE CROMBRUGGHE, B. SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p.

539–546, 2007.

MUÑOZ, J.; STANGE, D. E.; SCHEPERS, A. G.; VAN DE WETERING, M.; KOO, B.-K.; ITZKOVITZ, S.; VOLCKMANN, R.; KUNG, K. S.; KOSTER, J.; RADULESCU, S.; MYANT, K.; VERSTEEG, R.; SANSOM, O. J.; VAN ES, J. H.; BARKER, N.; VAN OUDENAARDEN, A.; MOHAMMED, S.; HECK, A. J.; CLEVERS, H. The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. **The EMBO Journal**, v. 31, 2012.

NALAPAREDDY, K.; NATTAMAI, K. J.; KUMAR, R. S.; HELMRATH, M. A.; ZHENG, Y.; GEIGER, H.; KARNS, R.; WIKENHEISER-BROKAMP, K. A.; SAMPSON, L. L.; MAHE, M. M.; SUNDARAM, N.; YACYSHYN, M.-B.; YACYSHYN, B. Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells. **Cell Reports**, v. 18, p. 2608–2621, 2017.

NOAH, T. K.; DONAHUE, B.; SHROYER, N. F. Intestinal development and differentiation. **Experimental cell research**, v. 317, n. 19, p. 2702–10, 15 nov. 2011.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985–999, 2017.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, out. 1999.

ORIÁ, R. B.; MURRAY-KOLB, L. E.; SCHARF, R. J.; PENDERGAST, L. L.; LANG, D. R.; KOLLING, G. L.; GUERRANT, R. L. Early-life enteric infections: Relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. **Nutrition Reviews**, v. 74, n. 6, 2016.

PATEL, M.; STEELE, A. D.; PARASHAR, U. D. Influence of oral polio vaccines on performance of the monovalent and pentavalent rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, p. A30–A35, abr. 2012.

PINTO, D.; GREGORIEFF, A.; BEGTHEL, H.; CLEVERS, H. Canonical Wnt signals are

essential for homeostasis of the intestinal epithelium. **Genes & development**, v. 17, n. 14, p. 1709–13, 15 jul. 2003.

PORSE, B. Mouse Hematology - A Laboratory Manual. **European Journal of Haematology**, v. 84, n. 6, p. 554–554, 17 maio 2010.

PORTER, E. M.; BEVINS, C. L.; GHOSH, D.; GANZ, T. The multifaceted Paneth cell. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 59, n. 1, p. 156–170, 1 jan. 2002.

POTTEN, C. S.; KOVACS, L.; HAMILTON, E. CONTINUOUS LABELLING STUDIES ON MOUSE SKIN AND INTESTINE. **Cell Proliferation**, v. 7, n. 3, p. 271–283, maio 1974.

POWELL, A. E.; WANG, Y.; LI, Y.; POULIN, E. J.; MEANS, A. L.; WASHINGTON, M. K.; HIGGINBOTHAM, J. N.; JUCHHEIM, A.; PRASAD, N.; LEVY, S. E.; GUO, Y.; SHYR, Y.; ARONOW, B. J.; HAIGIS, K. M.; FRANKLIN, J. L.; COFFEY, R. J. The Pan-ErbB Negative Regulator Lrig1 Is an Intestinal Stem Cell Marker that Functions as a Tumor Suppressor. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 146–158, 2012.

PRESTON, S.; WRIGHT, N. A.; DIREKZE, N.; BRITTAN, M. Stem Cells in the Gastrointestinal Tract. In: **Principles of Tissue Engineering**. [s.l: s.n.]p. 901–933.

QI, Z.; LI, Y.; ZHAO, B.; XU, C.; LIU, Y.; LI, H.; ZHANG, B.; WANG, X.; YANG, X.; XIE, W.; LI, B.; HAN, J.-D. J.; CHEN, Y.-G. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5(+) stem cells by directly suppressing their signature genes. **Nature communications**, v. 8, p. 13824, 6 jan. 2017.

QIU, A.; JANSEN, M.; SAKARIS, A.; MIN, S. H.; CHATTOPADHYAY, S.; TSAI, E.; SANDOVAL, C.; ZHAO, R.; AKABAS, M. H.; GOLDMAN, I. D. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 917–928, dez. 2006.

RAKYAN, V. K.; HILDMANN, T.; NOVIK, K. L.; LEWIN, J.; TOST, J.; COX, A. V.; ANDREWS,

T. D.; HOWE, K. L.; OTTO, T.; OLEK, A.; FISCHER, J.; GUT, I. G.; BERLIN, K.; BECK, S. DNA Methylation Profiling of the Human Major Histocompatibility Complex: A Pilot Study for the Human Epigenome Project. **PLoS Biology**, v. 2, n. 12, p. e405, 23 nov. 2004.

RIGGS, A. D.; XIONG, Z. Methylation and epigenetic fidelity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 1, p. 4–5, 6 jan. 2004.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 597–610, ago. 2005.

RODIER, P. M. Environmental Causes of Central Nervous System Maldevelopment. **Pediatrics**, v. 113, n. Supplement 3, 2011.

