

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Thaís Garcia Santos

**IMPLICAÇÕES DA RESTRIÇÃO INTRAUTERINA DE CRESCIMENTO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM SUÍNOS (*Sus scrofa*):
UMA INVESTIGAÇÃO SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ASPECTOS
MORFOFUNCIONAIS DO INTESTINO DELGADO**

Belo Horizonte - MG

2020

Thaís Garcia Santos

**IMPLICAÇÕES DA RESTRIÇÃO INTRAUTERINA DO CRESCIMENTO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM SUÍNOS (*Sus scrofa*): UMA
INVESTIGAÇÃO SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ASPECTOS
MORFOFUNCIONAIS DO INTESTINO DELGADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Fernanda R. C. L. de Almeida

Co-orientadora: Ana Luísa N. A. Dias

Belo Horizonte - MG

2020

043

Santos, Thaís Garcia.

Implicações da restrição intrauterina de crescimento sobre o desenvolvimento pós-natal em suínos (*Sus scrofa*): uma investigação sobre o perfil metabólico e aspectos morfofuncionais do intestino delgado [manuscrito] / Thaís Garcia Santos. – 2020.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida.
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Luísa Neves Alvarenga Dias.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Desenvolvimento Fetal. 2. Retardo do Crescimento Fetal. 3. Intestino Delgado. 4. Doenças Metabólicas. I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Dias, Ana Luísa Neves Alvarenga. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

THAIS GARCIA SANTOS

229/2020
entrada
2º/2016
2016740714

As quatorze horas do dia 09 de setembro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"IMPLICAÇÕES DA RESTRIÇÃO INTRAUTERINA DE CRESCIMENTO SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM SUÍNOS (SUS SCROFA): UMA INVESTIGAÇÃO SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO INTESTINO DELGADO"**, requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	Aprovada
Dra. Ana Luísa Neves Alvarenga Dias	UFU	Aprovada
Dra. Amanda Maria Sena Reis	UFMG	Aprovada
Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau	UFMG	Aprovada
Dr. Paulo Henrique Reis Furtado Campos	UFV	Aprovada
Dr. Luíz Felipe Caron	UFPR	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 09 de setembro de 2020.**

Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Orientadora) _____

Dra. Ana Luísa Neves Alvarenga Dias (Coorientadora) _____

Dra. Amanda Maria Sena Reis _____

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau _____

Dr. Paulo Henrique Reis Furtado Campos _____

Dr. Luíz Felipe Caron _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

Dedico esta tese aos meus pais, Eliana e Erli.

A vocês, meu eterno amor e gratidão!

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros e isso é caridade”.

S. Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me permitir chegar aqui e realizar este sonho! Obrigada pela divina providência! Obrigada por cuidar da minha vida e por iluminar meu caminho de uma forma tão especial!

Aos meus pais Eliana e Erli Donizetti por preencher meu mundo de amor! Por todo o carinho, compreensão, paciência e força! Amo vocês e sou eternamente grata por tudo! Nada teria sentido sem vocês! Esta vitória é nossa!!

À minha orientadora, Fernanda Almeida, por ser mais muito mais que orientadora! Nunca vou saber agradecer por tudo que fez por mim! Obrigada pela paciência, delicadeza, confiança, paciência e por ser um exemplo de profissional para mim! Desejo que nossos laços sejam eternos!!

Ao professor Hélio Chiarini pela amizade, conselhos e por todo auxílio nas histomorfometrias e em campo! Seu papel foi essencial!!

À minha Co-orientadora Ana Luísa por ter sido luz no meu caminho. Minha eterna gratidão pelas ligações, mensagens de carinho e por sempre enxergar o que há de melhor em mim!

Aos meus amigos de laboratório que estiveram comigo nesta caminhada e fizeram minha jornada mais leve!! Sou eternamente grata a vocês por toda amizade, ajuda nas coletas em campo, conselhos e por compartilhar tantos momentos maravilhosos durante estes anos! Stefany, Saffir, Fernando, Thaís, André, Núbia, Marco Antônio, Lucas, Guilherme, Tailine, Marina, Vitória, muito obrigada por tudo!!

Aos professores colaboradores que foram tão gentis durante minha jornada!! Obrigada pela parceria, empréstimo de reagentes e laboratórios, pela amizade e pela enorme boa vontade em participar do meu projeto! Juliana, Luciana, Vasco, Aline, Érika, Enrico, Rafael: minha eterna gratidão!

Ao meu primo Felipe por ser muito mais que primo, um irmão! Você foi essencial durante todo este percurso!! Obrigada por tudo!!

Aos queridos amigos que estiveram sempre comigo desde o início até o fim, ofereço a minha gratidão e a minha admiração. Às queridas Samira, Suzy e Késia, pela amizade sem interesses, pela amizade sincera, pela paciência com os meus “sumiços” e pela amizade verdadeira! Obrigada meninas!

À Fazenda São Paulo, pela confiança e por deixarem as portas abertas sempre quando precisei. Em especial, agradeço aos amigos Rodrigo de Carvalho e Lucas Resende por nunca terem medido esforços para me ajudar. Agradeço também a todos os funcionários pela colaboração imprescindível na execução deste experimento.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade e em especial, à professora Érika pela enorme docilidade em todos os momentos em que precisei.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto de pesquisa.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a idealização e finalização deste trabalho, deste sonho que se tornou realidade. Muito obrigada!

RESUMO

A restrição intrauterina do crescimento (RIUC) compromete o desenvolvimento fetal, resultando em baixo peso ao nascimento e representa a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo. Algumas evidências associam a RIUC a altos índices de morbidade e predisposição a doenças na vida adulta, incluindo distúrbios gastrintestinais e metabólicos, que representam importantes problemas de saúde pública. Até o momento não existem relatos dos efeitos da RIUC sobre o perfil metabólico e características morfofuncionais do intestino delgado ao longo do desenvolvimento pós-natal utilizando o suíno como modelo experimental. Nesta espécie, a RIUC ocorre naturalmente de forma severa e além disto, sua semelhança anatômica e fisiológica aos humanos os torna potenciais modelos de estudos translacionais. Associado ao seu papel como modelo experimental o suíno também representa um importante elo na cadeia do agronegócio mundial. Animais acometidos por RIUC que apresentam um pior desenvolvimento pós-natal leva a grandes perdas econômicas para a agroindústria enaltecendo sua importância também neste contexto. Assim, objetivou-se com esta pesquisa investigar possíveis alterações no desempenho, no perfil metabólico e em características morfofuncionais e inflamatórias do intestino delgado de leitões em diferentes idades: ao nascimento, desmame, 65 dias (infância) e 150 dias (pré-adolescência), submetidos ou não à RIUC. Duzentos e quarenta leitões machos, irmãos de mesma ninhada, foram selecionados e divididos em dois grupos experimentais de acordo com o peso ao nascer: peso normal (PN) (1,6 - 1,9 kg; n = 120) e leitões acometidos por restrição intrauterina de crescimento (RIUC) (0,7 - 1,0 kg; n = 120). Nas respectivas idades, todos os animais foram submetidos a medidas biométricas e 10 pares de leitões (10 PN e 10 RIUC) foram aleatoriamente selecionados e eutanasiados. Amostras de sangue foram coletadas para análise dos perfis glicêmico e lipídico e fragmentos de tecido adiposo (visceral e subcutâneo) e do intestino delgado (duodeno e jejuno) foram seccionados para análises histomorfométricas, enzimáticas e moleculares. Os resultados mostraram que os leitões IUGR permaneceram menores ao longo do desenvolvimento pós-natal, porém, observou-se um crescimento catch-up, que se caracteriza pelo crescimento corporal e dos órgãos mais acelerado. Além disso, o menor peso corporal também foi associado à hipertrigliceridemia e maior concentração de gordura visceral. Tal condição indica riscos metabólicos mais elevados na vida adulta. Em relação às alterações morfofuncionais no intestino delgado, houve comprometimento do perfil estrutural e inflamatório, principalmente aos 65 dias de idade

em leitões RCIU. Juntos, nossos dados sugerem que o RIUC compromete as funções digestivas e imunológicas do intestino delgado e predispõe ao risco metabólico ainda na infância, que pode levar a danos permanentes à saúde e ao bem-estar do indivíduo.

PALAVRAS-CHAVE: programação fetal, doença metabólica, distúrbio gastrointestinal.

ABSTRACT

Intrauterine growth restriction (IUGR) compromises fetal development, resulting in low birth weight and represents the second leading cause of infant mortality in the world. Some evidences associate IUGR with high rates of morbidity and predisposition to diseases in adulthood, including gastrintestinal and metabolic disorders, which represent important public health problems. To date, there are no reports on the effects of IUGR on the metabolic profile and morphofunctional characteristics of the small intestine during postnatal development using pigs as an experimental model. In this species, IUGR occurs naturally in a severe way and in addition, its anatomical and physiological similarities to humans makes them potential models for translational studies. Associated with its role as an experimental model, the pig also represents an important player in the global agribusiness chain. Animals affected by IUGR present poor postnatal development leading to great economic losses. Thus, the objective of this research was to investigate possible changes in performance, metabolic profile and morphofunctional and inflammatory characteristics of the small intestine in pigs at different ages: birth, weaning, 65 days (childhood) and 150 days (juvenile), submitted or not to IUGR. Two hundred and forty male littermate piglets, were selected and divided into two experimental groups according to birth weight: normal weight (NW) (1.6– 1.9 kg; n = 120) and piglets affected by intrauterine growth restriction (IUGR) (0.7 - 1.0 kg; n = 120). At their respective age, all animals were subjected to biometric measurements and 10 pairs of piglets (10 NW and 10 IUGR) were randomly selected and euthanized. Blood samples were collected for analysis of glycemic and lipid profiles and fragments of adipose tissue (visceral and subcutaneous) and small intestine (duodenum and jejunum) were sectioned for histomorphometric, enzymatic and molecular analyzes. The results showed that the IUGR piglets remained smaller throughout postnatal development, however, catch-up growth were observed, since they showed a more accelerated growth of both body weight and organs. In addition, lower body weight was also associated with hypertriglyceridemia and a higher concentration of visceral fat. Such condition indicates higher metabolic risks in adulthood. Regarding the morphofunctional changes in the small intestine, there was a structural and inflammatory profile impairment, especially at 65 days of age in IUGR piglets. Together, our data suggest that RIUC compromises the digestive and immunological functions of the small intestine and predisposes to metabolic risk even in childhood, which can lead to permanent damage to the individual's health and well-being.

KEYWORDS: fetal programming, metabolic disease, gastrointestinal disorder.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo das principais etapas do desenvolvimento pré-natal no suíno.....	22
Tabela 2- Oligonucleotídeos usados na análise de expressão gênica.....	51
Tabela 3- Peso e ganho de peso médio diário de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	53
Tabela 4- Peso e ganho de peso médio diário de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	55
Tabela 5- Parâmetros biométricos de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	56
Tabela 6- Parâmetros histomorfométricos do intestino delgado de PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	66
Tabela 7- Correlação entre o peso ao nascimento e aos 26, 65 e 150 dias com parâmetros morfométricos e histomorfométricos do intestino delgado	73
Tabela 8 - Atividade enzimática específica de enzimas do intestino delgado de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Placenta suína.....	25
Figura 2 - Esquema das principais causas de RIUC, incluindo contribuições maternas, placentárias e fetais.....	28
Figura 3 - Potenciais distúrbios metabólicos de longo prazo associados a RCIU.....	31
Figura 4 - Progressão da maturação gastrointestinal em três espécies.....	33
Figura 5 - Representação esquemática de medidas biométricas aferidas em suínos.....	42
Figura 6 - Desenho esquemático do cálculo do diâmetro do adipócito visceral e subcutâneo	46
Figura 7 - Parâmetros histológicos analisados no intestino delgado dos suínos em ambos os grupos e em todas as idades	48
Figura 8 - Ocorrência de crescimento catch-up em suínos RIUC.....	54
Figura 9 - Índices biométricos para avaliação da adiposidade em suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	57
Figura 10 - Perfil lipídico e glicêmico sérico de suínos normais e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal	59
Figura 11 - Correlação entre peso corporal e triglicérides, colesterol e glicose.....	60
Figura 12 - Número de adipócitos subcutâneos / mm ² em suínos entre 26 e 150 dias	61
Figura 13 - Número de adipócitos viscerais / mm ² em suínos entre 65 e 150 dias.....	62
Figura 14 - Frequência de diâmetro de adipócitos subcutâneos de suínos PN e RIUC.....	63
Figura 15 - Frequência de diâmetro de adipócitos viscerais de suínos PN e RIUC.....	64
Figura 16 - Fotomicrografia do duodeno de suínos PN e RIUC.....	67
Figura 17 - Fotomicrografia do jejuno de suínos PN e RIUC.....	68
Figura 18 - Caracterização da expressão de KI-67 e Caspase-3 em duodenos de suínos durante o desenvolvimento pós-natal	70

Figura 19 - Valores médios de expressão relativa de genes pró-inflamatórios no duodeno de suínos do grupo PN e RIUC.....	76
Figura 20 - Avaliação da expressão relativa de genes pró-inflamatórios no duodeno de suínos do grupo PN e RIUC em três fases de vida pós-natal.....	77
Figura 21 - Redes de correlação entre genes pró-inflamatórios.....	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Desenvolvimento pré-natal em suínos	20
2.1.1. Fecundação e implantação	21
2.1.2. Placentação e classificação da placenta em suínos	23
2.2. A restrição de crescimento intrauterina (RIUC)	26
2.3. Origem fetal de doenças adultas x RIUC	28
2.4. Desenvolvimento intestinal em suínos.....	31
2.5 Conseqüências da RIUC no desenvolvimento intestinal.....	33
2.6. O suíno como modelo experimental de RIUC	35
2.7. Implicações da RIUC na suinocultura.....	36
3.0. HIPÓTESE	38
4.0. OBJETIVOS	38
4.1. Geral.....	38
4.2. Específicos	38
5.0. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1. Locais e instalações.....	39
5.2. Animais e design experimental	39
5.3. Procedimentos da eutanásia	40
5.4. Medidas biométricas	41
5.5. Índices de adiposidade corporal	42
5.6. Coleta e processamento de amostras	43
5.6.1. Coleta de sangue.....	43
5.6.2. Coleta e processamento de tecido adiposo	44
5.6.3. Coleta e processamento do intestino delgado	44
5.7. Análise do perfil glicêmico e lipídico	45
5.8. Análises histomorfométricas	45
5.8.1. Preparação das amostras.....	45
5.8.2. Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo visceral e subcutâneo.....	46
5.8.3. Avaliação histomorfométrica do duodeno e jejuno.....	46

5.9. Expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e apoptose por meio de imunofluorescência (IF)	48
5.10. Expressão relativa de genes pró-inflamatórios por PCR quantitativo em tempo real.....	50
5.11. Determinação da atividade específica de enzimas intestinais	51
5.12. Análise estatística	52
6.0. RESULTADOS	53
6.1. Desenvolvimento pós-natal	53
6.2. Biometria dos órgãos.....	54
6.3. Medidas biométricas	56
6.4. Adiposidade corporal	57
6.5. Perfis glicêmico e lipídico.....	58
6.7. Histomorfometria do intestino delgado.....	65
6.8. Avaliação da proliferação celular e apoptose.....	69
6.9. Correlações entre o peso corporal e parâmetros intestinais.....	71
6.10. Atividade enzimática específica.....	74
6.11. Expressão relativa de citocinas inflamatórias	75
7.0. DISCUSSÃO	79
8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
10.0. ANEXOS	93

1.0. INTRODUÇÃO

Estima-se que 80% de 2.5 milhões de recém nascidos que morrem anualmente no mundo têm baixo peso ao nascer, seja por prematuridade ou por restrição intrauterina de crescimento (RIUC) (Blencowe et al., 2019). A RIUC está associada ao desenvolvimento fetal abaixo do potencial de crescimento para a idade gestacional e frequentemente está associada ao comprometimento da função uteroplacentária (Novac et al., 2018). Em um ambiente intrauterino desfavorável, uma das estratégias de sobrevivência fetal é o redirecionamento do fluxo sanguíneo para o cérebro em detrimento de órgãos como o intestino delgado, comprometendo o seu desenvolvimento (Gilchrist, et al., 2019).

Sabe-se que alterações metabólicas fetais decorrentes de mudanças no ambiente nutricional podem resultar em sequelas tardias, como diminuição da tolerância à glicose diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Sidiropoulou et al., 2018). Foi relatado ainda que recém-nascidos acometidos por RIUC apresentam disfunções estruturais, enzimáticas e inflamatórias no intestino delgado e especula-se que estas sejam as principais causas do baixo crescimento e mortalidade nestes indivíduos (D’Inca et al., 2010; Ferenc, et al., 2017; Huang et al., 2020).

Dentre os mamíferos, os suínos apresentam as mais altas taxas de RIUC, chegando a afetar até 30% de recém-nascidos de uma leitegada (Su et al., 2007; D’Inc et al., 2010). Nesta espécie, a RIUC é responsável por altas taxas de mortalidade nas primeiras semanas de vida e pela redução do ganho de peso ao longo do desenvolvimento, o que leva a grandes perdas econômicas para o setor (Alvarenga et al., 2013). Neste sentido, além da importância para a saúde pública, estudos abordando a RIUC neste modelo animal apresenta grande relevância para o agronegócio mundial.

Embora os efeitos da RIUC sobre a morfofisiologia do intestino delgado e a adiposidade na fase pós-natal precoce tenham sido estudados, o conhecimento de suas implicações em idades mais avançadas ainda é limitado.

2.0. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento pré-natal em suínos

O desenvolvimento ao longo do período intrauterino merece grande destaque e atenção, uma vez que neste curto período de formação do feto diversas questões importantes podem ser desencadeadas. Na espécie suína, dentre os principais fatores que influenciam o desenvolvimento fetal destacam-se a nutrição, a diferença entre raças, a capacidade uterina e eficiência placentária (Reynolds et al., 2005; Alvarenga et al., 2013). O conhecimento destes fatores torna-se cada vez mais importante, pois o processo de maturação fisiológica ocorre desde o período embrionário e continua após o nascimento, podendo ser atrasado ou acelerado por influência de fatores negativos ou positivos durante a gestação (Finnemore A e Groves, 2015).

Os avanços do melhoramento genético na suinocultura têm propiciado a geração de fêmeas com alta performance reprodutiva, capaz de conceber leitegadas cada vez mais numerosas. Este fato proporcionou o aumento no número de conceptos, mas o tamanho do útero não foi proporcionalmente aumentado, tornando o espaço uterino e a eficiência placentária limitada (Wu et al. 1989; Bruessow e Waehner 2008; Vernunft e Brüßow, 2018). Devido a tal fato, o peso dos recém-nascidos de uma ninhada tornou-se cada vez mais heterogêneo, que reflete a correlação negativa entre o número de leitões por ninhada e o peso médio dos recém-nascidos (Panzardi et al. 2009).

2.1.1. Fecundação e implantação

Entre a fecundação e o nascimento, alguns eventos são peculiares da espécie suína. Em torno de dois dias após a fecundação (que ocorre na ampola da tuba uterina) o embrião entra no útero, tendo alcançado neste momento, a fase de duas a quatro células (Tabela 1). Já no 4º dia, é atingido o estado de mórula, estando presente cerca de de 8 a 32 células (Meredith et al., 1995). Dentro do conjunto de células que compõem a mórula, uma cavidade cheia de fluido denominada blastocèle é gerada e aumenta rapidamente até que o embrião se apresente como uma esfera oca, sendo denominado blastocisto (Geisert et al., 1992). No 7ª dia ocorre a eclosão da zona pelúcida e até o 12º dia gestacional, os blastocistos aumentam consideravelmente o tamanho para uma média de 50 milímetros e passam a migrar entre os dois cornos uterinos. Ainda aos 12 dias gestacionais, os embriões começam a alongar-se e secretar estrogênio, substância crucial para o reconhecimento materno e manutenção da gestação na espécie suína (Geisert et al., 1997; Bazer et al., 1991). Se uma parte significativa do útero está desocupada, a gestação é interrompida.

Após dois dias, o embrião começa a implantar-se no útero, estando completa quando se observa grande interação das microvilosidades uterinas e trofoblásticas, após o 18º dia de gestação (Geisert et al., 1982). Este período de implantação é crucial para o desenvolvimento, nutrição e adesão dos embriões ao epitélio uterino, e representa a fase de maior perda embrionárias, ocorrendo em até 30% destes. A implantação constitui a fase inicial da formação das membranas da placenta (Dantzer, 1985).

Tabela 1- Resumo das principais etapas do desenvolvimento pré-natal no suíno

Dias após a ovulação	Estádio	Eventos
1	2 células	Início da divisão celular
2	4 células	Entrada no útero, início da produção de mRNA
4	Até 32 células	Formação da blastocele
6-7	Blastocisto em eclosão	Saída da zona pelúcida
7-12	Blastocisto em eclodido	Expansão, migração e espaçamento nos cornos uterinos
9-14	Blastocisto eclodido	Gastrulação. Formação e crescimento individualizado da placenta e embrião
10-12	Blastocisto esférico	Produção de estrógeno. Reconhecimento materno da gestação
12-13	Alongado	Concepto alonga-se em até 50 mm, Início da adesão ao útero
16-17		Início da formação dos membros anteriores
17-18		Início da formação dos membros posteriores
20-21		Pigmentação dos olhos, tubérculo genital e orifícios olfatórios
30-33		Quatro dígitos tornam-se aparentes em cada pata
35-36		Início da vida fetal, formação dos órgãos
44		Escroto ou lábios vulvares presentes
90-100		Aparecimento dos pelos
105-114		Testículos presentes no escroto

Adaptado de Meredith, 1995.

2.1.2. Placentação e classificação da placenta em suínos

A placenta é um órgão materno-fetal que estabelece a interface para nutrição e trocas gasosas entre circulação materna e fetal. A estrutura anatômica da placenta é variada entre as espécies em níveis macro e microscópicos e essas diferenças se refletem nos mecanismos de troca de substâncias (Hay, 1994). Em termos macroscópicos, a placenta suína é considerada difusa, em que as microvilosidades do córion são distribuídas de forma uniformemente por toda a superfície do saco coriônico (Figura 1B) (Vernunft e Brüssow, 2018). A troca materno-fetal, portanto, ocorre ao longo de quase toda a superfície do córion (Vallet et al., 2009). Em termos microscópicos a classificação placentária é baseada no número de camadas de células que separam o sangue materno do fetal. Neste caso, em suínos, a placenta é epiteliocorial e há um número máximo de barreiras celulares, sendo estas: o endotélio dos capilares maternos, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico fetal, tecido conjuntivo fetal e endotélio dos vasos fetais (Figura 1A) (Renfree, 1985).

Em suínos, o crescimento placentário ocorre a partir do 38º dia gestacional e perdura até o nascimento. De acordo com Wigmore & Stickland (1985), a área placentária cresce de acordo com o aumento da circunferência uterina onde o conceito está implantado (Figura 1B). Neste mesmo estudo, o comprimento da placenta foi menor nos cornos uterinos mais lotados, de tal forma que a área placentária se correlacionou positivamente com o peso fetal. Estes resultados foram um dos primeiros achados que demonstraram a competição por espaço dentro o útero como causa primordial da variação do tamanho fetal e da ninhada.

