GIZELA MARIA AGOSTINI ZONTA

**EFEITOS TARDIOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A
RENOVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO
EPITÉLIO GÁSTRICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2017

GIZELA MARIA AGOSTINI ZONTA

**EFEITOS TARDIOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A
RENOVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO
EPITÉLIO GÁSTRICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Gama

Versão Original

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Agostini Zonta, Gizela Maria
Efeitos tardios do desmame precoce sobre a
renovação e diferenciação do epitélio gástrico em
ratos. / Gizela Maria Agostini Zonta; orientador
Patrícia Gama. -- São Paulo, 2017.
87 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Estômago. 2. Desmame precoce. 3. Proliferação.
4. Diferenciação. I. Gama, Patrícia, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gizela Maria Agostini Zonta

Titulo da Dissertação/Tese: Efeitos tardios do desmame precoce sobre a renovação e diferenciação do epitélio gástrico em ratos.

Orientador: Patrícia Gama

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p style="text-align: center;">Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p style="text-align: center;">COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.004/2015.

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 018/15/CEUA, datado de 10.02.15, e por solicitação do Profa. Dra. **Patrícia Gama**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Gizela Maria Agostini Zonta** ao Projeto de Pesquisa “*Expressão gênica, diferenciação celular e funções gástricas: distúrbios alimentares durante o desenvolvimento pós-natal podem alterar o programa de crescimento em ratos?*”, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **018** nas fls.**029** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Patrícia Gama**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Expressão gênica, diferenciação celular e funções gástricas: distúrbios alimentares durante o desenvolvimento pós-natal podem alterar o programa de crescimento em ratos?*" do qual participam o(s) aluno(s) **Juliana Guimarães Zulian**, Pós-Doutorando **Daniela Ogias**, Iniciação Científica **Larissa Yukari M. Hosoya**, **Isadora Rattes**, Estagiário **Gizela Maria Agostini Zonta**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **10.02.2015**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho

Ao Senhor Jesus, meu amparo e abrigo, meu amigo e amado Deus, sou grata por ter me concedido este sonho, que todas as coisas sejam por ti e para ti.

A minha querida e preciosa mamãe, Esmeralda, minha dádiva de Deus, exemplo de honra, amor, fidelidade, firmeza e dedicação. Você me sustentou, com suas orações ao longo dessa jornada, me amparou, me orientou, cuidou e se preocupou com tudo. Ao meu pai, Odécio, por ter mantido meus estudos, tornando este sonho mais próximo de ser realizado. Aos meus amados irmãos, Marcelo e Lilian, pelas orações, pelo incentivo e por acreditarem que seria possível.

A minha orientadora Dra. Patrícia Gama, minha gratidão por todo o cuidado, dedicação e competência atribuídos desde o momento em que fui recebida em seu laboratório até o dia de hoje, sou agradecida pela confiança que foi depositada em mim para a concretização deste projeto.

Agradecimentos

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelo ambiente agradável de trabalho e estudo, e pelo comprometimento em fornecer estrutura e recursos para o ensino e pesquisa.

À Juliana Guimarães Zulian, por seus ensinamentos e orientações, sua participação foi fundamental para a concretização deste estudo.

Ao Cruz Alberto Mendoza Rigonati, pelo apoio técnico, nos fornecendo materiais ótimos para o trabalho, assim como por sua generosidade e amizade. À Keth, Isadora e Melissa, pelo companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos.

À Larissa, Ludmila, Natália Dantas, pela amizade e por me ajudarem quando estava iniciando no laboratório e não tinha nenhum conhecimento dos procedimentos.

À Daniela Ogias, pelos ensinamentos transmitidos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Profa. Estela F. Bevilaqua, pela gentileza em possibilitar que adentrasse em seu laboratório e utilizasse equipamentos. As suas alunas, Aline e Carla, por suas orientações quando tinha dúvidas no *immunoblot*.

À Profa. Gláucia Maria Machado-Santelli, pela gentileza com que me permitiu utilizar equipamentos de seu laboratório.

À Profa. Marinilce Fagundes dos Santos, por seu gesto de carinho e atenção com que sempre me acolheu.

À Profa. Vanessa Morais Freitas, pela dedicação atribuída aos alunos e pelo incentivo, dando-me palavras de ânimo.

As minhas amigas de turma, Carol Serna, Caroline Guedes, Edinalda, Katrin, Aline Carvalho, por dividirem seus conhecimentos e estarem presentes em bons e maus momentos, agradeço seus conselhos.

Aos funcionários do biotério, pela responsabilidade e cuidado no tratamento dos animais.