RONG, N.; SELHUB, J.; GOLDIN, B. R.; ROSENBERG, I. H. Bacterially Synthesized Folate in Rat Large Intestine Is Incorporated into Host Tissue Folyl Polyglutamates. **The Journal of nutrition**, v. 121, n. 12, p. 1955–1959, dez. 1991.

.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMONDI, S. Folate Production by Probiotic Bacteria. **Nutrients**, v. 3, n. 1, p. 118–134, 2011.

SANGIORGI, E.; CAPECCHI, M. R. *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. **Nature Genetics**, v. 40, n. 7, p. 915–920, 8 jul. 2008.

SATO, T.; CLEVERS, H. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. **Science**, v. 340, n. 6137, p. 1190–1194, 7 jun. 2013.

SATO, T.; VRIES, R. G.; SNIPPERT, H. J.; VAN DE WETERING, M.; BARKER, N.; STANGE, D. E.; VAN ES, J. H.; ABO, A.; KUJALA, P.; PETERS, P. J.; CLEVERS, H. Single *Lgr5* stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 262–265, 14 maio 2009.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–5, jul. 2012.

SCHONHOFF, S. E.; GIEL-MOLONEY, M.; LEITER, A. B. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2639–2644, jun. 2004.

SCHUIJERS, J.; CLEVERS, H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 12, p. 2685–2696, 13 jun. 2012.

SCHUIJERS, J.; PHILIPP, J.; VAN OUDENAARDEN, A.; CLEVERS, H.; EU, C. H. C.; JUNKER, J. P.; MOKRY, M.; HATZIS, P.; KOO, B.-K.; SASSELLI, V.; VAN DER FLIER, L. G.; CUPPEN, E. Ascl2 Acts as an R-spondin/Wnt-Responsive Switch to Control Stemness in Intestinal Crypts In Brief Cell Stem Cell Ascl2 Acts as an R-spondin/Wnt-Responsive Switch to Control Stemness in Intestinal Crypts. **Stem Cell**, v. 16, p. 158–170, 2015.

SCHUTGENS, F.; VERHAAR, M. C.; ROOKMAAKER, M. B. Pluripotent stem cell-derived kidney organoids: An in vivo-like in vitro technology. **European Journal of Pharmacology**, v. 790, p. 12–20, nov. 2016.

SHEN, L.; GUO, Y.; CHEN, X.; AHMED, S.; ISSA, J.-P. J. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. **BioTechniques**, v. 42, n. 1, p. 48, 50, 52 passim, jan. 2007.

SOLOMONS, N. W.; MAZARIEGOS, M.; BROWN, K. H.; KLASING, K. The Underprivileged, Developing Country Child: Environmental Contamination and Growth Failure Revisited. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 11, p. 327–332, 27 abr. 1993

SONG, F.; SMITH, J. F.; KIMURA, M. T.; MORROW, A. D.; MATSUYAMA, T.; NAGASE, H.; HELD, W. A. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 9, p.



3336–3341, 1 mar. 2005.

STELZNER, M.; HELMRATH, M.; DUNN, J. C. Y.; HENNING, S. J.; HOUCHEM, C. W.; KUO, C.; LYNCH, J.; LI, L.; MAGNESS, S. T.; MARTIN, M. G.; WONG, M. H.; YU, J.; NIH INTESTINAL STEM CELL CONSORTIUM. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 12, p. G1359–G1363, 15 jun. 2012.

STEPHENSON, C. B. Burden of infection on growth failure. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 2S Suppl, p. 534S–538S, fev. 1999.

SUÁREZ, R. M.; SPIES, T. D.; SUÁREZ, R. M. THE USE OF FOLIC ACID IN SPRUE. **Annals of Internal Medicine**, v. 26, n. 5, p. 643, 1 maio 1947.

SUSAN, J. Ci.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 15, p. 2990–2997, 1994.

SUZUKI, K.; FUKUI, H.; KAYAHARA, T.; SAWADA, M.; SENO, H.; HIAI, H.; KAGEYAMA, R.; OKANO, H.; CHIBA, T. Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 1, p. 348–352, 4 mar. 2005.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 465–476, jun. 2008.

TAGBO, I. F.; HILL, D. C. Effect of folic acid deficiency on pregnant rats and their offspring. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 427–433, jun. 1977.

THUROW, R. The First 1,000 Days: A Crucial Time for Mothers and Children—And the World. **Breastfeeding Medicine**, v. 11, n. 8, p. 416–418, 2016.

TIBBETTS, A. S.; APPLING, D. R. Compartmentalization of Mammalian Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. **The Annual Review of Nutrition**, v. 30, p. 57–81, 2010.

VAN DEN BRINK, G. R.; DE SANTA BARBARA, P.; ROBERTS, D. J. Epithelial Cell Differentiation--a Mather of Choice. **Science**, v. 294, n. 5549, 2001.

VAN DER FLIER, L. G.; SABATES–BELLVER, J.; O Ving, I.; HAEGEBARTH, A.; DE PALO, M.; ANTI, M.; VAN GIJN, M. E.; SUIJKERBUIJK, S.; VAN DE WETERING, M.; MARRA, G.; CLEVERS, H. The Intestinal Wnt/TCF Signature. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 628–632, fev. 2007.