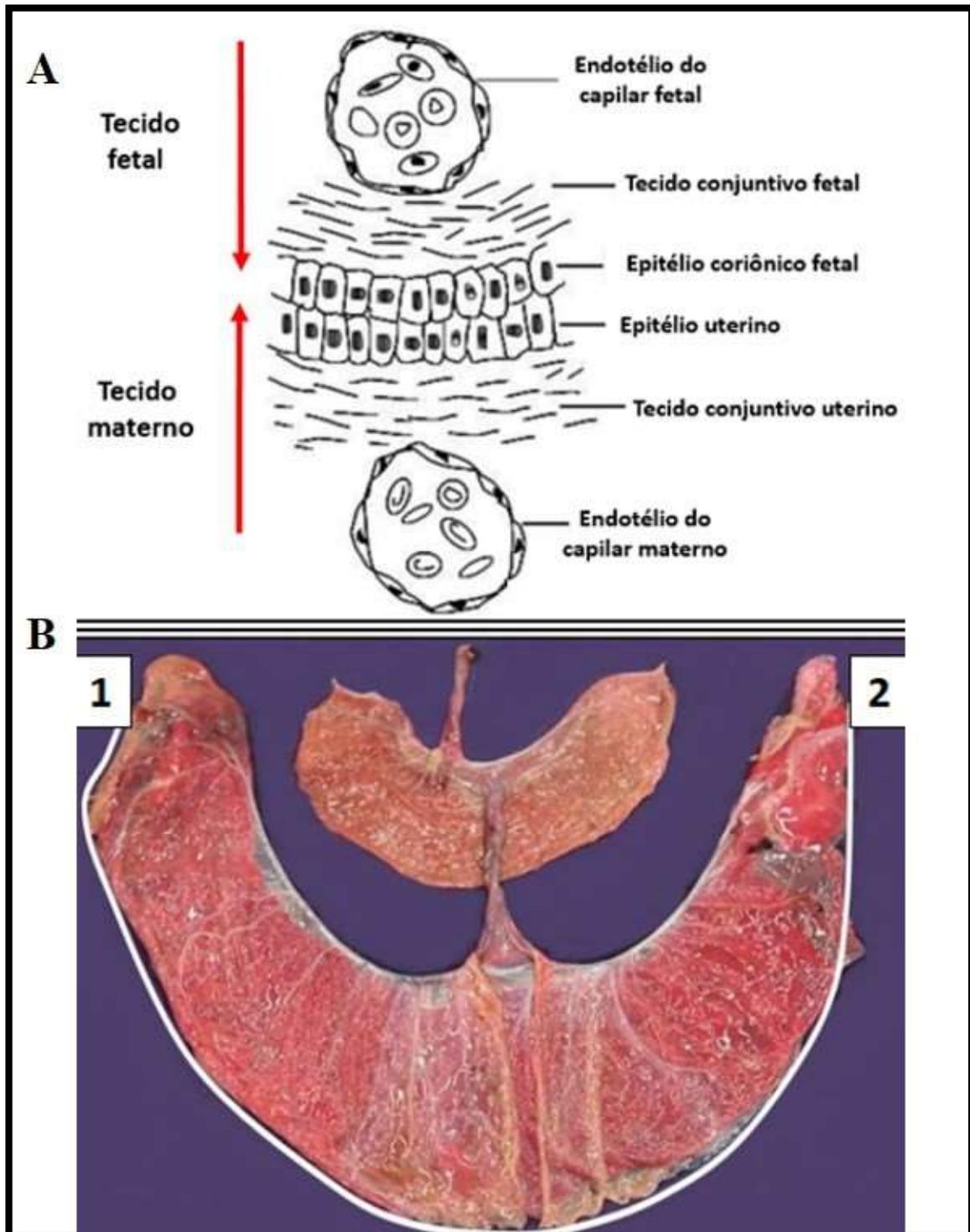


Figura 1: Placenta suína. (A) Microestrutura da placenta epiteliocorial representando as 6 camadas celulares que separam a circulação materna da fetal. (B) Morfologia da placenta do tipo difusa. A linha branca destaca a diferença de comprimento (1 e 2) entre placentas provenientes da mesma fêmea. Adaptado de Renfree, 1985 e Vernunft e Brussel, 2018).

2.2.A restrição de crescimento intrauterina (RIUC)

A privação de nutrientes na vida intrauterina pode alterar o metabolismo fetal para assegurar a sobrevivência, levando a alterações permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo (Wang et al., 2008). Este fenômeno é conhecido como programação pré-natal, processo pelo qual insultos na vida uterina podem alterar a estrutura e função dos órgãos (Bertran e Hanson, 2002). A restrição de crescimento intrauterina (RIUC) refere-se a uma condição em que a taxa de crescimento do feto é inferior ao potencial de crescimento normal para a idade gestacional (Madruzzato et al., 2008). Dentre as principais causas, destacam-se efeitos genéticos, maternos, fetais ou uteroplacentários, sendo este último a causa mais recorrente em seres humanos e suínos (Wu et al., 2006) (Figura 2).

Quanto mais precoce a ocorrência de insultos na gestação, maior é a gravidade das consequências do RIUC na vida pós-natal. (Salan, et al., 2014). Considerando a idade gestacional em que o feto é acometido por insultos, a RIUC é classificada nos perfis simétricos ou assimétricos. O perfil simétrico, é associado a infecção ou distúrbios genéticos e caracteriza-se pela redução do número de células no início da gestação, o que torna evidente a diminuição proporcional dos órgãos durante a gestação.

Já o perfil assimétrico, que representa até 70% dos diagnósticos, normalmente é proveniente de insuficiência uteroplacentária (Nardozza et al., 2012). Neste caso, o feto pode crescer dentro do seu potencial genético no início da gestação, porém, a partir do terço final, o ambiente materno limitará seu desenvolvimento normal (Sharma, 2016). Nesta condição, é evidente a assimetria dos órgãos, proveniente do efeito “brain sparing”, que se caracteriza pelo redirecionamento do fluxo sanguíneo para o cérebro, a fim de preservar suas funções vitais. No entanto, alguns órgãos podem não se desenvolver como o esperado, uma vez que a vascularização dos mesmos é comprometida (Almeida, 2014).

A RIUC é um problema clínico grave, associado ao aumento da morbidade e mortalidade perinatal e estudos epidemiológicos afirmam ser a segunda causa de mortalidade infantil, afetando quase 10% de todas as gestações em humanos (Lee et al., 2013). Esta representa uma importante preocupação de saúde pública, especialmente em países com poucos recursos. Estima-se que incidência de RIUC nestes locais seja 6 vezes maior que os países desenvolvidos, como os Estados Unidos, que apresenta índices médios de 4%. Na Ásia, por exemplo, em torno de 30 milhões de bebês por ano sofrem desta condição, respondendo por 75% de todas as crianças afetadas, e a África e a América Latina contribuindo com 20% e 5% dos casos, respectivamente.

As complicações a curto prazo incluem hipóxia ao nascer, distúrbios respiratórios, gastrintestinais e neurológicos. Ainda na infância, são relatados prejuízos na função cardíaca, motora, cognitiva, muscular e visuais, risco aumentado de resistência à insulina, síndrome metabólica e desordens cardiovasculares (Leitner et al., 2007; Murray et al., 2015). Tais evidências apontam que crianças acometidas por RIUC, mesmo nascidas a termo, têm risco aumentado de alterações do desenvolvimento, no entanto, a cinética do desenvolvimento destes indivíduos ainda é incerta (Valsamakis et al., 2006).

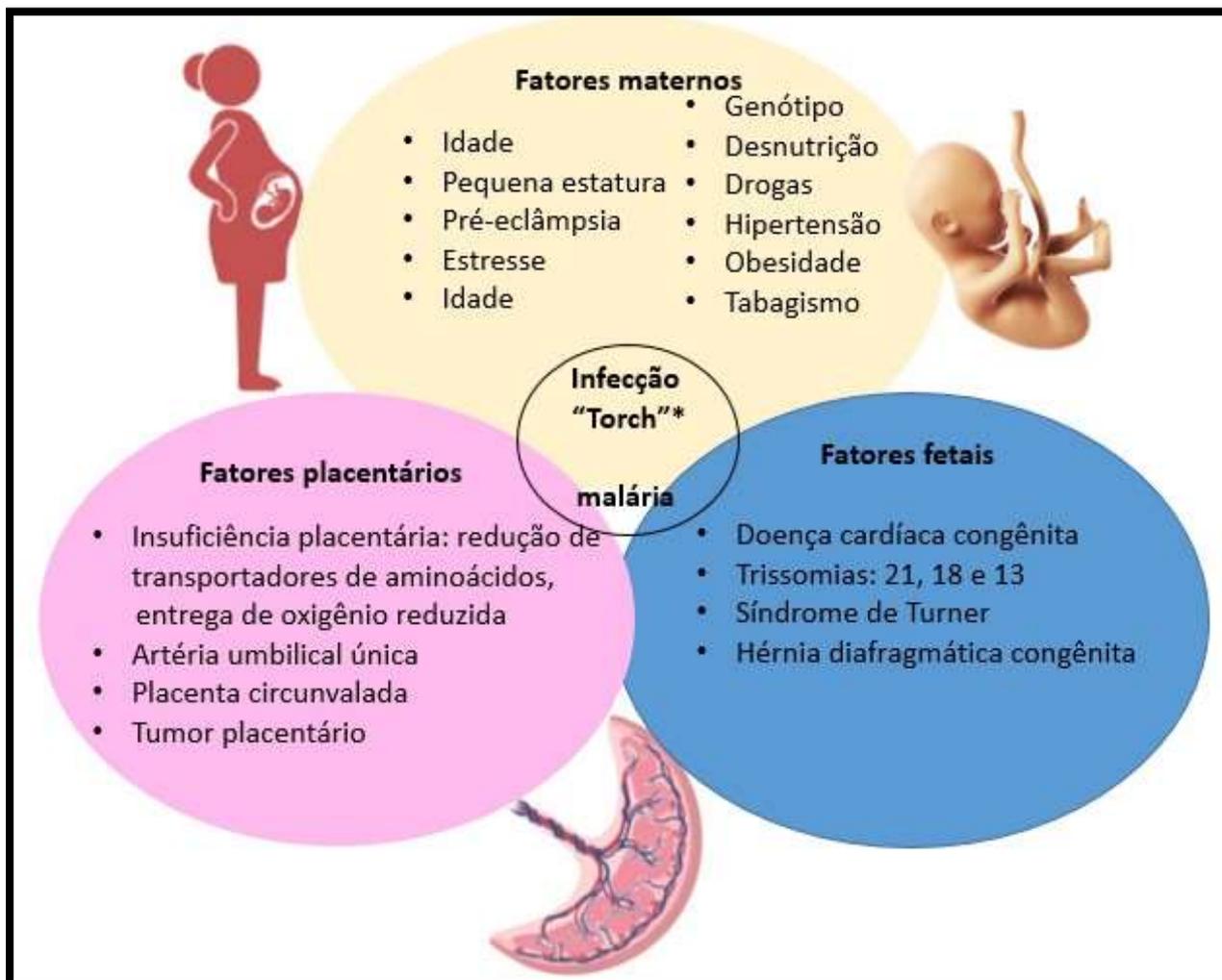


Figura 2: Esquema das principais causas de RIUC, incluindo contribuições maternas, placentárias e fetais. * Infecção Torch: Indica uma série de infecções que podem afetar o decurso da gravidez e provocar malformações fetais. Adaptado de Fleiss. 2019.

2.3. A origem fetal de doenças adultas x RIUC

Do ponto de vista epidemiológico, a desnutrição materna é a principal causa de RIUC em países em desenvolvimento, por outro lado, as disfunções uteroplacentárias é o fator predominante de sua ocorrência em países industrializados resultante principalmente da hipertensão materna (Neitzke, et al., 2011). É importante destacar que ambos fatores promovem redução de suprimento nutricional ao feto e por consequência limitam o desenvolvimento.

Uma associação entre o baixo peso ao nascimento e a ocorrência de síndrome

metabólica tardia foi observada pela primeira vez por Barker et al. (1989). Desde então,

sua teoria foi confirmada por uma série de estudos (Wilson, 1999; Armelagos, et al., 2009; Radzislav, et al., 2016). De fato, constatou-se que as alterações metabólicas fetais decorrentes de mudanças no ambiente nutricional resultaram em sequelas tardias, como tolerância à glicose diminuída, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Sidiropoulou et al., 2018) (Figura 4). O agrupamento dessas anormalidades metabólicas constitui a síndrome metabólica, uma das principais causas atuais de mortalidade na vida adulta (Engin, 2017).

Recém-nascidos que foram afetados pela RIUC podem continuar a ter problemas no crescimento durante a infância (Sarr, et al., 2014). Por exemplo, a maioria destes bebês experimentam crescimento de recuperação (*catch-up*) nos primeiros 2 anos de idade. Este fenômeno é um mecanismo compensatório frequente nesta condição e geralmente recupera o peso do recém-nascido RIUC, mas estudos sugerem sua ocorrência com o aumento da deposição de tecido adiposo visceral (Martin et al., 2016), a maior circunferência abdominal e IMC e elevadas concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e LDL (Tzschoppe et al., 2017; Sidiropoulou et al., 2018). Considerando que a circunferência abdominal pode refletir o índice de adiposidade visceral e o tamanho hepático, sugere-se que o desenvolvimento destes órgãos é afetado, com prejuízo das funções de regulação da síntese de colesterol, o que levaria a mudanças permanentes no metabolismo lipídico (Wang, et al., 2008; Zinkhan et al., 2016).

A RIUC pode alterar a expressão de múltiplos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos e estudos indicam o uso preferencial de ácidos graxos como fonte de energia, em resposta a baixa oferta de alimento da vida intrauterina (Saar et al., 2011). Assim, o baixo peso ao nascer associado a RIUC pode agravar a obesidade tardia decorrente de maior adiposidade central.

Em relação a associação da RIUC sobre o aumento do risco de síndrome metabólica tardia, algumas informações na literatura permanecem divergentes. Por exemplo, é amplamente sugerido que a RIUC pode programar a obesidade na vida adulta (Tosh, et al., 2010; Ross e Desai, 2013). No entanto, em uma revisão sistemática publicada com dados de aproximadamente 980.000 participantes de 16 países, apenas 8% dos estudos mostraram uma associação entre RIUC e sobrepeso (Neitzke, et al.; 2018).

O conhecimento do metabolismo dos lipídeos, a expressão fenotípica corporal e a compreensão dos processos fisiológicos relacionadas a adiposidade poderiam garantir intervenções oportunas para a prevenção e gestão das várias doenças que afetam a maioria dos sistemas em indivíduos acometidos pela RIUC.

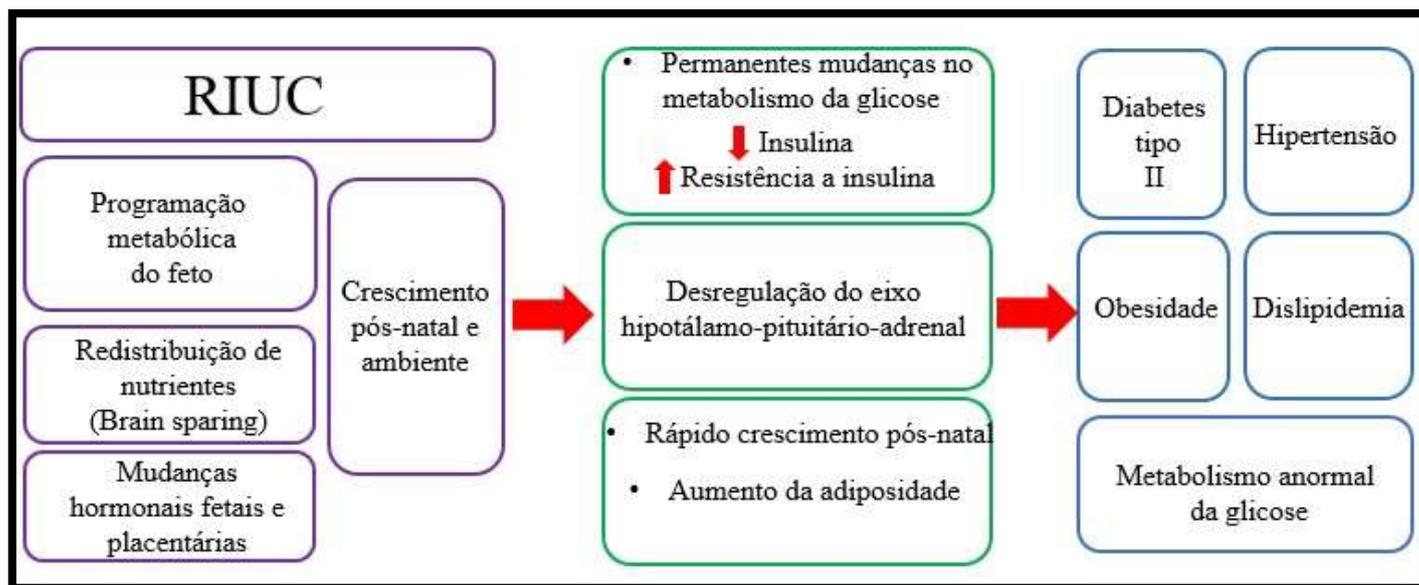


Figura 3: Potenciais distúrbios metabólicos de longo prazo associados a RCIU. Ambiente intrauterino adverso resulta em programação fetal, que, junto com recuperação pós-natal crescimento, tem consequências metabólicas de longa duração, incluindo resistência à insulina, dislipidemia e doenças cardiovasculares. Adaptado de Kesavan et al., 2019.

2.4. O desenvolvimento intestinal em mamíferos

A gestação é um momento em que condições adversas no útero podem induzir alterações nos padrões de desenvolvimento normal, particularmente para o intestino

delgado, o que torna este um período crítico para a programação do fenótipo adulto (Ilekis et al., 2016).

O desenvolvimento do trato gastrintestinal varia quanto a espécie (Figura 3), sendo influenciada tanto por fatores intrínsecos (genéticos e hormonais) quanto pela transição da nutrição parenteral (através da placenta) para a nutrição enteral após o nascimento (Sangild et al., 2001). A maturação intestinal é particularmente rápida durante o período perinatal e são induzidas por nutrientes e moléculas bioativas presentes no colostro e no leite, que primariamente, são absorvidas por enterócitos vacuolados, do tipo fetal (Ferenc, et al., 2017). Em neonatos, esta célula é essencial no transporte de proteínas intactas do colostro e do leite sendo tal fato crucial para o desenvolvimento dos sistemas imunológico e digestivo dos leitões recém-nascidos. Isto é particularmente importante para os suínos, por que a placenta desta espécie não permite que as imunoglobulinas sejam transferidas para o feto através da circulação antes do nascimento (Jensen et al., 2001). Ademais, os enterócitos fetais desempenham um papel fundamental na digestão intracelular, já que em neonatos, a secreção de sucos digestivos é de baixo potencial (Ferenc et al., 2014).

Após o nascimento, o processo de maturação intestinal inclui mudanças marcantes no peso relativo do intestino, da mucosa, na atividade enzimática da borda em escova, bem como capacidade de transporte de íons e nutrientes e tais mudanças, são em parte, mediadas pela alteração da dieta. Além da estimulação da dieta, um aumento temporário nos níveis de cortisol circulante após o desmame desempenha um papel importante na maturação bioquímica do intestino delgado (Sangild et al., 2001).

A domesticação de *Sus scrofa* desacelerou significativamente a estrutura e função da mucosa do trato gastrintestinal, sendo o desmame precoce um dos grandes contribuintes para tal fato (Helke et al., 2015). Em condições comerciais, a transição do desmame nesta espécie implica em mudanças repentinas da dieta do leite materno à alimento sólido. Além

disso, envolve a separação abrupta da mãe e a mudança para um novo ambiente em uma idade muito mais jovem do que seria em condições naturais, ocasionando-lhe grande estresse (Pluske, 2016).

O desmame manifesta em suínos alterações fisiológicas como a redução da atividade mitótica nas criptas e aumento da apoptose dos enterócitos, substituição mais lenta dos enterócitos fetais pelo tipo adulto, perfil modificado das enzimas da borda em escova e maior suscetibilidade a agentes infecciosos (Wang et al., 2010). O conjunto destes fatores podem resultar em uma redução significativa da digestibilidade dos nutrientes na primeira semana após o desmame levando a consequências na saúde e no desempenho dos animais (Gomes et al., 2007).

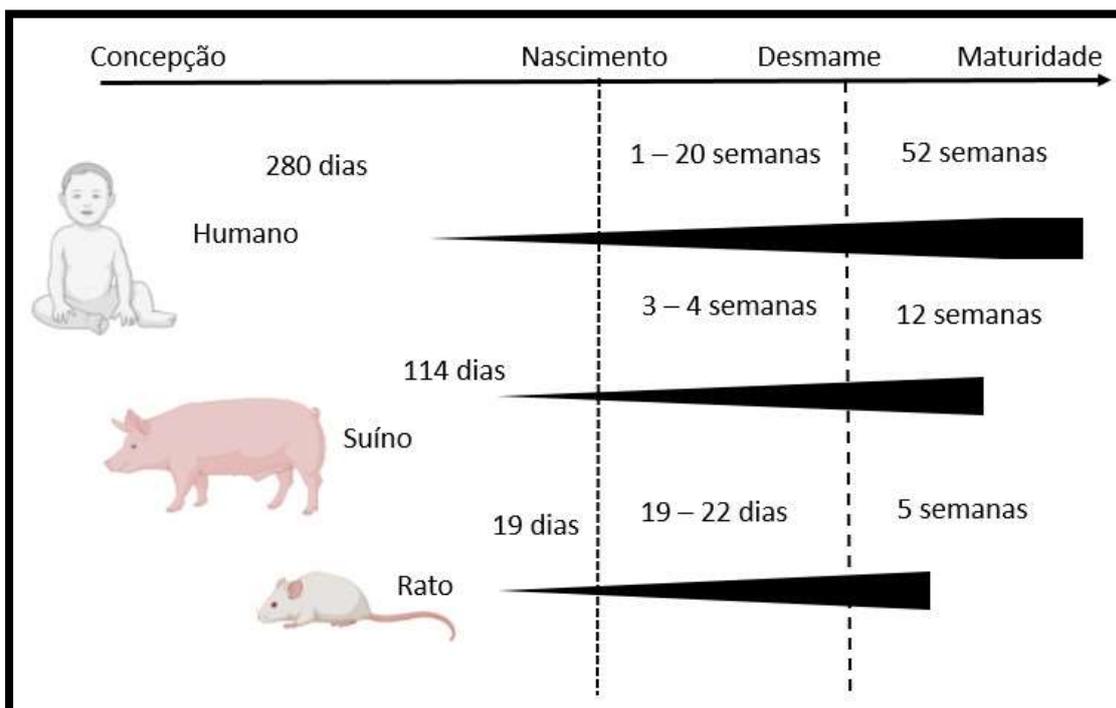


Figura 4: Progressão da maturação gastrointestinal em três espécies. Adaptado de Sangild, 2001.

2.5. Consequências do RIUC no desenvolvimento intestinal

Durante a fase pré-natal, o desenvolvimento do intestino depende consideravelmente da composição de nutrientes e substâncias bioativas que serão

transferidas através da placenta. Ainda, o desenvolvimento do sistema gastrintestinal nos mamíferos é pré-programado, mas o programa pode ser aumentado ou diminuído durante o crescimento intrauterino até o nascimento (Zabielski et al., 2008).

A insuficiência uteroplacentária pode alterar drasticamente o desenvolvimento do intestino delgado, levando à atrofia e a absorção e utilização de nutrientes (Alvarenga et al., 2013). Neonatos acometidos por esta condição apresentaram menor peso e comprimento deste órgão, além da menor expressão de receptor de hormônio de crescimento (GH) na mucosa (Wang et al., 2005).

A RIUC está associada ao comprometimento da integridade da mucosa intestinal e por consequência, a prejuízos na colonização da microbiota (Li et al., 2018). Recém-nascidos acometidos por esta condição apresentaram redução e imaturidade dos enterócitos, lesões em microvilosidades e redução da área absorptiva, além de menor expressão de importantes proteínas de junções celulares (Ferenc, et al., 2017; Désir Vigne, et al., 2018). Estudos ainda constataram menor espessura da mucosa e cripta, menor relação vilosidades / criptas e redução da atividade enzimática deste órgão (Mickiewicz, 2012).

Em neonatos de RIUC suínos ou humanos, a atividade enzimática de uma ampla variedade de enzimas pancreáticas e intestinais foram menores do que em indivíduos com peso normal, e foram associados com a redução do peso dos tecidos gastrointestinais (Hedeman, et al., 2011). Os níveis de quimiotripsina, lipase pancreática e a tripsina também foram diminuídos, além de estarem negativamente correlacionadas com o grau de RIUC (Seetharam, 1977).

Descobertas anteriores indicam que em suínos, a RIUC perturba não apenas as propriedades absorptivas mas afeta a composição e os produtos secretórios da superfície epitelial intestinal ao longo da vida, atrasando a maturação imunológica deste órgão. Por exemplo, após o desmame, leitões acometidos por RIUC aumentaram a expressão dos

precursores inflamatórios IL-1 β , TNF- α e INF- γ , IL-6, IL-22, e Toll-like 2 em comparação com irmãos nascidos com peso normal (Zhang, 2018).

Em conjunto, tais implicam na limitação dos processos imunológicos e digestivos nutrientes e pode aumentar a predisposição a intolerância alimentar e doenças metabólicas e intestinais como a enterocolite necrosante e doença de Crohn (Guyton e Hall, 2006). Especula-se, ainda, que as alterações morfofisiológicas e inflamatórias do intestino delgado seja um dos principais contribuintes para a maior mortalidade observadas em leitões nascidos com baixo peso, assim como para a redução das taxas de crescimento na vida pós-natal em suínos (Wang et al., 2005).

2.6. O suíno como modelo experimental de RIUC

Estudos que investigam a maturação imune e metabólica intestinal desde o nascimento até a fase adulta em humanos são limitados devido a restrições éticas. Embora alguns roedores tenham sido utilizados como modelo para estudar a RIUC, as diferenças filogenéticas e metabólicas podem comprometer a transposição dos resultados para a fisiologia humana (Etuk, 2010). Nesse sentido, os suínos, são considerados modelos experimentais ideais para extrapolar os resultados para os humanos, devido às semelhanças anatômicas, metabólicas e comportamentais.

Desde a última década, a taxa de leitões que nascem com baixo peso e que evidências apontam a RCIU como causa, aumentou expressivamente, subindo de 6% para 30%. Neste sentido, a viabilidade do uso dos suínos como modelo para o estudo da RCIU ainda pode ser destacada pela ocorrência espontânea e grave nesta espécie (Etuk, 2010). Este fato coincidiu com a pressão de estudos de melhoramento genético focados no desenvolvimento de fêmeas matrizes com altas taxas de ovulação, o que resultou em uma superlotação intrauterina e conseqüente limitação de crescimento de um número significativo de conceptos por ninhada (Ferenc et al., 2014).

Em suínos, fatores como a eficiência de fixação da placenta, a vascularização adequada e a ocupação do espaço uterino também contribuem para o crescimento fetal e manutenção da gestação (Sangild et al., 2001). Nestes animais, insultos na vida intrauterina são responsáveis pela alta mortalidade perinatal, menor crescimento pós-natal e comprometimento das características de carcaça (Alvarenga et al., 2013).

O baixo peso corporal de um leitão acometido por RIUC permanece ao longo da vida, não sendo ajustado pelo ganho de peso compensatório (Felicioni et al., 2020). Ainda, frequentemente, apresentam atraso no crescimento e maior susceptibilidade a doenças inflamatórias e intestinais, e acredita-se ser consequência de defeitos da imunidade e digestão, duas importantes vias biológicas. No entanto, ainda não existem dados que apontam a associação da RIUC sobre a resposta imune e composição da microbiota intestinal neste modelo animal, muito menos sua cinética ao longo de diferentes fases de desenvolvimento pós natal.

2.7. Implicações da RIUC na suinocultura

O melhoramento genético e estratégias nutricionais têm sido usadas para melhorar o desempenho produtivo dos suínos, mas ainda existem muitos desafios no campo que prejudicam o desempenho ideal dos animais. Por exemplo, o baixo peso ao nascimento pode atingir aproximadamente 30% da ninhada, sendo considerada a principal causa da redução da sobrevivência neonatal, incluindo o atraso do crescimento pós-natal (Su et al., 2007; D’Inca et al., 2010). Em suínos, a principal causa do baixo peso é a restrição de crescimento intrauterino (RIUC), condição em que o feto não atinge o potencial de crescimento (Alvarenga et al., 2014) devido à competição por recursos limitados (Engelsmann et al., 2019).

Esta situação dificulta a adaptação à vida extrauterina e contribui para o baixo peso permanente e o desenvolvimento de doenças entéricas, aumentando a intensidade de medicação e os custos associados (Attig et al., 2013). Neste sentido, a fim de maximizar o crescimento desses animais, a demanda nutricional tem sido elevada em todas as fases de crescimento (Helke et al., 2015), porém ainda é necessário ampliar o conhecimento sobre a capacidade digestiva e absorptiva do intestino delgado de leitões RIUC do início ao fim do ciclo de produção (Alvarenga et al., 2013).

A expressão do potencial máximo de crescimento dos animais depende em grande parte da saúde do epitélio intestinal, tecido envolvido nos processos de digestão, absorção e em respostas imunes locais e sistêmicas (Mayer et al., 2017; Li et al., 2018). Porém, o ambiente intrauterino pode programar o desenvolvimento intestinal, de modo que distúrbios nessa fase podem comprometer sua função e nem sempre ser corrigidos na vida pós-natal (Meyer e Caton, 2016).

A estrutura morfológica e as atividades das enzimas da borda em escova do intestino delgado têm sido usadas como indicadores importantes de maturação e capacidade digestiva em porcos (Dong et al., 2014; Su et al., 2018). Quando o intestino responde a um agente, pode haver um desequilíbrio na relação de extrusão e proliferação, modificando esses parâmetros, com impacto direto na área de absorção e atividade enzimática (Wang et al., 2018).

Uma evidência crescente revelou que porcos RIUC recém-nascidos e desmamados têm atrofia nas vilosidades e hiperplasia de criptas, maturação tardia da mucosa intestinal, bem como diminuição da motilidade intestinal e digestão e absorção de colostro e leite (Ferenc et al., 2017). Entretanto, ainda é controverso se esses sinais permanecem nas fases de crescimento e engorda, períodos em que o uso de nutrientes deve ser máximo. Tal

conhecimento poderia contribuir para a implantação de suporte nutricional para leitões que nasceram mais leves, a fim de melhorar a produtividade do setor.

3.0. HIPÓTESE:

A RIUC compromete a sincronia entre a morfofisiologia intestinal e a adiposidade, predispondo a doenças metabólicas e distúrbios gastrintestinais.

4.0. OBJETIVOS:

4.1. Geral:

Avaliar as características morfofuncionais e inflamatórias no intestino delgado bem como o perfil metabólico durante o desenvolvimento pós-natal em suínos acometidos ou não por RIUC.

4.2. Específicos:

Sempre comparando animais de peso normal ao nascimento (PN) a animais acometidos por restrição intrauterina de crescimento (RIUC) ao nascimento, 26 dias, 65 e 150 dias, os objetivos específicos foram:

- Avaliar o crescimento corporal por meio das seguintes medidas biométricas: peso corporal, ganho de peso médio diário, comprimento cabeça cauda, diâmetro biparietal, circunferência abdominal, circunferência torácica, altura do ombro, altura do tórax; taxa de crescimento fracionário (TCF), índice de massa corporal, índice de massa ponderal e índice de adiposidade corporal;
- Avaliar o peso absoluto e o peso relativo de determinado órgãos (intestino delgado, coração e fígado);
- Determinar os perfis glicêmico e lipídico por meio de medidas séricas de glicose, colesterol total, HDL, LDL e triglicérides;
- Avaliar características histomorfométricas do tecido adiposo visceral e subcutâneo;
- Avaliar a histomorfometria do intestino delgado duodeno e jejuno;

- Localizar e quantificar, proteínas envolvidas nos mecanismos de apoptose (Caspase -3) e proliferação celular (ki67) no intestino delgado;
- Quantificar a atividade enzimática específica de lactase, tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase no duodeno e jejuno;
- Avaliar a expressão de genes pró-inflamatórios IL-1, IL-6, CCL2, CXCL8, TNF- α e TLR-4 no duodeno

5.0. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Locais e instalações

O experimento foi conduzido em uma granja comercial de suínos (Fazenda São Paulo), localizada na cidade de Oliveira, Minas Gerais, no período de janeiro a junho de 2018. A granja de Suínos da Fazenda São Paulo, conta com 4.500 matrizes e caracteriza-se por adotar três unidades de produção, desenvolvidas para atender os manejos e exigências nutricionais de cada fase de desenvolvimento. Na primeira unidade, os leitões se alojam até o desmame, que ocorre aproximadamente em 24 dias. Os leitões desmamados são transferidos para a segunda unidade, até atingirem 65 dias de idade média e são posteriormente alocados para a terceira unidade, onde passam pelos setores de recria, até os 105 dias e pela terminação, quando são vendidos / abatidos com cerca de 150 dias de idade.

5.2. Animais e design experimental

Cento e vinte pares de leitões recém-nascidos machos (Landrace \times Large White) irmãos de mesma ninhada, nascidos de porcas multíparas (3-6 partos) e de ninhadas de 15 a 22 leitões foram selecionados imediatamente após o nascimento. Estes critérios são consistentes com a hipótese de que o pico de ovulação associado ao alto número de leitões por leitegada aumenta a possibilidade de lotação intrauterina e consequente ocorrência de

RIUC (Alvarenga et al.,2013; Felicioni et al., 2019, Felicioni et al., 2020). De cada leitegada foram selecionados no máximo dois leitões de cada tratamento: 2 leitões de peso normal (PN) e 2 leitões acometidos por restrição de crescimento intrauterina (RIUC).

Antes da ingestão do colostro, 120 pares de leitões selecionados foram divididos em duas categorias de acordo com o peso ao nascer: peso normal (PN: entre 1.6 e 1.9 kg; n = 120) e RIUC (peso entre 0.7 e 1.0 kg; N = 120). Para definir estas faixas de peso, antes de iniciar o período experimental, 1000 leitões da mesma linhagem genética foram previamente pesados para cálculo de sua média e desvio-padrão ($\mu = 1,3$; $\sigma = 0,3$). A faixa de peso definida para o grupo PN deu-se por meio do cálculo: $\mu + \sigma$ a $\mu + 2\sigma$ e para o grupo RIUC por meio de: $\mu - \sigma$ a $\mu - 2\sigma$, de acordo com trabalhos anteriores (Alvarenga, et al., 2013; Felicioni, et al., 2019, Felicioni et al., 2020). Os procedimentos de parto e manejo dos leitões (secagem, corte do umbigo e aplicação de ferro injetável) foram os mesmos adotados na rotina da granja.

Os leitões selecionados foram desmamados aos 24 dias e transferidos para a 2ª unidade (creche), com acesso *ad libitum* a água e dieta padrão da fase pós-desmame. Dentro do mesmo grupo experimental, os leitões foram alocados em 3 baias com aproximadamente 40 animais / baia, até atingirem 65 dias, de forma que os animais de cada baia permaneceram juntos nas etapas subsequentes de produção. Na terceira unidade, a dieta foi ajustada para a fase de recria até atingirem os 105 dias médios e novamente ajustada no setor de terminação até os animais atingirem em torno de 150 dias de idade.

5.3. Procedimentos da eutanásia

Um subgrupo de animais PN e RIUC foram eutanasiados nas seguintes idades:

- a) Ao nascimento (N = 20, sendo 10 PN e 10 RIUC);
- b) 26 dias (48h pós desmame; N = 20, sendo 10 PN e 10 RIUC);
- c) 65 dias (saída de creche; N = 20, sendo 10 PN e 10 RIUC);

d) 150 dias (terminação; N = 20, sendo 10 PN e 10 RIUC).

A escolha destas faixas etárias foi com base na maturação fisiológica e nas mudanças dietéticas que ocorre entre o nascimento até os 150 dias de idade em suínos. Assim, o grupo de leitões recém-nascidos reflete a função placentária, enquanto o grupo com 26 dias é representativo da fisiologia do recém-desmamado. Aos 65 dias de idade podem representar a fisiologia infantil, baseada em uma dieta a base de produtos lácteos, enquanto aos 150 dias, os suínos podem ser comparados a um pré-adolescente e reflete a maturidade intestinal.

Em todas as idades mencionadas, os animais foram insensibilizados por atordoamento elétrico e eutanasiados por exsanguinação após jejum noturno (exceto o recém-nascido, que não amamentou). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 2016/342; Anexo 1).

5.4. Medidas biométricas

Para acompanhar o crescimento dos demais animais, aferiu-se o peso corporal e os comprimentos (Figura 5): diâmetro biparietal, comprimento cabeça-cauda, altura do ombro, circunferência torácica e circunferência abdominal e circunferência do tronco, (Kogelman, et al., 2013), nas seguintes idades:

a) Ao nascimento (N = 240, sendo 120 PN e 120 RIUC);

b) 26 dias (N = 220, sendo 115 PN e 105 RIUC);

c) 65 dias (N = 206, sendo 108 PN e 98 RIUC);

d) 150 dias (N = 182, sendo 99 PN e 83 RIUC).

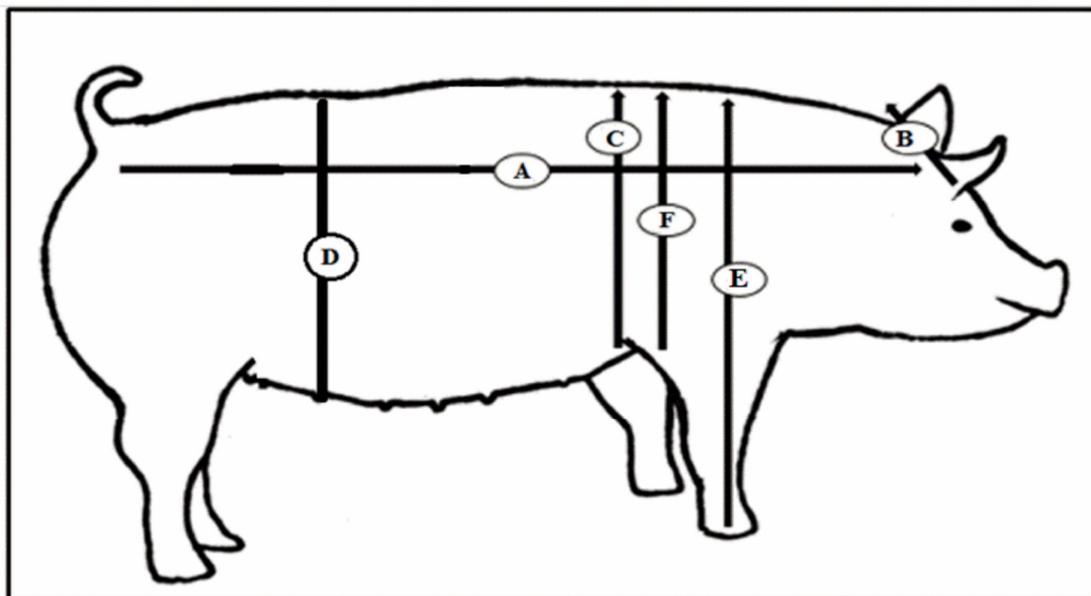


Figura 5: Representação esquemática de medidas biométricas aferidas em suínos, que incluem: (A) comprimento cabeça-cauda, (B) diâmetro biparietal, (C) circunferência torácica, (D) circunferência abdominal, (F) altura do ombro, (G) altura do tórax. Adaptado de Kogelman et al (2013).

Além das medidas acima, o peso corporal foi aferido nas respectivas idades para o cálculo do ganho de peso médio diário em cada fase experimental (GPD), por meio da fórmula:

$$D: \frac{\text{Peso final (kg)} - \text{Peso inicial (kg)}}{\text{número de dias}}$$

5.5. Índices de adiposidade corporal

Considerando que o padrão de distribuição da gordura corporal é um fator determinante para caracterizar o perfil metabólico, os seguintes parâmetros foram calculados em todos os animais:

- a) Relação entre a circunferência abdominal e peso corporal (CA);
- b) Índice de massa corporal (IMC);
- c) Índice de massa ponderal (IMP);

d) Índice de adiposidade corporal (IAC).

Para a adequação destes índices para a espécie suína, o parâmetro “altura”, utilizada nos referidos cálculos em seres humanos, foi substituída pelo “comprimento cabeça-cauda”, conforme descrito por Baxter, et al. (2008):

$$\frac{\text{Peso}}{\text{comprimento cabeça – cauda}^2}$$

$$\frac{\text{Peso}}{\text{comprimento cabeça – cauda}^3}$$

$$\frac{\text{circunferência abdominal}}{\text{comprimento cabeça – cauda}^{1.5}}$$

A fim de confirmar a ocorrência de crescimento *catch-up* nos animais, a taxa de crescimento fracional (Xing et al., 2019) foi determinada entre os períodos: nascimento e 26 dias; 26 dias e 65 dias e entre 65 e 150 dias, por meio da fórmula:

$$\frac{\text{Peso atual – Peso anterior}}{\text{Peso anterior}} \cdot 100$$

5.6. Coleta e processamento de amostras

5.6.1. Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas no momento da exsanguinação em tubos contendo heparina sódica e imediatamente acondicionadas em gelo até o processamento das mesmas. O material foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e o plasma isolado, aliquotado e armazenado a -20°C para as análises do perfil glicêmico e lipídico.

5.6.2. Coleta e processamento de tecido adiposo

Após a eutanásia, fragmentos dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo foram seccionados da região perirenal e entre a 12^a e 13^a costela respectivamente. Aproximadamente 2 cm de comprimento de cada tecido foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em 24 horas e armazenadas em tampão fosfato de sódio 0.05 M para posterior processamento histológico.

5.6.3. Coleta e processamento do intestino delgado

O intestino delgado foi retirado do piloro (junção estômago-duodenal) até a válvula ileocecal e o conteúdo luminal foi lavado com solução salina antes da mensuração do comprimento com auxílio de fita métrica. Fragmentos do duodeno e jejuno foram coletados do meio de flexão cranial e jejuno, respectivamente, e submetidos a diferentes etapas de processamento. Aproximadamente 2 cm de comprimento de cada tecido foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas e subsequente armazenados a 4° C em tampão fosfato de sódio a 0.05 M para posterior estudo histológico e por imunofluorescência.

Para a determinação das atividades enzimáticas da lactase, amilase, lipase, quimiotripsina e tripsina, fragmentos de duodeno e jejuno de aproximadamente 2 cm foram congeladas em nitrogênio líquido no momento da coleta e armazenados em freezer -80 °C. Para a preparação do extrato bruto, 100 mg de tecido foram homogeneizados em homogeneizador do tipo Turrax, utilizando solução salina tamponada com fosfato 0,01 M (NaCl 0,138 M; KCl - 0,0027 M; pH 7,4) na proporção de 1: 10 (peso: volume). Após centrifugação a 15.000g por 15 minutos sob refrigeração a 4° C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20° C para análise posterior.

Para o estudo molecular, fragmentos do duodeno e jejuno foram mantidos em eppendorfs contendo solução de RNAlater® (Sigma-Aldrich - R0901) por 24 horas à 8 ° C e posteriormente armazenadas à 20 ° C até a extração do mRNA.

5.7. Análise do perfil glicêmico e lipídico

Considerando que alterações do perfil lipídico e glicêmico podem potencializar os eventos clínicos de doenças cardiovasculares e obesidade, o nível plasmático de glicose, colesterol, HDL, LDL e triglicérides, foram determinados por método fotolorimétrico usando Kits comerciais da Bioclin®.

5.8. Análises histomorfométricas

A fim de identificar se a RIUC altera características estruturais do intestino delgado e do tecido adiposo, os seguintes procedimentos foram realizados:

5.8.1. Preparação das amostras

Amostras de duodeno, jejuno, tecido adiposo visceral e subcutâneo de todas as idades em cada grupo experimental (N = 5 PN e 5 RIUC), foram submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool (65%, 80%, 90%, absoluto I e absoluto II) a posteriormente a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada e inclusão em paraplant.

Os blocos contendo os fragmentos de intestino delgado foram submetidos à microtomia (5µm) e coradas por meio de duas técnicas, de acordo com protocolo padrão:

- a) Hematoxilina-Eosina (HE) para aferições morfométricas e análise patológica;
- b) Ácido periódico de Schiff (PAS) para contagem de células caliciformes.

Os blocos contendo os fragmentos de tecido adiposo foram seccionados a 8µm de espessura e coradas em HE para as aferições histomorfométricas.

5.8.2. Avaliação histomorfométrica do tecido adiposo visceral e subcutâneo

Os estudos histológicos foram realizados em imagens digitais obtidas em fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com câmera digital Q-Color 3 (Olympus). Utilizando o programa Image-Pro Express (Media Cybernetics), 10 áreas foram selecionadas aleatoriamente a partir das imagens digitais e foram determinados o diâmetro dos adipócitos na área selecionada pelo cálculo do diâmetro de Feret (Figura 6) e o número de adipócitos por área (mm^2). Em nosso estudo piloto, verificamos que os tamanhos dos adipócitos eram muito variáveis, portanto, determinou-se 2 escores de diâmetros de adipócitos, sendo o primeiro, considerado adipócitos entre 30-50 μm e o segundo entre 70-120 μm (Saar et al., 2014).