VAN DER FLIER, L. G.; VAN GIJN, M. E.; HATZIS, P.; KUJALA, P.; HAEGEBARTH, A.; STANGE, D. E.; BEGTHEL, H.; VAN DEN BORN, M.; GURYEV, V.; O Ving, I.; VAN ES, J. H.; BARKER, N.; PETERS, P. J.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H. Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 903–912, 2009.

VAN DER SCHOOR, S. R. D.; REEDS, P. J.; STOLL, B.; HENRY, J. F.; ROSENBERGER, J. R.; BURRIN, D. G.; VAN GOUDOEVER, J. B. The high metabolic cost of a functional gut. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1931–1940, dez. 2002.

VAN ES, J. H.; JAY, P.; GREGORIEFF, A.; VAN GIJN, M. E.; JONKHEER, S.; HATZIS, P.; THIELE, A.; VAN DEN BORN, M.; BEGTHEL, H.; BRABLETZ, T.; TAKETO, M. M.; CLEVERS, H. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 381–386, 20 abr. 2005.

VISENTIN, M.; DIOP-BOVE, N.; ZHAO, R.; GOLDMAN, D. The Intestinal absorption of Folates. **Annu Rev Physiol**, v. 76, p. 251–274, 2014.

WAGNER, C. BIOCHEMICAL ROLE OF FOLATE IN CELLULAR METABOLISM\*. **Clinical Research and Regulatory Affairs**, v. 18, n. 3, p. 161–180, 2001.

WALZEM, R. L.; CLIFFORD, A. J. Folate Deficiency in Rats Fed Diets Containing Free Amino Acids or Intact Proteins. **The Journal of nutrition**, v. 118, n. 9, p. 1089–1096, 1988.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 15, p. 5293–300, ago. 2003.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157–68, 7 jan. 2000.

WHO. WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

WINTROBE, M. M. (Maxwell M.); GREER, J. P. **Wintrobe's clinical hematology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

WITHERS, H. R.; ELKIND, M. M. Microcolony Survival Assay for Cells of Mouse Intestinal Mucosa Exposed to Radiation. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 261–267, 3 jan. 1970.

WITTENBERG, D.; BENÍTEZ, C. V.; CANANI, R. B.; HADIGAN, C.; PERIN, N. M.; RABINOWITZ, S.; UKARAPOL, N. HIV Infection: Working Group Report of the Second World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 39, 2004.

WOJTOWICZ, J. M.; KEE, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1399–1405, nov. 2006.

WU, J.; ROMAN, A.-C.; CARVAJAL-GONZALEZ, J. M.; MLODZIK, M. Wg and Wnt4 provide

long-range directional input to planar cell polarity orientation in *Drosophila*. **Nature Cell Biology**, v. 15, 2013.

YAN, K. S.; CHIA, L. A.; LI, X.; OOTANI, A.; SU, J.; LEE, J. Y.; SU, N.; LUO, Y.; HEILSHORN, S. C.; AMIEVA, M. R.; SANGIORGI, E.; CAPECCHI, M. R.; KUO, C. J. The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 466–71, 10 jan. 2012.

YAN, K. S.; KUO, C. J. *Ascl2* Reinforces Intestinal Stem Cell Identity. **Stem Cell**, v. 16, p. 105–106, 2015.

YANG, A. S.; ESTÉCIO, M. R. H.; DOSHI, K.; KONDO, Y.; TAJARA, E. H.; ISSA, J. J. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 38e–38, 13 fev. 2004.

YANG, Q.; BERMINGHAM, N. A.; FINEGOLD, M. J.; ZOGHBI, H. Y. Requirement of *Math1* for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. **Science**, v. 294, n. 5549, 2001.

YU, D.-H.; GADKARI, M.; ZHOU, Q.; YU, S.; GAO, N.; GUAN, Y.; SCHADY, D.; ROSHAN, T. N.; CHEN, M.-H.; LARITSKY, E.; GE, Z.; WANG, H.; CHEN, R.; WESTWATER, C.; BRY, L.; WATERLAND, R. A.; MORIARTY, C.; HWANG, C.; SWENNES, A. G.; MOORE, S. R.; SHEN, L. Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 211, 2015.

YU, D.-H.; WARE, C.; WATERLAND, R. A.; ZHANG, J.; CHEN, M.-H.; GADKARI, M.; KUNDE-RAMAMOORTHY, G.; NOSAVANH, L. M.; SHEN, L. Developmentally programmed 3' CpG island methylation confers tissue- and cell-type-specific transcriptional activation. **Molecular and cellular biology**, v. 33, n. 9, p. 1845–58, maio 2013.

ZACHOS, N. C.; KOVBASNJUK, O.; FOULKE-ABEL, J.; IN, J.; BLUTT, S. E.; DE JONGE, H. R.; ESTES, M. K.; DONOWITZ, M. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 8, p. 3759–66, 19 fev. 2016.