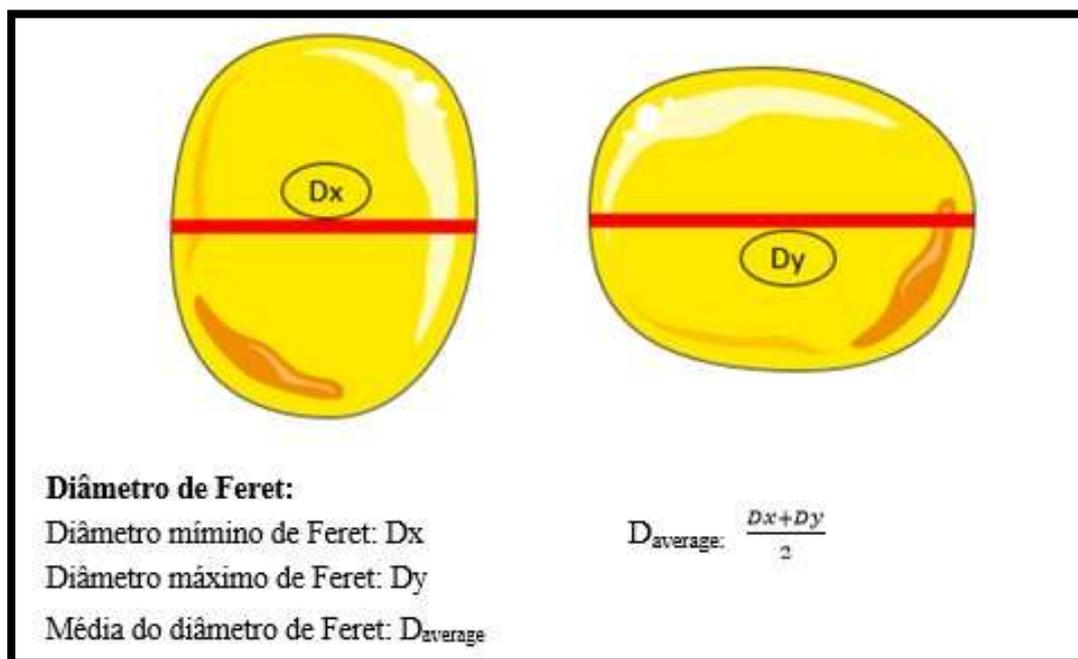


Figura 6: Desenho esquemático do cálculo do diâmetro do adipócito visceral e subcutâneo.

5.8.3. Avaliação histomorfométrica do duodeno e jejuno

Sessões histológicas de 5 micrometros de espessura foram obtidas dos fragmentos de duodeno e jejuno e coradas por meio de HE e PAS.

Cortes histológicos correspondentes a 10 animais por idade (N= 5 PN e 5= RIUC) foram avaliados em microscópio de luz (Olympus BX51), e as medidas realizadas em régua encaixada em ocular de 10x, calibrada com régua micrométrica. Um total de 30 unidades cripta-vilos intactas e bem orientadas do duodeno e jejuno foram selecionadas aleatoriamente para medições dos seguintes parâmetros, de acordo com estudos anteriores (Alvarenga et al., 2013): (1) altura da mucosa, da muscular da mucosa até o ápice das vilosidades; (2) altura da vilosidade, desde a base até o ápice da vilosidade; (3) altura do enterócitos, desde a base até seu ápice; (4) profundidade da cripta intestinal, da mucosa até a base da vilosidade e (5) largura da vilosidade e (6) cripta (Figura 7). Foi determinada a relação entre vilosidades e cripta intestinal, área de superfície das vilosidades (S) e área de absorção intestinal (AA), utilizando as fórmulas descritas por Dong et al. (2016) e Kisielensky et al. (2002) respectivamente:

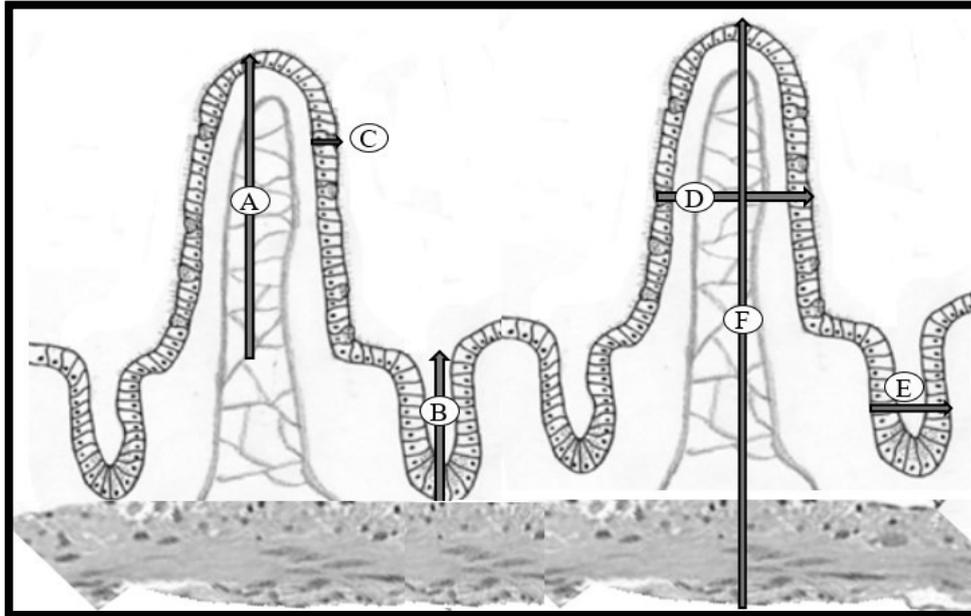


Figura 7: Parâmetros histológicos analisados no intestino delgado dos suínos em ambos os grupos e em todas as idades: (A) altura das vilosidades, (B) profundidade da cripta, (C) altura dos enterócitos, (D) largura da vilosidade, (E) diâmetro da cripta, (F) altura da mucosa.

Para quantificar as células caliciformes por área de cripta, cortes de duodeno e jejuno foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS). Os estudos histológicos foram realizados em imagens digitais obtidas em fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com câmera digital Q-Color 3 (Olympus). Utilizando o programa Image-Pro Express (Media Cybernetics), 10 áreas foram selecionadas aleatoriamente a partir das imagens digitais e foram determinados o número de células caliciformes por área de cripta (mm^2).

5.9. Expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e apoptose por meio de imunofluorescência (IF)

As secções do duodeno, anteriormente incluídas em paraplast foram seccionadas a $5\mu\text{m}$ de espessura, inseridas em lâminas silanizadas e desparafinadas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool. Para recuperação do epítipo das proteínas alvos, as lâminas foram inseridas em tampão citrato de 0,1 M (pH 6,0) e submetidas ao calor em microondas por 5 minutos durante 3 vezes. Após o resfriamento à temperatura ambiente,

as lâminas foram enxaguadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. Para reduzir a ligação não específica, as seções foram incubadas em albumina de soro bovino a 3% (Sigma-Aldrich) em solução tampão Tris-HCl (TBS, pH 7,3) por 90 min a 4 ° C.

A fim de determinar se o RIUC tem efeitos sobre a atividade proliferativa e apoptótica do epitélio duodenal, todas as amostras foram incubadas durante a noite a 4 ° C com os anticorpos primários anti-KI67 (IgG1; 1: 200; ThermoFisher) e anti-Caspase 3 (IgG1; 1: 600; ThermoFisher), separadamente. Os controles negativos para as reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Após a lavagem, o anticorpo secundário Alexa Fluor 555 (IgG, ThermoFisher, A-21422) foi inserido, na proporção de 1: 200 (anticorpo: TBS) e incubado por 90 min a 4 ° C. Finalmente, os núcleos foram corados com DAPI (Sigma-Aldrich) na proporção 1: 1000 (DAPI: TBS) e as lâminas foram montadas com glicerol 50% (v / v em TBS).

As imagens de imunolocalização foram adquiridas usando um microscópio Zeiss Apotome (Carl Zeiss) equipado com filtros adequados para detectar sinais Alexa Fluor 555. Para o estudo da proliferação celular, para cada animal (N = 5) foram obtidas 10 regiões aleatórias de criptas intestinais com aumento de 200 vezes. Todas as células positivas nas áreas de cripta foram quantificadas usando o software Image-Pro Express (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) e os valores expressos como número de células imunocoradas por mm².

A análise da imunolocalização de caspase-3 foi realizada pelo cálculo da intensidade de fluorescência (Caldeira-Brant, et al., 2020). Antes das medições, o software Image J (NIH) foi equalizado considerando um branco conhecido como 100% e preto como 0%. Para cada animal (n = 5) 10 regiões aleatórias das vilosidades intestinais com aumento de 200 vezes

foram delineadas e o valor da intensidade de fluorescência foi quantificado. Os valores foram expressos como % média da intensidade de fluorescência.

5.10. Expressão relativa de genes pró-inflamatórios por PCR quantitativo em tempo real

Para compreender os mecanismos moleculares que regulam os eventos inflamatórios no duodeno do suíno durante seu desenvolvimento pós-natal, a expressão relativa dos genes pró-inflamatórios foi quantificada por PCR quantitativo em tempo real.

O RNA celular total foi purificado a partir de 30 mg de tecido duodenal de cada amostra, usando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Itália), de acordo com as diretrizes do protocolo. Logo após a extração, a concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e as amostras foram mantidas a -80° C em 100 µl de Água Nuclease-Free. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado por transcriptase reversa usando o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Itália), a partir de oligo d (T) e primers aleatórios.

O conjunto de primers e sondas de hidrólise usados para determinar a expressão dos genes foram obtidos de relatórios anteriores (Tabela 1). As sondas de hidrólise foram marcadas com 6-carboxi-fluoresceína (FAM) na extremidade 5' e o Hole Quencher (BHQ1 ou BHQ2) na extremidade 3'. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada com o Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). O volume total de 20 µL por amostra continha 500 nM de cada iniciador, 100 nM de cada sonda específica, 1 × sonda do ciclador de luz Master (Roche) e 5 de L de cDNA.

As reações foram realizadas em máquina de PCR 7900 em tempo real (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições de termociclagem: uma etapa inicial de desnaturação (95 ° C, 10 min), seguida de 50 ciclos de 95 ° C por 10 s (desnaturação), 60 ° C por 30 s (recozimento) e 72 ° C por 30 s (extensão).

As reações foram realizadas em duplicata, sendo o gene -actina escolhido como o gene de referência. A análise da expressão relativa do gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os resultados foram expressos de duas formas: pela comparação da expressão entre os grupos e entre cada idade, separadamente em cada grupo. Neste último caso, comparou-se a expressão entre as idades: recém-nascidos e desmame, entre desmame e 65 dias e entre 65 dias e 150 dias.

Tabela 2- Oligonucleotídeos usados na análise de expressão gênica por qPCR

Genes	Sence	Sequências 3' 5'	Produto	Referência
IL-1	F	ACAGAAGTGAAGATGGCCAAAGTC	385 pb	Gil et al. 2002.
	R	TCATGTTGCTCTGGAAGCTGTATG		
IL-6	F	CTGGCAGAAAACAACCTGAACC	94 pb	Duvigneau et al., 2005.
	R	TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC		
CXCL8	F	TTCGATGCCAGTGCATAAATA	176 pb	Arce et al., 2010.
	R	CTGTACAACCTTCTGCACCCA		
TLR4	F	GCCATCGCTGCTAACATCATC	108 pb	Frandonoso et al., 2013.
	R	CTCATACTCAAAGATACACCATCGG		
TNF- α	F	GCCCTGGTACGAACCCATCTA	91 pb	Arce et al., 2010.
	R	CAGATAGTCGGGCAGGTTGATCTC		
CCL2	F	ACCAGCAGCAAGTGTCTAAAG	92 pb	Arce et al., 2010.
	R	TCCTGGACCCACTTCTGCTT		
B-actin	F	CTCGATCATGAAGTGCACGT	114 pb	Duvigneau et al., 2005.
	R	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC		

F: Forward, R: Reverse.

5.11. Determinação da atividade específica de enzimas intestinais

A atividade específica de lactase, amilase, lipase, tripsina e quimiotripsina foram mensuradas em amostras de duodeno e jejuno totalizando 20 animais por idade (10 = normais e 10 = RIUC). Para todas as amostras avaliadas, a quantidade total de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (ref. A7638, Sigma Chemical, St. Louis, MO) como proteína padrão. Portanto, a atividade específica para cada enzima foi calculada como: atividade enzimática / proteína total. Para traçar a curva padrão, a partir da qual foram calculadas as concentrações da amostra, por

interpolação gráfica, foram utilizadas soluções de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3.125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (BSA: água).

A atividade da lactase foi medida por um método colorimétrico usando O-nitrofenil B-D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato (Leksmono, et al., 2018). ONPG promove a hidrólise da lactase, produzindo D-galactose e orto-nitrofenol. Este último produto absorve luz no comprimento de onda de 420 nm, em temperatura de 37 ° C.

A atividade quimiotripsina foi medida pelo método Hummel (1959), no qual a taxa de hidrólise do substrato N-Benzoil-L-tirosina etil éster (BTEE, Sigma) foi medida a 256 nm de absorbância a 37 C. A atividade da tripsina foi determinada utilizando Na α benzoil- DL-arginina 4-nitroanilida hidrocloreto (BAPNA, Sigma Chemical) como substrato de acordo com o método de Erlanger (1961), em leitura a 410 nm de absorbância a 37 C.

A atividade da lipase foi determinada de acordo com o protocolo de um kit comercial (Analisa Gold). Neste método, a lipase (presente na amostra) hidrolisa o substrato Tributirato de 2,3 dimercaptopropanol (presente no kit) com as absorbâncias das amostras sendo lidas a 412 nm a 37 C. Para a determinação da atividade da amilase, utilizou-se um kit comercial (Analisa Gold), que tem como princípio o método de Caraway modificado. O kit é baseado na hidrólise do substrato amido solúvel (presente no kit) pela amilase (presente na amostra), que após a adição da solução de iodo ocorre a formação de uma coloração azul com o amido não hidrolisado do substrato, sendo lido a 620 nm de absorbância a 37 C.

5.12. Análise estatística

Todas as variáveis medidas foram testadas quanto à normalidade antes da análise, usando o procedimento univariado do software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc. 2003). Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (grupos de peso ao nascer), com um animal por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste T de

Student. Importantes associações entre parâmetros biométricos, histomorfométricos e inflamatórios foram avaliadas pela análise de correlação de Pearson. A expressão relativa de genes pró-inflamatórios, foram analisados usando a ferramenta de software de expressão relativa (REST 2009, QIAGEN). Considerou-se o nível de significância como $P < 0.05$.

6.0. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento pós-natal

As mudanças de peso corporal e o ganho médio diário ao final de cada estágio de produção estão resumidos na Tabela 3. Leitões RIUC apresentaram potencial de crescimento comprometido durante todos os estágios de desenvolvimento, demonstrado por baixos pesos corporais e piores ganhos de peso médio diário em comparação com seus irmãos PN ($P < 0.001$).

Tabela 3. Peso e ganho de peso médio diário (kg) de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal

Parâmetro	Tratamentos		s.e.m	P-valor
	Normal	RIUC		
Peso (kg)				
Nascimento	1.65	0.92	0.01	-
26 dias	6.60 ^a	4.80 ^b	0.11	<0.001
65 dias	25.00 ^a	18.50 ^b	0.04	<0.001
105 dias	62.60 ^a	53.50 ^b	1.00	<0.001
150 dias	105.80 ^a	89.82 ^b	1.30	<0.001
Ganho de peso médio diário (kg)				
Desmame	0.20 ^a	0.16 ^b	0.01	<0.001
26-65 dias	0.43 ^a	0.33 ^b	0.01	<0.001
65-105 dias	0.96 ^a	0.88 ^b	0.02	<0.001
105-150 dias	1.23 ^a	1.10 ^b	0.02	<0.001

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem ($P < 0.001$).

A Figura 8 apresenta os dados da taxa de crescimento fracionária (TCF). Embora em todas as idades os animais RIUC apresentassem a média de peso corporal inferior à dos animais PN (Figura 8A), a TCF demonstrou-se mais elevada no grupo RIUC em dois momentos: do nascimento ao desmame, e dos 65 dias à terminação, sugerindo um crescimento *catch-up* (Figura 8B). Contrariamente, houve uma queda acentuada da taxa de

crescimento dos leitões RIUC durante o período em que estiveram na unidade da creche (65 dias) enquanto a TCF dos animais do grupo PN praticamente não oscilou durante todos os períodos.

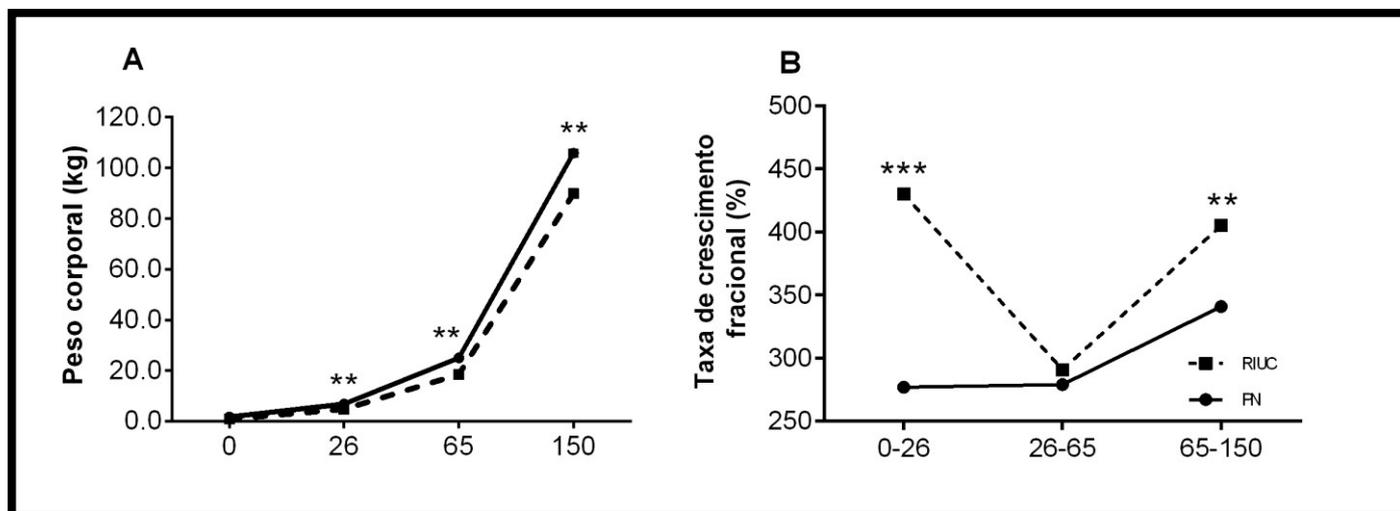


Figura 8: Ocorrência de crescimento *catch-up* em suínos RIUC durante o desenvolvimento pós-natal demonstrado pelo menor peso corporal (A) e ao mesmo tempo maior TCF (B) ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

6.2. Biometria dos órgãos

Os dados da Tabela 4 revelam que a proporção entre o peso do cérebro e o peso do fígado foi maior que 1 nos leitões RIUC ($P < 0.05$), confirmando a ocorrência desta condição neste grupo experimental (Alvarenga et al., 2013). O peso ao nascer foi positivamente correlacionado com o peso e comprimento do intestino delgado ($P < 0.05$; Tabela 7). Além disso, vísceras como o coração, intestino delgado e fígado nos animais recém-nascidos apresentaram um fenótipo típico de RIUC, sendo mais leves quando comparados aos dos animais PN. Interessantemente, constatou-se que, mesmo os leitões RIUC nascendo com os órgãos aproximadamente 50% menores que os leitões PN, aos 150 dias tal discrepância desapareceu, caracterizando uma recuperação do desenvolvimento daqueles órgãos.

Tabela 4- Peso e ganho de peso médio diário (kg) de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal

Parâmetros	Recém-nascido		26 dias		65 dias		150 dias	
	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC
Peso corporal (kg)	1.6 ± 0.01	0.9 ± 0.01	6.6 ± 0.10 ^a	4.8 ± 0.1 ^b	25.0 ± 0.04 ^a	18.5 ± 0.04 ^b	105.8 ± 1.3 ^a	89.8 ± 1.3 ^b
Fígado (kg)	0.05 ± 0.010 ^a	0.02 ± 0.001 ^b	0.14 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.91 ± 0.1 ^a	0.62 ± 0.2 ^b	1.84 ± 0.9 ^a	1.86 ± 0.9 ^a
Intestino delgado (kg)	0.05 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.2 ± 0.2 ^a	0.1 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.7 ^a	1.2 ± 0.7 ^b	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2
Intestino delgado (m)	4.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^b	7.2 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.2 ^b	15. ± 0.4 ^a	13.6 ± 0.4 ^b	18.5 ± 0.6	18.0 ± 0.5
Peso relativo - fígado (g/g)	3.2 ± 0.2	2.6 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.0 ± 0.4	3.3 ± 0.3	4.0 ± 0.3	1.6 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^b
Peso relativo - ID (g/g)	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.0 ± 0.4	5.0 ± 0.6 ^a	7.5 ± 0.6 ^b	2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2
C.R - ID (m/kg)	2.4 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.3 ^b	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.02 ^a	0.8 ± 0.1 ^b	0.16 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.01 ^b
Cérebro (g)	27.0 ± 0.4 ^a	24.0 ± 0.1 ^b	-	-	-	-	-	-
Razão Cérebro/fígado	0.55 ± 0.02 ^a	1.24 ± 0.10 ^b	-	-	-	-	-	-

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem ($P < 0.05$). ID: intestino delgado; C.R: comprimento relativo.

6.3. Medidas biométricas

Leitões recém-nascidos RIUC apresentaram comprometimento das seguintes medidas: menor comprimento cabeça-cauda, diâmetro biparietal, circunferência do tórax, circunferência abdominal e altura do ombro ($P < 0.001$) (Tabela 5). De modo semelhante, constatou-se que aos 65 dias, com exceção feita a altura do ombro, todos os demais parâmetros biométricos foram equivalentes entre os grupos experimentais, confirmando a recuperação do desenvolvimento corporal nesta fase.

Tabela 5 - Parâmetros biométricos de suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal

Parâmetro	Tratamento		s.e.m	P-valor
	PN	RIUC		
Comprimento cabeça-cauda (cm)				
Nascimento	30.01 ^a	25.01 ^b	0.01	<0.001
26 dias	43.07 ^a	41.07 ^b	0.50	<0.05
65 dias	72.30 ^a	71.00 ^a	1.00	NS
150 dias	109.65 ^a	110.20 ^a	1.30	NS
Diâmetro biparietal (cm)				
Nascimento	4.30 ^a	3.60 ^b	0.02	<0.001
26 dias	6.00 ^a	5.60 ^b	0.05	<0.001
65 dias	9.60 ^a	10.00 ^a	0.20	NS
150 dias	12.30 ^a	9.65 ^b	0.30	<0.001
Circunferência torácica (cm)				
Nascimento	27.65 ^a	22.20 ^b	0.01	<0.001
26 dias	42.00 ^a	40.00 ^a	0.50	NS
65 dias	63.60 ^a	64.20 ^a	1.00	NS
150 dias	101.40 ^a	107.80 ^a	2.40	NS
Circunferência abdominal (cm)				
Nascimento	27.60 ^a	22.20 ^b	0.10	<0.001
26 dias	43.65 ^a	42.40 ^a	0.60	NS
65 dias	73.00 ^a	71.40 ^a	0.80	NS
150 dias	111.00 ^a	103.00 ^a	0.20	<0.05
Altura do ombro (cm)				
Nascimento	8.20 ^a	6.90 ^b	0.30	<0.001
26 dias	14.00 ^a	12.00 ^b	0.30	<0.001
65 dias	27.00 ^a	24.40 ^b	0.40	<0.001
150 dias	38.65 ^a	34.00 ^b	0.90	<0.001
Altura do tórax (cm)				
Nascimento	22.60 ^a	18.00 ^b	0.10	<0.001
26 dias	29.50 ^a	28.00 ^b	0.40	<0.05
65 dias	43.00 ^a	42.00 ^a	0.50	NS
150 dias	66.30 ^a	68.00 ^a	1.00	NS

NS: não significativo.^{a b} Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem estatisticamente.

6.4. Adiposidade corporal

A figura 9A revela que a relação entre a circunferência abdominal e o peso corporal foi mais elevada no grupo RIUC ($P < 0.001$). Mesmo não sendo um parâmetro convencional para avaliação de índice de adiposidade, esta razão foi determinada, visto que os recém-nascidos com RIUC apresentavam aparente aumento de volume abdominal, o que não era observado nos animais PN.

Em relação aos outros parâmetros (9B, PC e 9D), enquanto o IAC foi menor em suínos RIUC apenas aos 65 dias (Figura 5B; $P < 0.05$), o IMC mostrou-se mais baixo em todas as idades (Figura 5C; $P < 0.05$) e o IMP foi inferior ao nascimento e 150 dias.

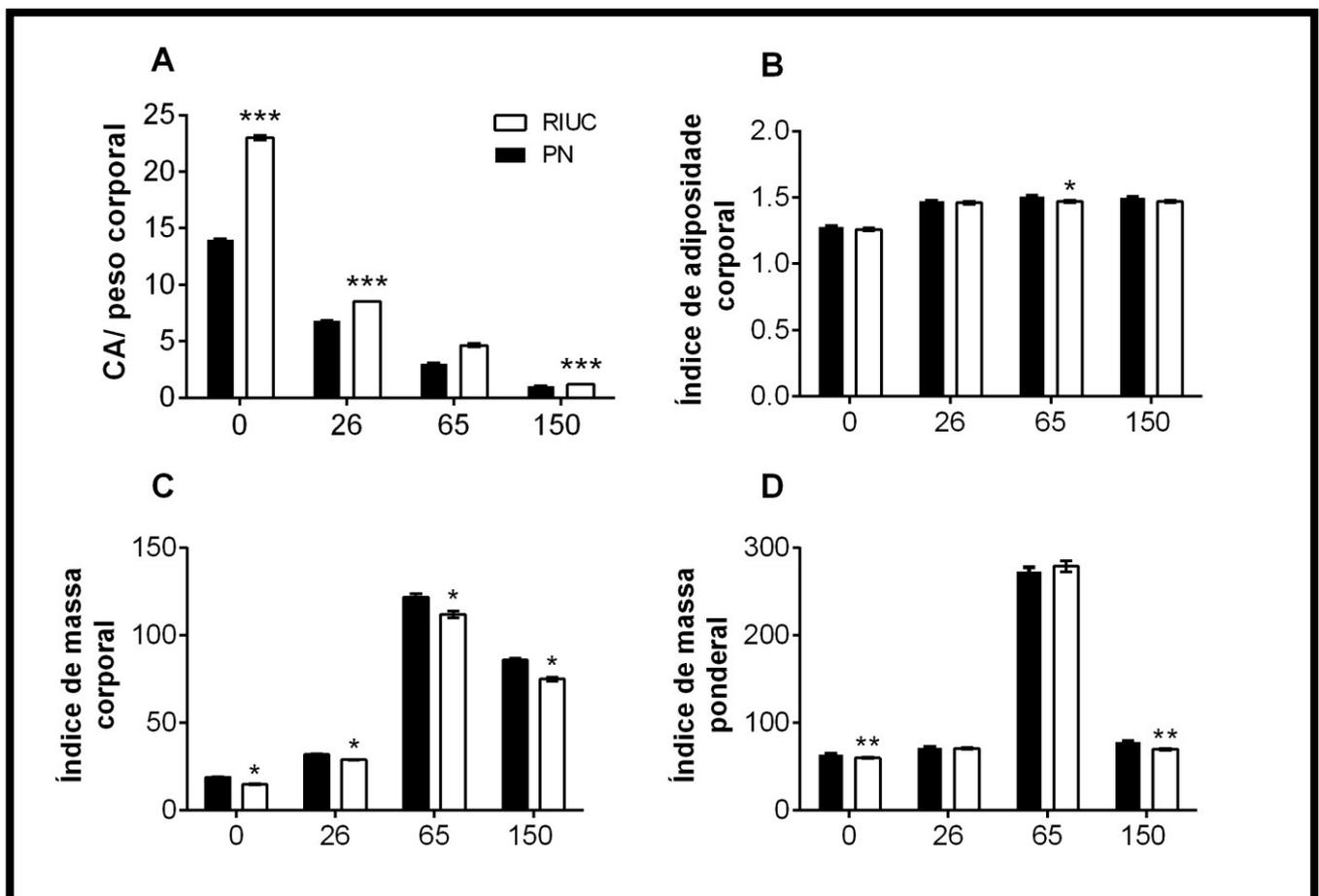


Figura 9: Índices biométricos para avaliação da adiposidade em suínos PN e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal. (A) Relação entre circunferência abdominal e peso corporal (CA); (B) Índice de adiposidade corporal; (C); Índice de massa corporal; (D) Índice de massa ponderal. *P < 0.05; **P < 0.01; *** P < 0.001.

6.5. Perfis glicêmico e lipídico

Em relação aos perfis glicêmico e lipídico, os resultados estão apresentados na figura 6. A glicose, HDL e triglicerídeos foram semelhantes entre ambos os grupos experimentais em todas as idades em todas as idades ($P > 0.05$). No entanto, os níveis de colesterol total, LDL e o índice de Castelli I foram significativamente mais elevados nos suínos RIUC aos 65 dias de idade ($P < 0.05$), caracterizando hipertrigliceridemia. Adicionalmente (Figura 10) correlações negativas foram observadas entre peso corporal e triglicerídeos ao desmame ($r = -0.26$, $P < 0.05$), colesterol aos 65 dias ($r = -0.56$, $P < 0.05$) e glicose aos 150 dias ($r = -0.59$, $P < 0.05$), de tal forma que quanto menor o peso corporal, maiores os níveis séricos destes parâmetros (Figura 11).

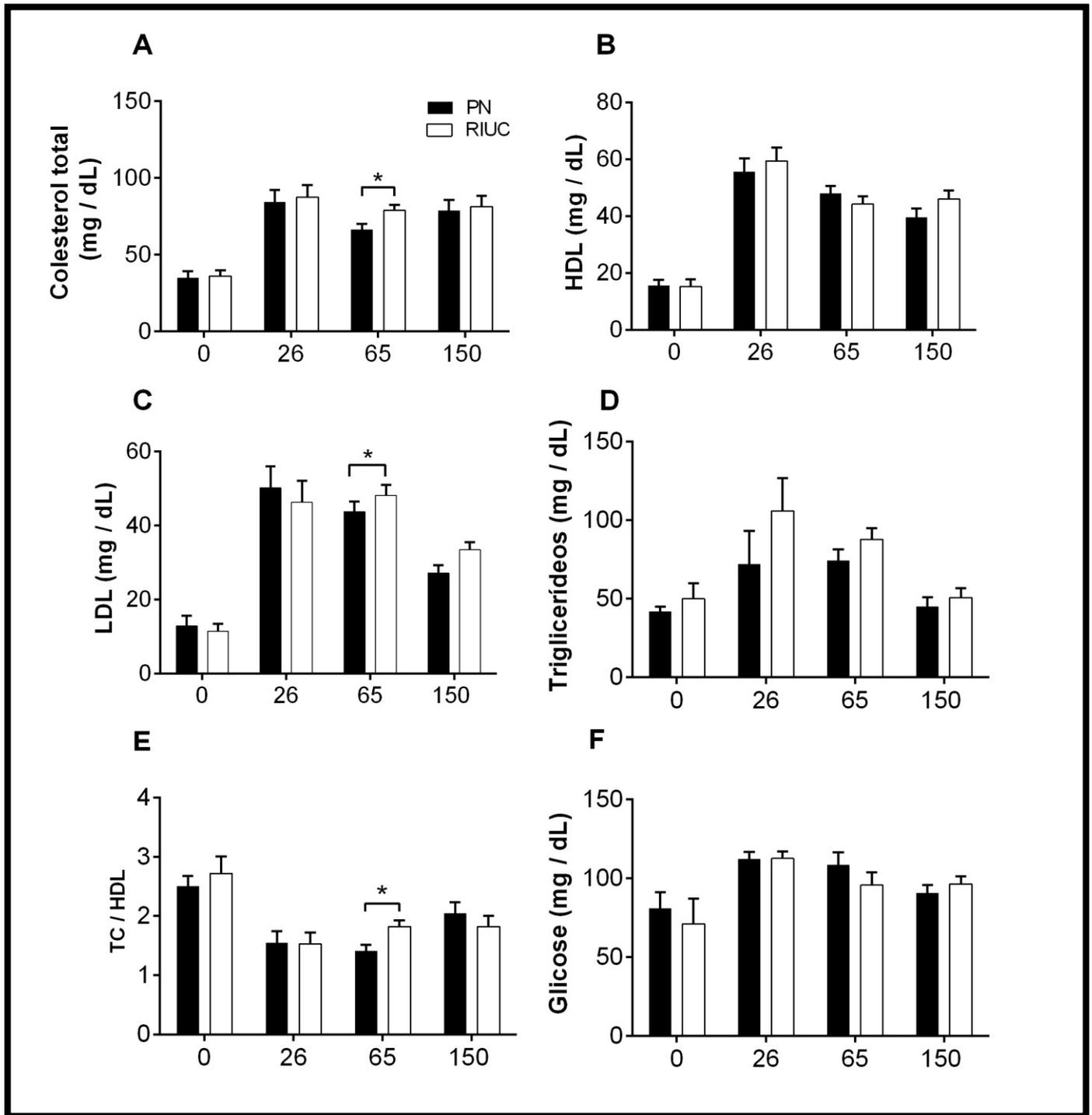


Figura 10: Perfil lipídico e glicêmico sérico de suínos normais e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal.
 * $P < 0.05$.

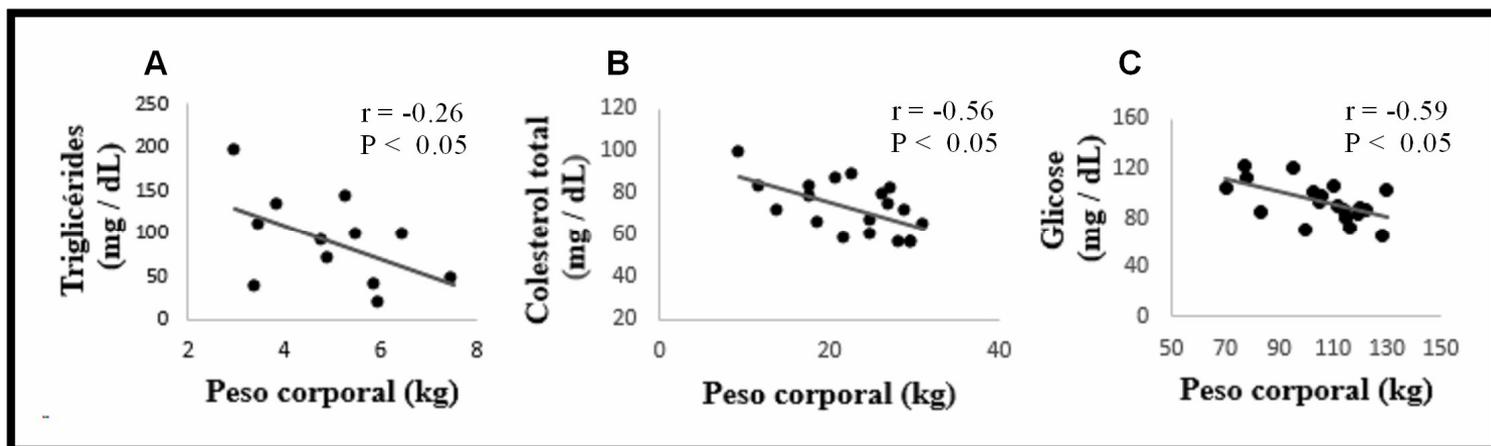


Figura 11: Correlação entre: (A) peso corporal e triglicérides em leitões ao desmame ($r = -0,26$; $P < 0,05$); (B) peso corporal e colesterol total aos 65 dias ($r = -0,56$; $P < 0,05$) e (C) peso corporal e glicose aos 150 dias ($r = -0,59$; $P < 0,05$).

6.6. Análises histomorfométricas do tecido adiposo visceral e subcutâneo

As avaliações histomorfométricas do tecido adiposo estão apresentadas nas Figuras 12, 13, 14 e 15. Em função da ausência de adipócitos no tecido adiposo subcutâneo dos leitões recém-nascidos, as análises histomorfométricas foram viáveis a partir da idade da desmama. Os resultados mostraram que o peso ao nascimento não alterou a densidade de adipócitos (adipócitos/mm²) no tecido adiposo subcutâneo em nenhuma das fases de desenvolvimento pós-natal (Figura 12). Em relação ao tecido adiposo visceral, recém-nascidos e desmamados não apresentaram adipócitos viscerais na região perirenal, o que viabilizou seu estudo a partir dos 65 dias. Os resultados revelaram que aos 150 dias, o número de adipócitos / mm² foi cerca de 65% maior nos suínos RIUC que os animais do grupo PN (Figura 13C; $P < 0,05$).

Em relação ao diâmetro dos adipócitos, os resultados demonstraram uma predominância de adipócitos subcutâneos entre 30 e 50 um aos 26 e 65 dias em ambos os grupos experimentais. No entanto aos 150 dias, os animais do grupo PN apresentaram uma maior frequência de adipócitos entre 70-120 um (Figura 14C; $P < 0,05$). Resultado semelhante foi encontrado para os adipócitos viscerais, uma vez que aos 150 dias os suínos do grupo PN apresentaram maior frequência de adipócitos entre 70-120 um ($P < 0,05$) (Figura 15).

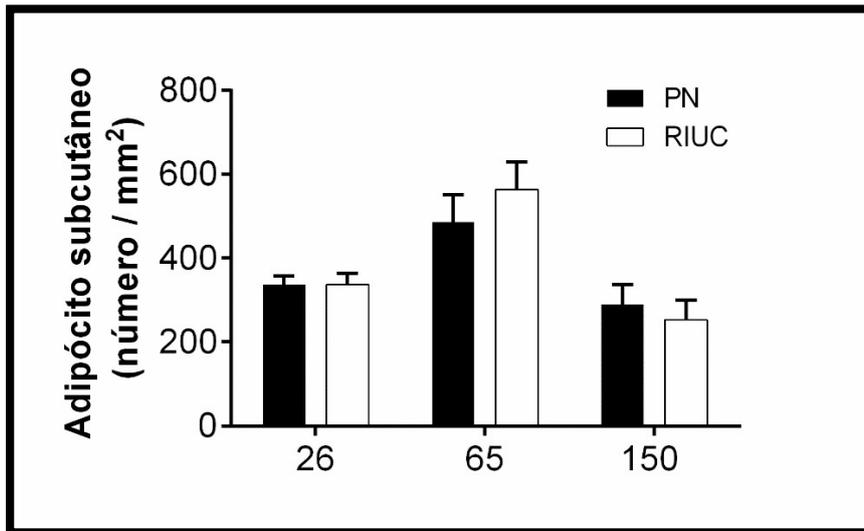


Figura 12: Número de adipócitos subcutâneos / mm² em suínos entre 26 e 150 dias.

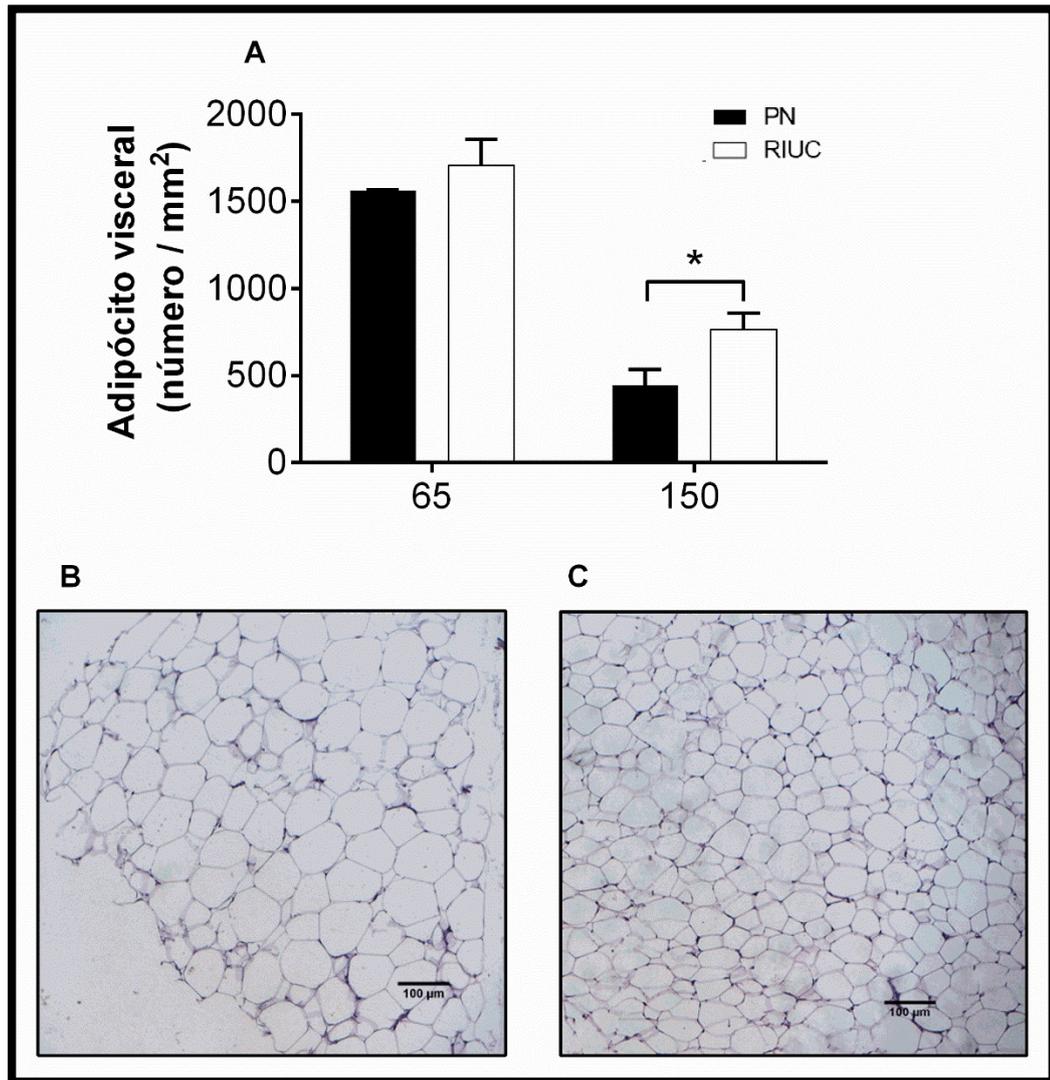


Figura 13: (A) Número de adipócitos viscerais / mm² em suínos entre 65 e 150 dias. (B) Adipócitos viscerais referente ao grupo PN e (C) Adipócitos viscerais referente ao grupo RIUC. * P < 0.05.

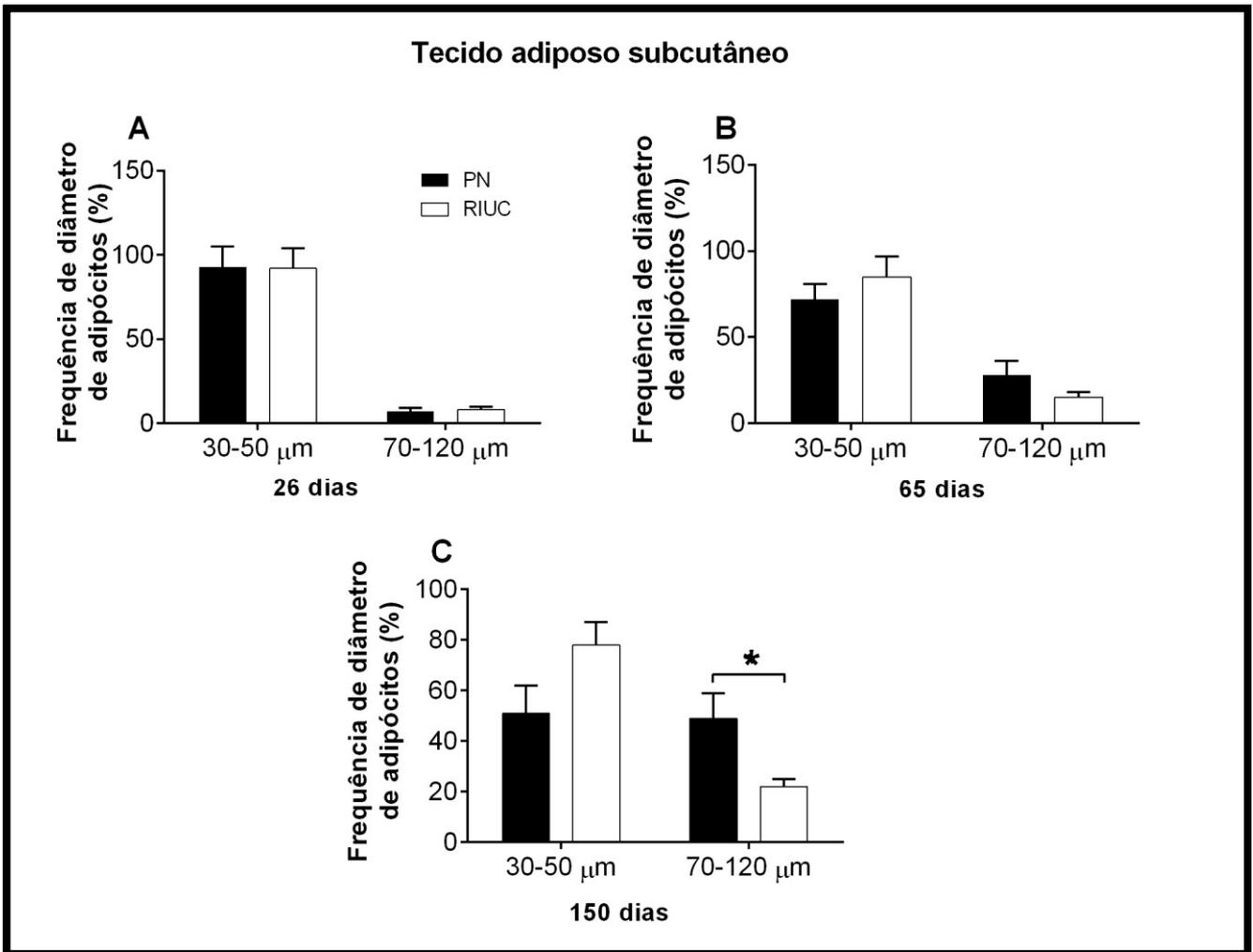


Figura 14: Frequência de diâmetro de adipócitos subcutâneos de suínos PN e RIUC aos 26 (A), 65 (B) e 150 dias (C). * $P < 0.05$.

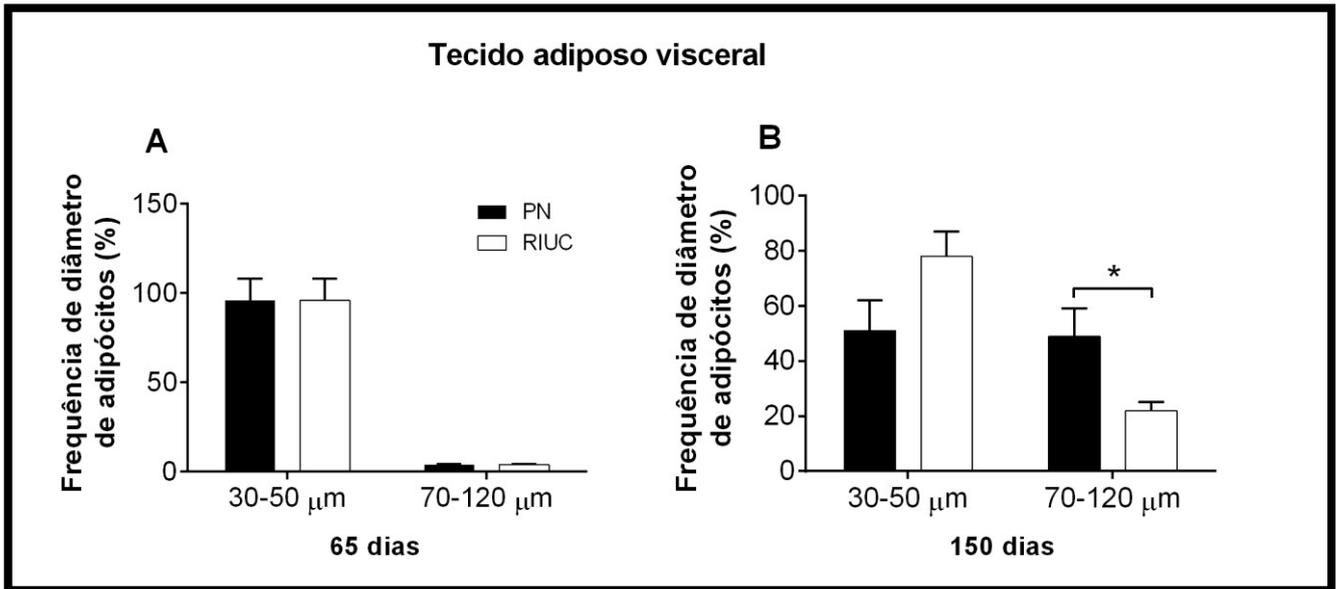


Figura 15: Frequência de diâmetro de adipócitos viscerais de suínos PN e RIUC aos 65 (A) e 150 dias (B).
* $P < 0.05$.

6.7. Histomorfometria do intestino delgado

Os resultados da avaliação histomorfométrica (Tabela 6) revelaram que entre o nascimento e o desmame o duodeno permaneceu estruturalmente semelhante entre os dois grupos (Figura 16). Por outro lado, observou-se redução significativa na altura das vilosidades, na área absorptiva e na área de superfície dos vilos em suínos RIUC aos 65 dias e 150 dias ($P < 0.05$). Nota-se ainda que aos 65 dias, os efeitos da RIUC foram mais intensos, pois a mucosa intestinal que foi revelado pelo aumento da profundidade da cripta e diminuição da relação V / C. Todos os parâmetros histomorfométricos duodenais, com exceção da profundidade da cripta, se correlacionaram positivamente com o peso ao nascer ($P < 0.05$) aos 65 dias (Tabela 7).

Por sua vez, as análises de jejuno demonstraram menor área absorptiva em leitões RIUC ao nascimento, no entanto esta diferença não mais foi observada ao longo do tempo (Figura 17).

Tabela 6 – Parâmetros histomorfométricos do intestino delgado de suínos normais e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal

Parâmetros	Recém-nascido		26 dias		65 dias		150 dias	
	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC
Duodeno								
Altura do vilo (μm)	446 \pm 26	441 \pm 21	306 \pm 44	322 \pm 49	313 \pm 23a	193 \pm 23b	395 \pm 39a	245 \pm 39b
Profundidade da cripta (μm)	124 \pm 4	111 \pm 9	305 \pm 19	287 \pm 21	441 \pm 22a	525 \pm 22b	578 \pm 67	554 \pm 66
Altura da mucosa (μm)	557 \pm 53	571 \pm 29	536 \pm 103	486 \pm 115	833 \pm 37	785 \pm 37	1054 \pm 208	1236 \pm 205
Razão: Vilo/ Cripta	3.4 \pm 0.3	4.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1a	0.3 \pm 0.1b	0.6 \pm 0.1	0.40 \pm 0.01
Área de superfície do vilo (mm^2)	0.20 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02a	0.0 \pm 0.00b	0.25 \pm 0.02a	0.12 \pm 0.01b
Área absorptiva (mm^2)	0.65 \pm 0.03	0.60 \pm 0.03	0.55 \pm 0.10	0.5 \pm 0.1	0.57 \pm 0.10a	0.36 \pm 0.02b	0.67 \pm 0.10a	0.42 \pm 0.01b
Células caliciformes / Cripta (mm^2)	3415 \pm 350	3306 \pm 477	3222 \pm 169	2862 \pm 252	2748 \pm 257	3209 \pm 481	4238 \pm 254	4145 \pm 256
Jejuno								
Altura do vilo (μm)	760 \pm 52	577 \pm 48	249 \pm 20	225 \pm 9	372 \pm 21	337 \pm 19	429 \pm 15	371 \pm 80
Profundidade da cripta (μm)	100 \pm 22	73 \pm 3	201 \pm 21	184 \pm 13	328 \pm 31	326 \pm 18	312 \pm 14	235 \pm 58
Altura da mucosa (μm)	328 \pm 102	665 \pm 44	560 \pm 31	540 \pm 36	755 \pm 32	655 \pm 32	767 \pm 24	806 \pm 45
Razão: Vilo/ Cripta	8.7 \pm 0.7	7.8 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
Área de superfície do vilo (mm^2)	0.07 \pm 0.10	0.06 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Área absorptiva (mm^2)	1.0 \pm 0.09	0.7 \pm 0.09	0.43 \pm 0.04	0.37 \pm 0.01	0.062 \pm 0.04	0.057 \pm 0.04	0.67 \pm 0.1	0.040 \pm 0.02
Células caliciformes / Cripta (mm^2)	2455 \pm 310	3104 \pm 277	3215 \pm 157	2562 \pm 252	2345 \pm 257	3217 \pm 281	3615 \pm 244	3288 \pm 235

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem ($P < 0.05$).

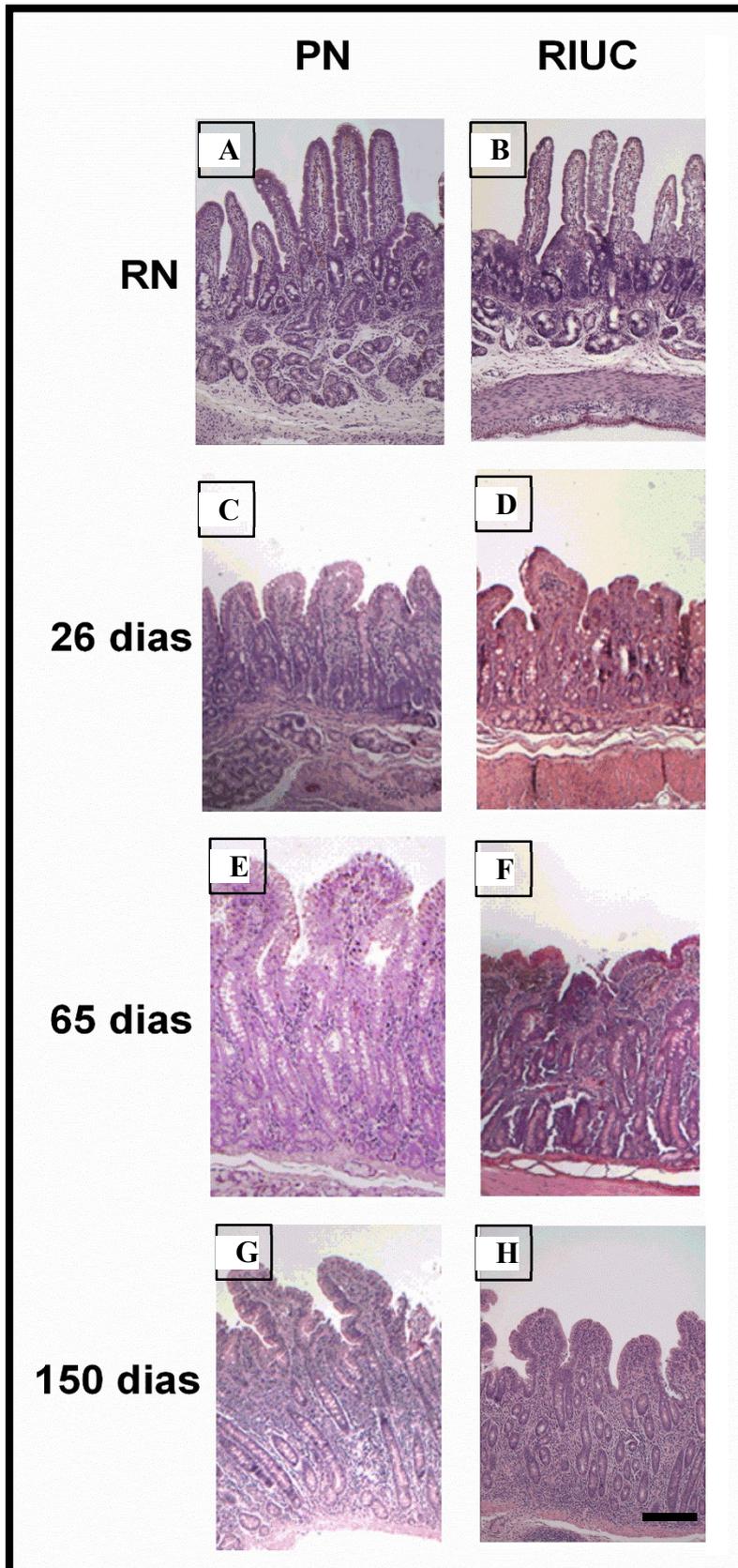


Figura 16: Fotomicrografia do duodeno de suínos PN (A, C, E, G) E RIUC (B, D, F, H) ao nascimento, 26 dias, 65 dias e 150 dias.

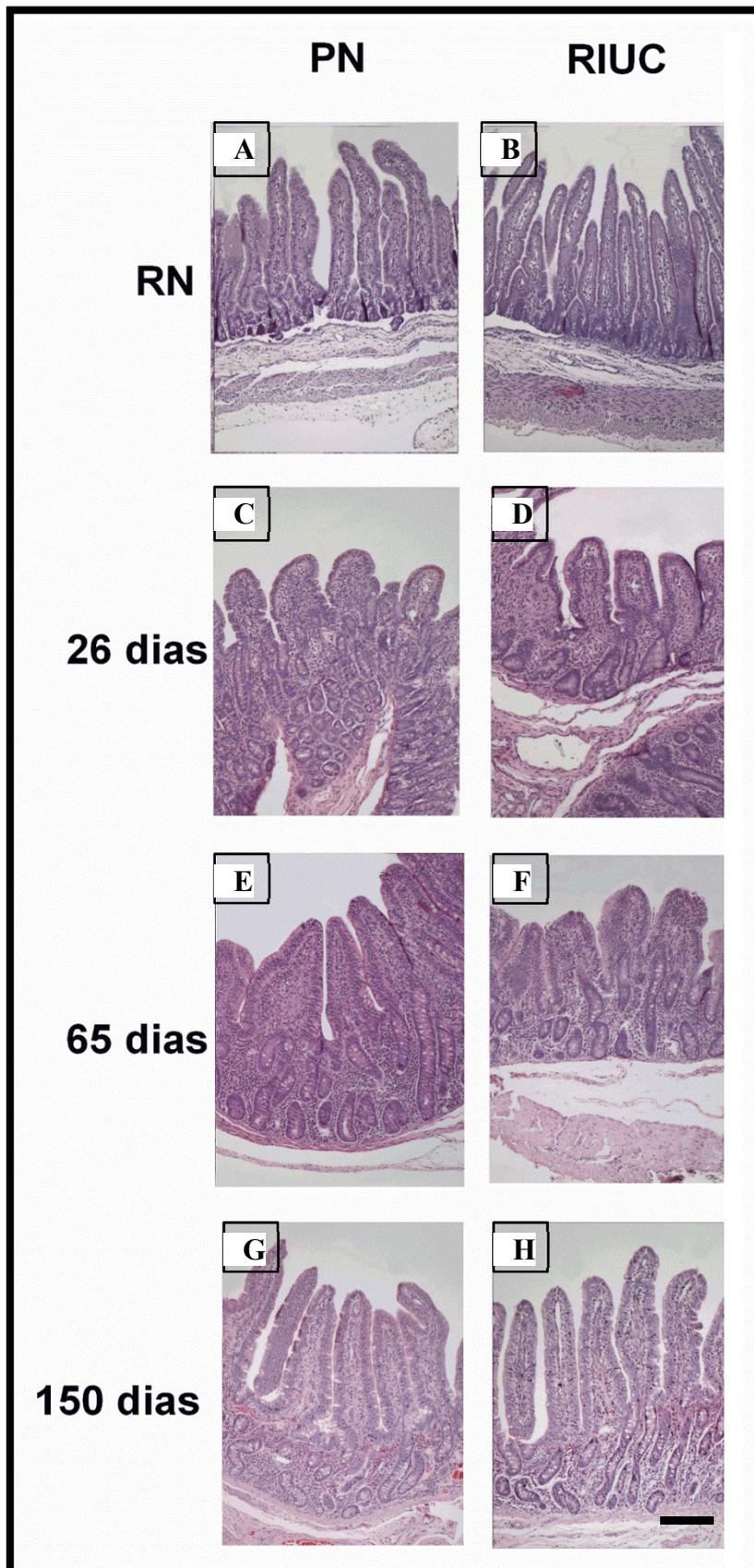


Figura 17: Fotomicrografia do jejunum de suínos PN (A, C, E, G) E RIUC (B, D, F, H) ao nascimento, 26 dias, 65 dias e 150 dias.

6.8. Avaliação da proliferação celular e apoptose

Os resultados das análises de proliferação celular e apoptose estão apresentados na figura 18. Os leitões recém-nascidos do grupo RIUC apresentaram uma menor taxa de proliferação celular, entretanto tal parâmetro não foi mais afetado ao longo do desenvolvimento pós-natal (Figura 18A). Com relação a Caspase-3, a expressão deste marcador demonstrou um padrão oposto ao de Ki-67. Enquanto em recém-nascidos a expressão de mostrou semelhante entre os grupos (Figura 18C), ao desmame, 65 e 150 dias ela foi significativamente maior em suínos RIUC ($P < 0.05$).

Ao avaliar a expressão de Ki-67, entre as idades no mesmo grupo ao longo do tempo mostrou evidências de recuperação no grupo RIUC. Surpreendentemente, a expressão de Ki-67 aos 150 foi cerca de 3 vezes maior em comparação as demais idades ($P < 0.05$), mesmo tempo em que a expressão de Caspase-3 foi menor ($P < 0.05$) (Figura 18B e 18C). Já o grupo PN, manteve a expressão constante destes dois marcadores ($P > 0.05$).

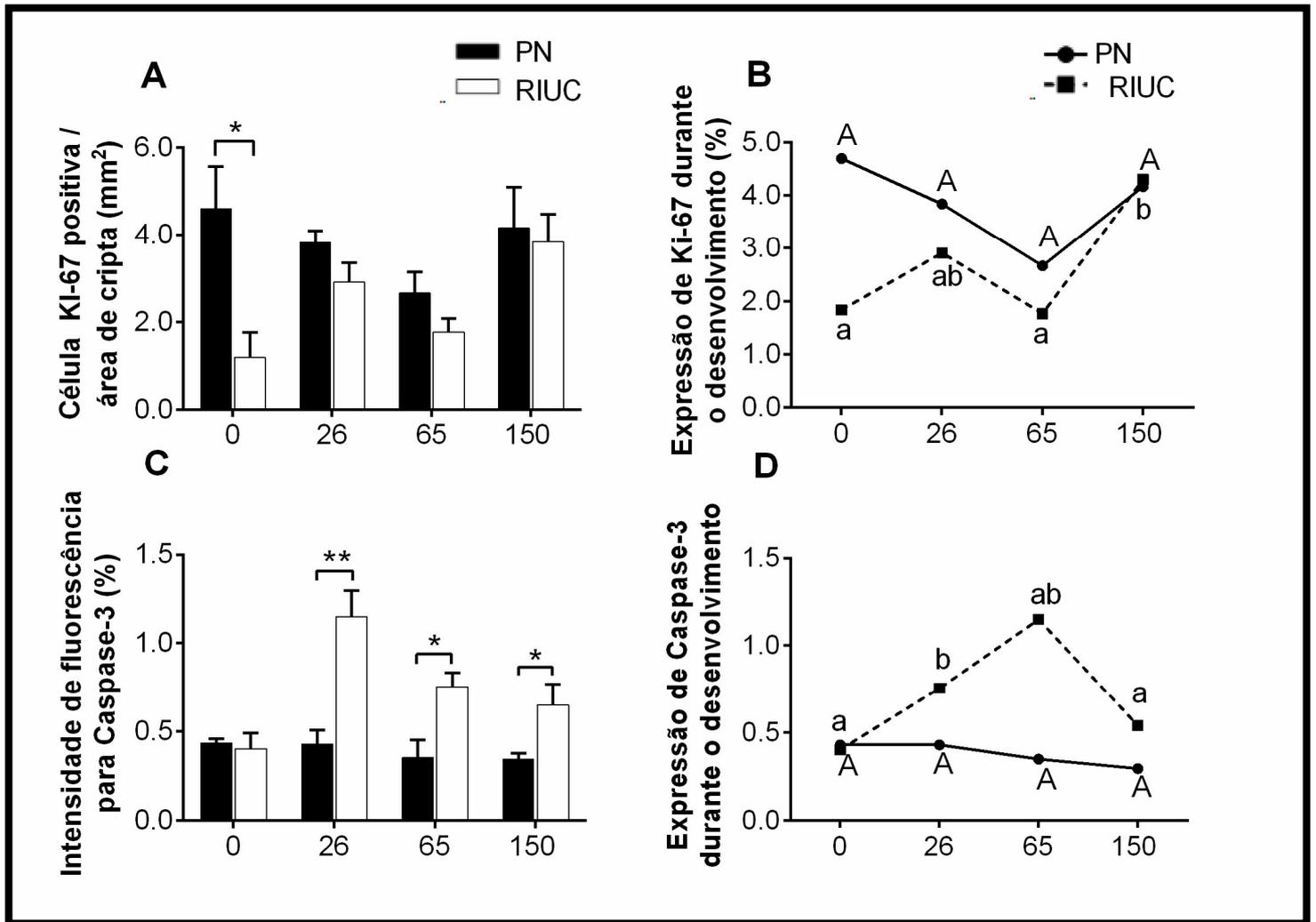


Figura 18 - Caracterização da expressão de KI-67 e Caspase-3 em duodenos de suínos durante o desenvolvimento pós-natal. (A) Média de células Ki-67 positivas por área de cripta (B) Avaliação da cinética da expressão de Ki-67 por grupo experimental entre 0 e 150 dias (C) Expressão de Caspase-3 por intensidade média de fluorescência e (D) Avaliação da cinética da expressão Caspase-3 por grupo experimental entre 0 e 150 dias. Letras maiúsculas e minúsculas se referem a estatística entre cada grupo.

6.9. Correlações entre o peso corporal e parâmetros intestinais

A figura 7 demonstra correlações entre o peso ao nascimento e o peso aos 26, 65 e 150 dias com parâmetros morfométricos e histomorfométricos mensurados no duodeno. O peso e comprimento do órgão, a altura do vilo, a razão vilo / cripta, a área absortiva e a expressão de Ki-67 estiveram positivamente correlacionadas com o peso ao nascimento e as demais idades. A expressão de Caspase-3, por sua vez, mostrou-se maior, a medida que o peso corporal diminuiu ($P < 0.05$). Interessantemente, estas associações ocorreram em maior número nas idades mais avançadas, em especial aos 65 dias, resultado que revela efeitos tardios da RIUC no intestino delgado (Tabela 5).

Tabela 7 – Correlação entre o peso ao nascimento e aos 26, 65 e 150 dias com parâmetros morfométricos e histomorfométricos do ID

Parâmetros	RN		26 dias				65 dias				150 dias			
	Peso		Peso RN		Peso 26 dias		Peso RN		Peso 65 dias		Peso RN		Peso 150 dias	
	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
Peso ID	0.86	<0.05	0.84	<0.05	0.82	<0.05	0.71	<0.05	0.69	<0.05	0.59	0.11	0.48	0.21
Comprimento ID	0.87	<0.001	0.85	<0.05	0.64	0.08	0.89	<0.001	0.89	<0.001	0.79	<0.05	0.89	<0.05
Duodeno														
Altura do vilo	0.18	0.63	0.12	0.77	0.26	0.52	0.81	<0.05	0.68	<0.05	0.77	<0.05	0.60	0.11
PC	0.11	0.75	0.43	0.28	0.39	0.32	-0.56	0.08	-0.64	<0.05	0.03	0.93	0.22	0.59
Razão: vilo/cripta	-0.23	0.50	0.26	0.56	0.35	0.43	0.82	<0.05	0.76	<0.05	0.66	0.07	0.56	0.14
Área absorptiva	-0.08	0.82	0.40	0.32	0.50	0.20	0.75	<0.05	0.60	0.06	0.93	<0.001	0.67	0.09
Área de superfície	0.30	0.39	0.08	0.83	0.23	0.57	0.79	<0.05	0.67	<0.05	0.87	<0.05	0.72	<0.05
Caspase-3	0.23	0.50	-0.87	<0.05	-0.65	0.07	-0.88	<0.05	-0.80	<0.01	-0.61	0.10	-0.71	<0.05
Ki-67	0.69	<0.05	0.69	<0.05	0.72	<0.05	0.64	<0.05	0.68	<0.05	-0.37	0.35	0.18	0.65

ID: Intestino delgado; RN: recém nascido; PC: profundidade de cripta. ^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem (P < 0.05).

6.10. Atividade enzimática específica

A Tabela 8 apresenta o resultado das análises de atividade enzimática específica em amostras de duodeno e jejuno. No duodeno, observou-se uma diminuição significativa da amilase nos suínos RIUC aos 150 dias ($P < 0.05$), enquanto as demais enzimas atividade enzimática de lactase, lipase, tripsina e quimiotripsina não foram afetadas pelo peso ao nascimento ($P > 0.05$). No jejuno, houve um decréscimo nos valores de quimiotripsina no grupo RIUC aos 65 dias ($P < 0.05$), enquanto as demais enzimas lactase, lipase, amilase e tripsina mantiveram sua atividade enzimática semelhante entre ambos os grupos experimentais.

Tabela 8 – Atividade enzimática específica de enzimas do intestino delgado de suínos normais e RIUC durante o desenvolvimento pós-natal

Parâmetros	Recém nascido		26 Dias		65 Dias		150 Dias	
	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC	PN	RIUC
Duodeno								
Lactase (U/mg)	383 ± 93	417 ± 93	162 ± 35	132 ± 35	92 ± 13	73 ± 12	71 ± 11	84 ± 11
Amilase (U/mg)	1.00 ± 0.40	1.55 ± 0.30	1.65 ± 0.40	0.39 ± 0.50	1.80 ± 0.20	1.55 ± 0.20	1.31 ± 0.10 ^a	0.85 ± 0.10 ^b
Lipase (U/mg)	0.12 ± 0.10	0.19 ± 0.10	0.08 ± 0.10	0.05 ± 0.10	0.04 ± 0.10	0.06 ± 0.10	0.03 ± 0.10	0.02 ± 0.10
Quimiotripsina (U/mg)	579 ± 150	201 ± 28	237 ± 53	267 ± 59	330 ± 80	376 ± 76	731 ± 104	532 ± 127
Tripsina (U/mg)	779 ± 165	400 ± 113	406 ± 91	242 ± 105	382 ± 103	635 ± 98	295 ± 73	115 ± 79
Jejuno								
Lactase (U/mg)	287 ± 97	407 ± 97	227 ± 75	275 ± 75	234 ± 57	216 ± 40	88 ± 23	128 ± 21
Amilase (U/mg)	1.04 ± 0.30	1.18 ± 0.40	1.07 ± 0.40	1.28 ± 0.30	0.97 ± 0.20	0.58 ± 0.20	0.61 ± 0.10	0.56 ± 0.10
Lipase (U/mg)	0.04 ± 0.10	0.04 ± 0.10	0.04 ± 0.10	0.05 ± 0.10	0.08 ± 0.10	0.05 ± 0.10	0.04 ± 0.10	0.07 ± 0.10
Quimiotripsina (U/mg)	461 ± 177	387 ± 41	402 ± 301	663 ± 301	367 ± 55 ^a	190 ± 62 ^b	340 ± 75	402 ± 86
Tripsina (U/mg)	555 ± 79	460 ± 2	494 ± 116	354 ± 150	474 ± 99	372 ± 99	272 ± 48	199 ± 64

PN: peso ao nascimento. ^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na linha, diferem (P < 0.05).

6.11. Expressão relativa de citocinas inflamatórias

A expressão gênica das citocinas inflamatórias presentes no duodeno (Figura 20) demonstraram que a expressão da citocina IL-6 foi maior ao nascimento e aos 65 dias nos animais RIUC sendo, no entanto menor ao desmame ($P < 0.05$). Além disso, ainda no grupo RIUC aos 65 dias, observou-se maior expressão de CCL2 ($P < 0.05$) e menor expressão de CXCL8, TNF- α e TLR4 ($P < 0.05$).

A expressão relativa dos genes comparadas entre as idades dentro do mesmo grupo experimental estão apresentadas na figura 21. Entre o nascimento e desmame a expressão de IL-6 foi maior nos animais do grupo PN, enquanto neste mesmo período a expressão de todos os genes foi semelhante no grupo RIUC ($P < 0.05$). No entanto, os animais RIUC expressaram mais IL-6 e CXCL8 aos 65 dias quando comparada a idade anterior (26 dias, Figura 21D). Por outro lado, estes mesmos animais, quando completaram 150 dias, expressaram menos IL-1, IL-6, CXCL8, CCL2, TNF- α e TLR4 quando comparados a idade anterior (Figura 21F).

Redes de correlações entre os genes pró-inflamatórios (Figura 22) demonstraram alterações importantes, principalmente no grupo RIUC aos 65 dias. Ainda aos 65 dias, a via do inflamassoma parece estar ativada em suínos RIUC, pois identificamos uma associação positiva entre TLR-4, IL-1, TNF- α e CXCL8. Curiosamente, neste mesmo grupo, recém-nascidos e pré-púberes não apresentaram nenhuma correlação entre as mesmas.

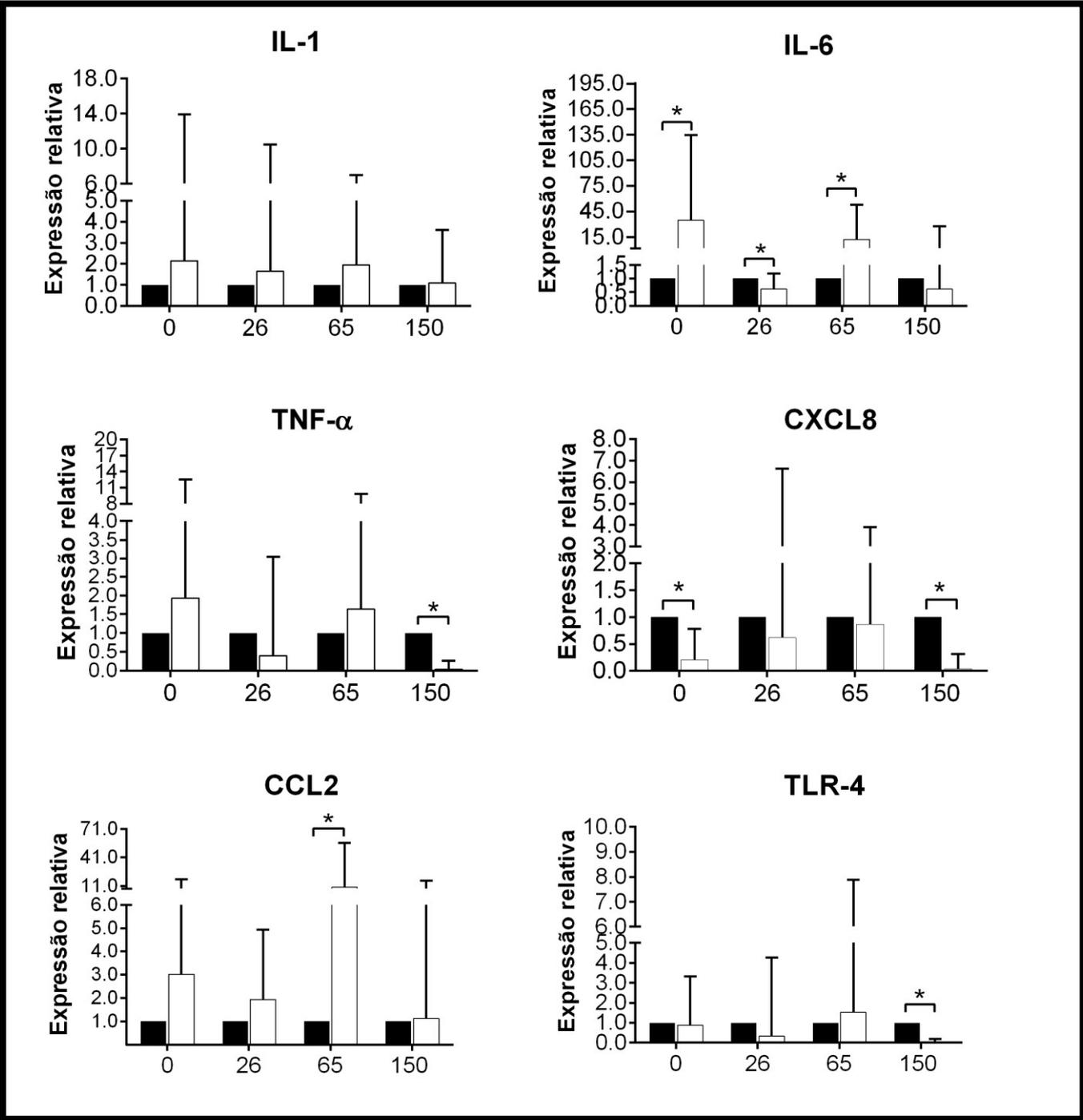


Figura 19: Valores médios de expressão relativa de genes pró-inflamatórios no duodeno de suínos do grupo PN e RIUC. * P < 0.05.

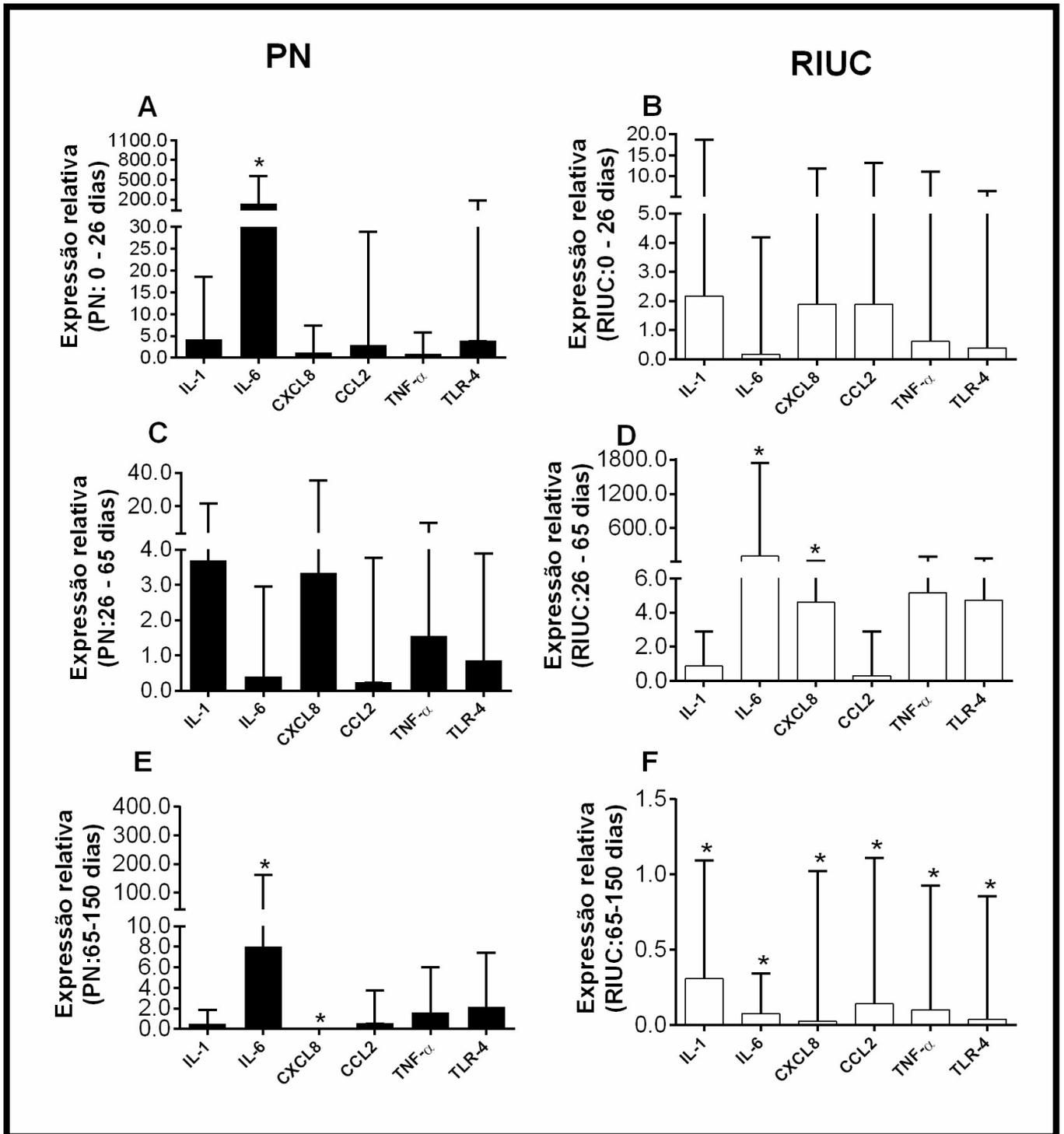


Figura 20: Avaliação da expressão relativa de genes pró-inflamatórios no duodeno de suínos do grupo PN e RIUC em três fases de vida pós-natal: 0-26 dias (A e B), 26-65 (C e D) e 65-150 (E-F).

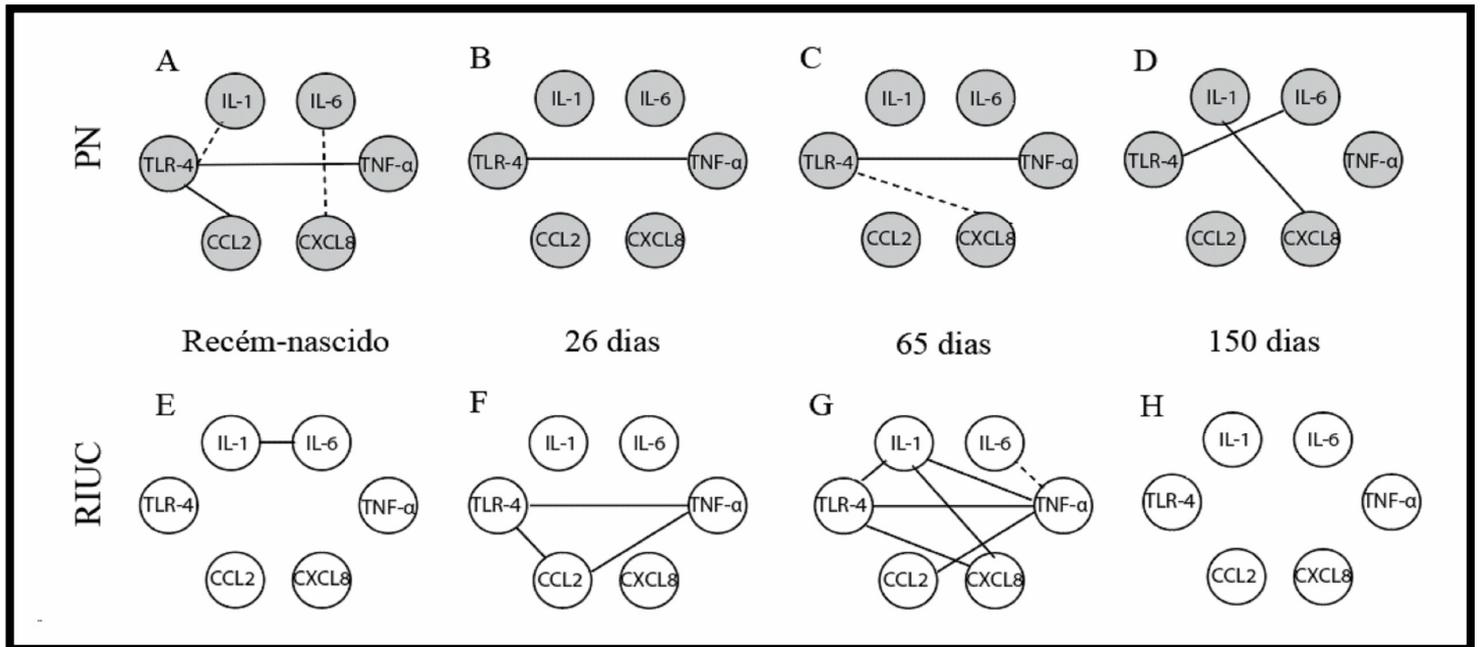


Figura 21: Redes de correlação entre genes pró-inflamatórios. Rede de correlações no grupo PN ($n = 5$) para recém-nascidos (A), 26 dias (B), 65 dias (C) e 150 dias (D). Rede de correlações no grupo RIUC ($n = 5$) para recém-nascido (E), 26 dias (F), 65 dias (G) e 150 dias (H). Todas as correlações apresentadas nas redes são fortes, apresenta r -quadrado maior que 0.89 e significância estatística definida por $P < 0.05$. As linhas contínuas representam correlação positiva e as linhas tracejadas representam correlação negativa

7.0. DISCUSSÃO

A restrição de crescimento intrauterina (RIUC) afeta em torno de 7–10% das gestações humanas (Neitzke, et al., 2011), mas em outros mamíferos, como nos suínos, este número pode chegar a ser três vezes maior (Su et al., 2007; D’Inca et al., 2010). Neste sentido, este estudo pode contribuir para a melhor compreensão dos efeitos tardios da RIUC não só em termos de saúde pública, mas também para a ciência animal.

Entre os esforços para compreender os mecanismos responsáveis por distúrbios metabólicos e intestinais em indivíduos com RIUC, o presente estudo dentro do nosso conhecimento, o presente estudo foi o único a investigar o desenvolvimento corporal, a adiposidade, o perfil metabólico e as características morfofuncionais e inflamatórias do intestino delgado, desde o nascimento até a idade jovem, utilizando o suíno como modelo experimental. Demonstramos que a RIUC compromete todos estes parâmetros não apenas nas fases iniciais de vida, mas tem um efeito acentuado após o desmame no suíno que corresponderia a infância no ser humano.

Nossos resultados fornecem evidências da ocorrência de RIUC na progênie de suínos com baixo peso ao nascer, pelo aumento na proporção de peso cérebro: fígado. Mais importante, os dados de crescimento aqui apresentados mostram que os leitões RIUC não recuperaram o peso ao longo de toda a produção, quando comparados com os seus irmãos PN, fato consistente com Alvarenga et al. (2013). No entanto, enquanto neste estudo os leitões RIUC em idade de abate eram em torno de 20% mais leves, no trabalho citado anteriormente, esta diferença não ultrapassou 8%. Certamente, o impacto mais acentuado da RIUC sobre as progênies atuais pode estar associado à maior prolificidade das fêmeas suínas contemporâneas que apresentam ninhadas maiores e conseqüentemente uma drástica redução do peso ao nascimento dos leitões.

Ainda que, em termos brutos, o peso corporal dos animais RIUC fosse menor ao longo de todo o período experimental, a taxa de crescimento fracionária foi 55% maior no início da vida pós-natal, indicativo de um crescimento *catch-up*. Consistentemente, para corroborar este achado, o peso dos órgãos se equiparou entre os grupos experimentais na fase pré-púbere, mesmo que ao nascimento tais órgãos representassem cerca de 50% do peso dos órgãos no grupo PN. Além disso, o comprimento relativo do intestino delgado chegou a ser 45% maior em suínos RIUC aos 150 dias, provavelmente devido à disponibilidade de alimento, indicando uma potencial prioridade metabólica em relação ao crescimento corporal (Shanklin e Cooke, 1993).

O crescimento compensatório pode ter efeitos benéficos de curto prazo no desenvolvimento e estatura mas está associado ao risco aumentado de adiposidade e doenças metabólicas na vida tardia (Berends et al., 2013). A alta taxa de proliferação celular após longos períodos de restrição nutricional durante a vida intrauterina tem sido apontada como o principal mecanismo que explica o crescimento inicial de recuperação (Finkelstein e Baron, 2013). No entanto, este fenômeno aumenta o acúmulo de dano celular e estresse oxidativo, processos biológicos que reduzem a longevidade e podem explicar a maior taxa de mortalidade encontrada nos leitões RIUC (Jimenez e Patti, 2007).

Os dados atuais mostram que a previsão do risco metabólico em leitões RIUC seria baixo se fosse baseada apenas nos indicadores de adiposidade IMC, IMP e IAC (De Lorenzo, 2018). No entanto, demonstramos que a partir do desmame, até a fase pré-púbere, o menor peso corporal esteve correlacionado a maiores concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total e glicose. Mais importante, aos 65 dias, as frações de colesterol total, LDL e o índice de Castelli I foram aumentadas em leitões RIUC, caracterizando uma hipertrigliceridemia e consequente aumento do risco metabólico nesta idade.

Demonstramos, portanto, que utilizando o suíno como modelo experimental, o risco aterogênico induzido por RIUC começa na infância.

Apesar dos índices de adiposidade convencionais confirmarem a redução da massa corporal em leitões RIUC, a razão entre a circunferência abdominal e o peso corporal foi maior nos leitões deste grupo. Até o presente momento, nenhum estudo associou estas duas variáveis com a ocorrência de RIUC. Interessantemente, este resultado infere que, este índice, proposto neste trabalho, representa um bom candidato para o diagnóstico de RIUC em suínos que pode ser explicado pelo maior número de adipócitos viscerais encontrados neste grupo.

Nossos dados mostram que os leitões RIUC nasceram com a mucosa íntegra e assim permaneceu até o desmame. No entanto, em fases subsequentes, importantes alterações estruturais, enzimáticas e inflamatórias no duodeno foram observadas. A este respeito, Wang et al. (2010) mostraram que a eficiência de utilização de nutrientes é reduzida em leitões que sofreram a restrição intrauterina, podendo esta ser a principal base fisiológica que explicaria o menor peso corporal até a fase pré-púbere nestes animais. Adicionalmente, tais alterações estruturais comprometeram a atividade enzimática de quimi tripsina e amilase nos suínos RIUC em fase de crescimento, podendo ser um fator limitante para a digestão eficiente de proteínas e carboidratos, nutrientes essenciais para o crescimento muscular ideal e ganho de peso.

A fim de esclarecer os mecanismos fisiológicos responsáveis pelo comprometimento do epitélio intestinal, realizou-se o estudo da expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose. Nossos dados revelaram maior expressão da Caspase-3 nas vilosidades de leitões RIUC desde o desmame até a idade adulta. Neste sentido, sugerimos que o mecanismo responsável pelo encurtamento das vilosidades seja decorrente do maior índice de apoptose presente nestes animais (Vereecke et al., 2011). No entanto,

entre os dias 65 e 150 observamos uma diminuição da apoptose e aumento da expressão de Ki-67 no grupo RIUC, sugerindo uma tentativa de recuperação da mucosa intestinal, porém insuficiente.

Considerando que alterações estruturais na mucosa intestinal podem tornar este tecido mais susceptível a lesão, infecção e inflamação (Attig et al., 2013), realizou-se um estudo da expressão de genes pró-inflamatórios no duodeno. Demonstramos que aos 65 dias, a resposta inflamatória nesta porção do intestino delgado é mais acentuada em leitões RIUC, resultado que corrobora com os danos histomorfométricos mais proeminentes nesta idade. Certamente, o conjunto destes achados podem explicar o menor crescimento e ganho e peso em leitões RIUC na saída de creche, uma vez que grande parte da energia pode estar sendo redirecionada para o reestabelecimento da homeostase corporal após intensos distúrbios intestinais como a atrofia das vilosidades, menor turnover celular e processo inflamatório exacerbado.

Interessantemente, encontramos uma menor expressão de CXCL8 em recém-nascidos RIUC. Nesta idade, a redução desta quimiocinas pode estar mais relacionada a um defeito de função, que a uma redução da inflamação, uma vez que o tempo entre o nascimento e a eutanásia não seria suficiente para induzir inflamação. Tal fato também ocorreu aos 150 dias, sugerindo que o recrutamento de neutrófilo e formação de um microambiente inflamatório pela CXCL8 talvez não seja funcional também na fase pré-púbere.

Adicionalmente, a expressão de IL-6 oscilou durante a vida em leitões RIUC, sendo mais expresso ao nascimento e 65 dias, e menos expresso ao desmame, resultado similar ao encontrado por Pié et al. (2004). O aumento da expressão de IL-6 tem sido bem documentado após infecção bacteriana ou viral em suínos (Fossum et al., 1998) e em humanos durante doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn's e colite

ulcerativa (Ito et al., 2003; Atreya et al., 2005). No entanto, em contraste com a produção crônica da IL-6 observada nestas doenças, no presente estudo, a rápida regulação negativa ao desmame parece inferir um efeito protetor do aleitamento em recém-nascidos RIUC. Adicionalmente, a maior expressão de CCL2 em leitões RIUC aos 65 dias é concomitante com a alta expressão de IL-6, indicando que, nesta idade, a inflamação parece estar mais proeminente.

Quando a expressão gênica foi avaliada ao longo das idades, dentro do mesmo grupo experimental, algumas particularidades foram identificadas. Aos 65 dias, observou-se um aumento da expressão dos mediadores inflamatórios IL-6 e CXCL8 em leitões RIUC, comparada a idade de desmame. Interessantemente, aos 150 dias, IL-1, IL-6, TNF- α , CXCL2, CCL2 e TLR-4 foram menos expressos neste grupo comparada a idade anterior. Ainda que o período pós-desmama seja reconhecidamente crítico para os suínos (estresse da separação da mãe, substituição da dieta líquida pela sólida, imaturidade intestinal) (Jayaraman e Nyachoti. 2017), neste trabalho, animais que sofreram restrição de crescimento fetal apresentou danos intestinais muito mais proeminentes na saída de creche (65 dias).

Para uma melhor compreensão da ativação das vias inflamatórias dentro deste contexto, correlações entre os genes pró-inflamatórios foram avaliadas. Interessantemente, ainda aos 65 dias, ocorreram as mais intensas associações entre as citocinas no grupo RIUC. As correlações entre o receptor LPS bacteriano, a TLR4 e as citocinas IL-1, TNF- α e CXCL8 sugerem que bactérias gram-negativas da microbiota de animais RIUC ativam o receptor TLR4, levando a produção de TNF- α . Este é o primeiro sinal da via do inflamassoma que ativa a caspase-1 e conseqüente aumenta a produção de IL-1 (Abbas et al., 2012).

8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências de que a restrição do crescimento na vida fetal contribui de várias maneiras para o comprometimento do desenvolvimento pós-natal até a fase pré-púbere, caracterizado pelo baixo crescimento, hipertrigliceridemia, deposição de gordura visceral e distúrbios estruturais e inflamatórios no intestino delgado. Nossas descobertas podem apoiar o conceito de programação intrauterina sobre o risco de doenças metabólicas antes mesmo da puberdade, sendo o período inicial após o desmame crucial de intensos distúrbios duodenais. Tais achados, pode contribuir para a elucidação dos distúrbios anatômicos e funcionais nas diferentes fases de vida do suíno RIUC e sugerir que o baixo peso permanente pode ser consequência dos prejuízos gastrintestinais.

9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. H. I. V. *Imunologia Celular e Molecular*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Alvarenga A. L. N., Chiarini-Garcia H., Cardeal P. C., Moreira L. P., Foxcroft G. R., Fontes D. O., Almeida F. R. C. L. 2013. Intra-uterine growth retardation affects birthweight and postnatal development in pigs, impairing muscle accretion, duodenal mucosa morphology and carcass traits. *Reproduction, Fertility and Development*, 25:387-395.

Alvarenga, A.L.N. ; Sousa, R. V. ; Parreira, G. G. ; Chiarini-Garcia, H. ; Almeida, F. R. C. L. 2014. Fatty acid profile, oxidative stability of pork lipids and meat quality indicators are not affected by birth weight. *Animal*, 8:660-666.

Arce, C.; Ramírez-Boo, M.; Lucena, C.; Garrido, J.J. 2010. Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33:161-174.

Armelagos, G. J.; Goodman, A. H.; Harper, K. N.; Blakey, M. L. 2009. Enamel hypoplasia and early mortality: Bioarcheological support for the Barker hypothesis. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 18:261–271.

Atreya, R., & Neurath, M. F. (2005). Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 28:187-196.

Attig, L., Brisard, D., Larcher, T., Mickiewicz, M., Guilloteau, P., Boukthir, S., Niamba, C. N., Gertler, A., Djiane, J., Monniaux, D., & Abdennebi-Najar, L. 2013. Postnatal leptin promotes organ maturation and development in RIUC piglets. *PloS one*, 8: e64616.

Barker, D; Osmond, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 8489:1077– 11081.

Baxter, E.S.; Jarvis, R.B.; D'Eath, D.W.; Ross, S.K.; Robson, M; Farish, M.; Nevison; Lawrence, A. B.; Edwards, S. A. 2007. Investigating the behavioural and physiological indicators of neonatal survival in pigs. *Theriogenology*, 69: 773-783.

Berends, L., Fernandez-Twinn, D., Martin-Gronert, M. 2013. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int J Obes* 37: 1051–1057.

Bernstein, I.M., Horbar, J.D., Badger, G.J., Ohlsson, A., Golan, A. 2000. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*, 182: 198–206.

Bertram, C.E., & Hanson, M.A. 2002. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* 4: 459-467.

Blencowe H.; Krasevec, J, de Onis M, Black RE, An X, Stevens GA, Borghi, E., Hayashi, C., Estevez, D., Cegolon, L., Shiekh, S., Hardy, V.P., Lawn, J., Cousens, S. 2019. National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*, 7:e849-e860.

Bradford, M.M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.

Bruessow K.P., Waehner M. 2008: Biological potentials of fecundity of sows. *Zuchtungskunde*, 80:370-377.

Caldeira-Brant, A., Martinelli, L., Marques, M., Reis, A., Martello, R., Almeida, F., & Chiarini-Garcia, H. 2020. A subpopulation of human Adark spermatogonia behaves as the reserve stem cell, *Reproduction*, 159: 437-451.

Che, L., Hu, L., Liu, Y., Yan, C., Peng, X., Xu, Q., Wang, R., Cheng, Y., Chen, H., Fang, Z., Lin, Y., Xu, S., Feng, B., Chen, D., & Wu, D. 2016. Dietary Nucleotides Supplementation Improves the Intestinal Development and Immune Function of Neonates with Intra-Uterine Growth Restriction in a Pig Model. *PloS one*, 11: e0157314.

Coffman, R.L., Varkila, K., Scott, P. and Chatelain, R. 1991. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivp. *Immunologic Review*, 123:189-207.

Dantzer, V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anatomy and Embryology*, 172: 281-293, 1985.

D'Inca, R., Kloareg, M., Gras-Le Guen, C. and Le Huerou-Luron, I. 2010. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. *J Nutr*, 140:925–931.

De Lorenzo, A., Lorenzo Romano, Renzo, L. D., Gualtieri, P., Salimei, C., Carrano, Rampello, T., Miranda, R. C. 2018. Tri-ponderal mass index (TMI) rather than body mass index (BMI): an indicator of high adiposity in Italian children and adolescents. *Nutrition*. 60: 41-47.

Désir-Vigné, A., V. Haure-Mirande, et al. 2018. Perinatal supplementation of 4-phenylbutyrate and glutamine attenuates endoplasmic reticulum stress and improves colonic epithelial barrier function in rats born with intrauterine growth restriction. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55: 104-112.

Dong, L., Zhong, X., Ahmad, H., Li, W., Wang, Y., Zhang, L. e Wang, T. 2014. Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 62: 510–518.

Duvigneau, J. C.; Hartl, R. T.; Groiss, S.; Gemeiner, M. 2005. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *Journal of Immunological*, 306: 16–27.

Engelsmann, M. N., Hansen, C. F., Nielsen, M. N., Kristensen, A. R., & Amdi, C. 2019. Glucose Injections at Birth, Warmth and Placing at a Nurse Sow Improve the Growth of IUGR Piglets. *Animals*, 9:519.

Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*, 95:271–278.

Etuk E.U. 2010. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am*, (1):130-134.

Felicioni, Fernando; Santos, Thaís Garcia; Paula, Thaís De Mérci Domingues E; Chiarini-Garcia, Hélio; Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato. 2019. Intrauterine growth restriction: screening and diagnosis using animal models. *Animal Reproduction*, 16: 66-71.

Felicioni, F, Pereira, AD, Caldeira-Brant. 2020. Postnatal development of skeletal muscle in pigs with intrauterine growth restriction: morphofunctional phenotype and molecular mechanisms. *Journal of Anatomy* (00): 1– 14.

Ferenc K, Pietrzak P, Podlewski M.M., Piwowarski J, Jkiliańczyk R, Guilloteau P, Zabielski R. 2014. Intrauterine growth retarded piglet as a model for humans-studies on the perinatal development of the gut structure and function. *Reproductive Biology*, 14:51-60.

Ferenc, K., Pilżys, T., Skrzypek, T., Garbicz, D., Marcinkowski, M., Dylewska, M., Gładysz, P., Skorobogatov, O., Gajewski, Z., Grzesiuk, E., & Zabielski, R. 2017. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Disease markers*, 2017:5238134.

Fleiss, B., Wong, F., Brownfoot, F., Shearer, I. K., Baud, O., Walker, D. W., Gressens, P., & Tolcos, M. (2019). Knowledge Gaps and Emerging Research Areas in Intrauterine Growth Restriction-Associated Brain Injury. *Frontiers in endocrinology*, 10:188.

Finkelstain, G. P., Lui, J. C., & Baron, J. 2013. Catch-up growth: cellular and molecular mechanisms. *World review of nutrition and dietetics*, 106:100–104.

Finnemore A, Groves A. 2015. Physiology of the fetal and transitional circulation. *Semin Fetal Neonatal Me*, 20:210-216.

Fossum, C.; Wattrang, E.; Fuxler, L.; Jensen, K. T.; Wallgren, P. 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN- α , IFN- γ , TNF- α) as markers for acute bacterial infection in swine - a possible role for serum interleukin-6. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 64:161-172.

Frاندoloso, R.; Martínez-Martínez, S.; Rodríguez-Ferri, E. F.; Yubero, S.; Rodríguez-Lázaro, D.; Hernández, M.; Gutiérrez-Martín, C. B. 2013. Haemophilus parasuis subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin prevent the expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pigs. *Clinical & developmental immunology*, 2013: 122432.

Geisert, R.D.; Renegar, R.H.; Tatcher, W.Q. Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biology of Reproduction*, 27: 925-939, 1982.

Geisert, R. D., & Yelich, J. V. 1997. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 52:133–149.

Gilchrist, C., Cumberland, A., Walker, D., Tolcos, M. 2018. Intrauterine growth restriction and development of the hippocampus: implications for learning and memory in children and adolescents, *Lancet Child Adolesc. Heal.* 2: 755–764.

Gomes, J.D.F.; Gutrino, S.M.; Martelli, M.R.; Ishi, M.P.; Sobral, P.J.A.; Fukushima, R.S. 2007. Morfologia de órgãos digestivos e não digestivos de suínos de linhagens modernas durante as fases de crescimento, terminação e pós-terminação. *Acta Sci. Anim. Sci*, 29: 261-266.

Hay JR, W.W. Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm. Res.*, v.42, p.215-222, 1994.

Hedemann, M., Clausen, T., & Jensen, S. 2011. Changes in digestive enzyme activity, intestine morphology, mucin characteristics and tocopherol status in mink kits (*Mustela neovision*) during the weaning period. *Animal*, 5:394-402.

Helke, K. L., Ezell, P. C., Duran-Struuck, R., & Swindle, M. M. 2015. *Biology and Diseases of Swine. Laboratory Animal Medicine*, 695–769.

Hummel, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 1393-1399,

Ilekis, J. V., Tsilou, E., Fisher, S., Abrahams, V. M., Soares, M. J., Cross, J. C., Zamudio, S., Illsley, N. P., Myatt, L., Colvis, C., Costantine, M. M., Haas, D. M., Sadovsky, Y., Weiner, C., Rytting, E., & Bidwell, G. 2016. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an Executive Workshop Summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. *American journal of obstetrics and gynecology*, 215(1 Suppl): S1–S46.

Ito H. 2003. IL-6 and Crohn's disease. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. 2: 25–130.

Jayaraman, B.; Nyachoti, C.M. 2017. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim Nutr*, 3: 205-211.

Jimenez-Chillaron, J.C.; Patti, M.E. 2007. To catch up or not to catch up: Is this the question? Lessons from animal models. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 14:23-29.

Kesavan, K., & Devaskar, S. U. 2019. Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes. *Pediatric clinics of North America*, 66: 403-423.

Kogelman, L. J. A., Kadarmideen, H. N., Mark, T., Karlskov-Mortensen, P., Bruun, C. S., Cirera, S., Fredholm, M. 2013. An F2 Pig Resource Population as a Model for Genetic Studies of Obesity and Obesity-Related Diseases in Humans: Design and Genetic Parameters. *Frontiers in Genetics*, 4:29.

Kruglov, A. A. 2013. Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* (342): 1243–1246.

Lee, Anne C.C. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *The Lancet Global Health*, 1: e26 - e36.

Leitner, Y., Fattal-Valevski, A., Geva, R., Eshel, R., Toledano-Alhadeef, H., Rotstein, M., Harel, S. 2007. Neurodevelopmental Outcome of Children with Intrauterine Growth Retardation: A Longitudinal, 10-Year Prospective Study. *Journal of Child Neurology*, 5: 580–587.

Leksmono CS, Manzoni C, Tomkins JE, Lucchesi W, Cottrell G, Lewis PA. 2018. Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. *J Vis Exp*, 138:54377.

Li, N.; Shimeng, H.; Lili, J.; Wei, W.; Tiantian, L.; Bin Z.; Zhen, L.; Wang, J. 2018. Differences in the Gut Microbiota Establishment and Metabolome Characteristics Between Low- and Normal-Birth-Weight Piglets During Early-Life. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1798.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T) Method. *Methods*. 25:402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Mandruzzato, G., Antsaklis, A., Botet, F., 2008. Intrauterine restriction (IUGR). *Journal of Perinatal Medicine*, 4: 277-281.

Meredith, M. J. 1995. Pig breeding and infertility. In: Meredith, M.J.(Eds). *Animal breeding and infertility*.

Mickiewicz, M., Zabielski, R., Grenier, B., Le Normand, L., Savary, G., Holst, J. J., Oswald, C.C., Metges, P., Guilloteau, P. 2012. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 3: 225-239.

Murray, E, Fernandes, M, Fazel, M, Kennedy, S H, Villar, J, Stein, A. 2015. Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review. *BJOG* 2015, 122: 1062– 1072.

Nardoza, L. M. M., Araujo Júnior, E., Barbosa, M. M., Caetano, A. C. R., Lee, D. J. R., & Moron, A. F. 2012. Fetal growth restriction: current knowledge to the general Obs/Gyn. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 1: 1–13.

Neitzke, U., Harder, T. and Plagemann, A. 2011. Intrauterine Growth Restriction and Developmental Programming of the Metabolic Syndrome: A Critical Appraisal. *Microcirculation*, 18: 304-311.

Novac, M.V., Niculescu, M., Manolea, M.M., Dijmărescu, A.L., Ilescu, D.G., Novac, M.B. 2018. Placental findings in pregnancies complicated with RIUC - histopathological and immunohistochemical analysis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59:715–720.

Panzardi, A; Marques, B.M.F.P.; Heim, G; Bortolozzo, F. P.; Wentz, I. Fatores que influenciam o peso do leitão ao nascimento. 2009 *Acta Scientiae Veterinariae*, 37:49-60.

Peterson, L., Artis, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Review Immunology*, 14:141–153.

Pié, S.; Lallès, J. P.; Blazy, F.; Laffitte, J.; Sève, B.; Oswald, I. P. 2004. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets, *The Journal of Nutrition*, 134: 641–647.

Renfree, M. B. Implantation and placentation. In: *Reproduction in Mammals: Embryonic and fetal development*. Eds. CR Austin, RV Short. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.26-69, 1985.

Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Vonnahme, K. A., Johnson, M. L., Grazul-Bilska, A. T., Wallace, J. M., Caton, J. S., & Redmer, D. A. 2005. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, 26: 689-708.

Ross, M. G.; Desai, M. 2013. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. *Clinical obstetrics and gynecology*, 56: 529–536.

Sarr, O., K. Yang, Rgnault T. R. H. 2012. In Utero Programming of Later Adiposity: The Role of Fetal Growth Restriction. *Journal of Pregnancy*. 2012:1- 10.

Salan, R.A., Das, J. K., Bhutta, Z.A. 2014. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (17): 249–25

Sangild, P.T. Transitions in the life of the gut at birth. In: LINDBERG, J.E. & OGLE, B. *Digestive Physiology of Pigs*. CAB Internacional, London, 2001. Disponível em:http://books.google.com.br/books?id=_oewagVhYWkC&printsec=frontcover&dq=Biology+of+the+Intestine+in+Growing+Animals&lr=&source=gbs_similarbooks_s&cad=1#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 02 set 2020.

Sangild, P., Schmidt, M., Elnif, J. 2002 Prenatal Development of Gastrointestinal Function in the Pig and the Effects of Fetal Esophageal Obstruction. *Pediatr Res*, 52: 416–424.

Sarr, O., Thompson, J. A., Zhao, L., Lee, T. Y., & Regnault, T. R. 2014. Low birth weight male guinea pig offspring display increased visceral adiposity in early adulthood. *PloS one*, 9: e98433.

Sas-Statistical Analysis System Institute, Inc. SAS user's guide: Statistics. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p.

Seetharam, B., Yeh, K. Y., Moog, F., & Alpers, D. H. 1977. Development of intestinal brush border membrane proteins in the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 470:424–436.

Shanklin, D.R. e Cooke, R.J. 1993. Effects of intrauterine growth on intestinal length in the human fetus. *Biol Neonate*, 64: 76–81.

Sharma, D., Shastru, S., Farahbakhsh, N., S. P.2016. Intrauterine growth restriction – part 1 *Maternal-fetal e neonatal medicine*, 24: 3977-3987.

Sidiropoulou, E.J.; Paltoglou, G.; Valsamakis, G. 2018. Biochemistry, hormones and adipocytokines in prepubertal children born with RIUC evoke metabolic, hepatic and renal derangements, *Sci Rep*. 8:15691.

Sonnenberg, G. F., & Hepworth, M. R. 2019. Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*,19: 599-613.

Su, G., M. S. Lund, and D. Sorensen. 2007. Selection for litter size at day five to improve litter size at weaning and piglet survival rate. *J. Anim. Sci*. 85:1385–1392.

Tosh, D. N.; Fu, Q.; Callaway, C. W. McKnight, R. A., McMillen, I. C., Ross, M. G., Lane, R. H., & Desai, M. 2010. Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 299: G1023–G1029.

Tzschoppe, A., von Kries, R., Struwe, E., Rascher, W., Dörr, H.-G., Jüngert, J., Rauh, M., Beckman, M., Schild R., Goecke, J, Dötsch, J. 2017. Intrauterine Growth Restriction (IUGR) Induces Signs of Subclinical Atherosclerosis in 6-Year-Old Infants Despite Absence Of Excessive Growth. *Klinische Pädiatrie*, 04: 09–215.

Xing, Y., Zhang, J., Wei, H., Zhang, H., Guan, Y., Wang, X., & Tong, X. 2019. Reduction of the PI3K/Akt related signaling activities in skeletal muscle tissues involves insulin resistance in intrauterine growth restriction rats with catch-up growth. *PloS one*, 14: e0216665.

Valsamakis, G., Kanaka-Gantenbein, C., Malamitsi-Puchner, A. and Mastorakos, G. 2006, Causes of Intrauterine Growth Restriction and the Postnatal Development of the Metabolic Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092: 138-147.

Vereecke, L; Beyaert, R.; Loo, G. 2011. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17:584-593.

Vernunft A., Maass M., Brüssow K.P. 2018: Placental characteristics of German Landrace sows and their relationships to different fertility parameters . *Czech J. Anim. Sci.*, 63: 339-346.

- Wang, T.; Xu, R.J. 2005. Effects of colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs. *Biology of the Neonate*, 70: 339–348.
- Wang, J., Chen, L., Li, D., Yin, Y., Wang, X., Li, P., Dangotti, L. J., Hu, W., Wu, G. 2008. Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. *Journal Nutrition*, 138: 60-66.
- Wang, X.; Wu, W.; Lin, G.; Li, D.; Wu, G.; Wang, J. 2010. Temporal proteomic analysis reveals continuous impairment of intestinal development in neonatal piglets with intrauterine growth restriction. *Journal of Proteome Research*, 9: 924-935.
- Wang, F., Zuo, Z., Chen, K., Gao, C., Yang, Z., Zhao, S., Li, J., Song, H., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Ouyang, P., Zhou, Y., Shu, G., & Jing, B. 2018. Histopathological Injuries, Ultrastructural Changes, and Depressed TLR Expression in the Small Intestine of Broiler Chickens with Aflatoxin B₁. *Toxins*, 10:131.
- Weiss R. 2007. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *European J. Endocrinol*, 157: S39-S45.
- Wigmore P.M.C.; Stickland, N.C. Placental growth in the pig. *Anat. Embryol.*, v.173, p.263-268, 1985.
- Wilson J. 1999. The Barker hypothesis. An analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 39:1–7.
- Zeyda, M.; Farmer, D.; Todoric, J. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes* 31: 1420–1428.
- Wu, G., Bazer, F. W., Wallace, J. M., & Spencer, T. E. 2006. Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences I. *Journal of Animal Science*, 84: 2316–2337.
- Wu M.C., Chen Z.Y., Jarrell V.L., Dziuk P.J. 1989. Effect of initial length of uterus per embryo on fetal survival and development in the pig. *Journal of Animal Science*, 67, 1767–1772.
- Yilmaz, Ö., Katajisto, P., Lamming, D. et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake 2012. *Nature* (486): 490–495.
- Zabielski, R, Godlewski, M.M., Guilloteau, P. 2008. Control of development o gastrointestinal system in neonates. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59: 35-54.
- Zhang, S., Regnault, T. R., Barker, P. L., Botting, K. J., McMillen, I. C., McMillan, C. M., Roberts, C. T., & Morrison, J. L. 2015. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients*, 1:360–389.
- Zinkhan, E. K., Zalla, J. M., Carpenter, J. R., Yu, B., Yu, X., Chan, G., Joss-Moore, L., Lane, R. H. 2016. Intrauterine growth restriction combined with a maternal high-fat diet increases

hepatic cholesterol and low-density lipoprotein receptor activity in rats. *Physiological reports*, 13: e12862.

10.0. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Impacto do crescimento intra-uterino retardado sobre a saúde intestinal de suínos", protocolo do CEUA: 342/2016 sob a responsabilidade de Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/03/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	15/02/2017 a 30/09/2017
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Suíno / Large White
Nº de animais	50
Peso/Idade	0kg / 0(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda São paulo

Considerações posteriores:

27/03/2017	Aprovado na reunião do dia 27/03/2017. Validade: 27/03/2017 à 26/03/2022
------------	--

Belo Horizonte, 03/08/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516