Aos funcionários da biblioteca, pela competência e atenção dedicada aos alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por propiciarem recursos que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

“(...)Deleita-te também no Senhor, e te concederá os desejos do teu coração.

Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele o fará (...).”

Salmos 37:4-5

RESUMO

Zonta GMA. Efeitos tardios do desmame precoce sobre a renovação e diferenciação do epitélio gástrico em ratos. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O padrão alimentar regula a proliferação e diferenciação celular no epitélio gástrico de ratos durante o desenvolvimento pós-natal, e o desmame precoce induz a maturação precoce das funções gastrintestinais. No entanto, poucos estudos discutem os efeitos tardios do desmame precoce no estômago adulto. Nosso objetivo foi avaliar as respostas tardias do desmame precoce na massa corpórea, proliferação e diferenciação celular na mucosa gástrica. Ratos Wistar foram divididos em dois grupos: precocemente desmamados aos 15 dias (DP) e desmamados aos 21 dias (amamentado controle, A) (CEUA/ICB USP 18/2015). A massa corpórea, proliferação (imunomarcagem para Ki-67) e diferenciação celular (conteúdo de Mist1 e pepsinogênio foi avaliado por *immunoblotting*) foram monitoradas aos 15, 18, 30 e 60 dias pós-natal. Encontramos que a massa corpórea foi menor aos 18 e 21 dias no grupo DP (vs. respectivo A; $p<0,01$ e $p<0,05$). No entanto, aos 60 dias, diferenças não foram detectadas, mas as fêmeas DP apresentaram maior massa corpórea, apesar de não significativo ($p=0,08$). O desmame precoce também aumentou o índice de proliferação, a espessura da mucosa e profundidade da glândula aos 18 dias (vs. A; $p<0,05$), isto é, logo após o início do tratamento. Inversamente, um resultado oposto foi observado aos 30 dias, quando imunomarcagem para Ki-67 foi reduzida, assim como a espessura da mucosa nos ratos DP ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Aos 60 dias, não houve alterações significativas entre os grupos. Em ambos os grupos, notamos o padrão ontogênico de crescimento do órgão. Quanto à diferenciação, resultados indicaram que o DP induziu uma variação no conteúdo de Mist 1 e pepsinogênio C aos 18 dias ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). Em síntese, o DP mudou o padrão de ganho de peso corporal e crescimento do estômago imediatamente depois de iniciar a ingestão de alimento sólido, assim, enquanto alguns efeitos persistem na idade adulta, outros são compensados.

Palavras-chave: Estômago. Desmame precoce. Proliferação. Diferenciação.

ABSTRACT

Zonta GMA. Late effects of early weaning on gastric epithelium renewal and differentiation in rats. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Feeding pattern regulates cell proliferation and differentiation in rat gastric epithelium during postnatal development, and early weaning induces the precocious maturation of gastrointestinal functions. However, few studies discussed late effects of early weaning in adult stomach. Our aim was to assess the late responses of early weaning on body mass and gastric cell proliferation and differentiation in gastric mucosa. Wistar rats were divided into two groups: early-weaned at 15 days (EW) and weaned at 21 days (control suckling, S) (CEUA/ICB USP 18/2015). The body mass, cell proliferation (Ki-67 immunolabeling) and differentiation (Mist 1 and pepsinogen content evaluated by immunoblotting) were monitored at 15, 18, 30 and 60 postnatal days. We found that body mass was lower at 18 and 21 days in EW group (vs. respective S; $p<0,01$ and $p<0,05$). However, at 60 days, difference was not detected, because EW females presented higher body mass, although not significant ($p=0,08$). Early weaning also increased proliferation index and the thickness of mucosa and gland depth at 18 days (vs. S; $p<0,05$), i.e. soon after the onset of treatment. Conversely, an opposite result was observed at 30 days, when Ki-67 immunolabeling was reduced, as well as the thickness of mucosa in EW rats ($p<0,01$ and $p<0,05$, respectively). At 60 days, there was no significant change between the groups. In both groups, we noticed the ontogenic pattern of growth for the organ. As for differentiation, results indicated that EW induced a variation in Mist 1 and pepsinogen C content at 18 days ($p<0,05$ and $p<0,01$, respectively). In summary, EW changed the pattern of body weight gain and stomach growth immediately after the onset of solid food intake, and, whereas some effects persisted to adulthood, others were compensated.

Keywords: Stomach. Early weaning. Proliferation. Differentiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Organização anatômica e histológica do estômago de ratos.	25
Figura 2 – Fotomicrografia da mucosa gástrica referente à região do corpo	26
Figura 3 – Esquema das etapas desenvolvidas a partir do nascimento das ninhadas às coletas da mucosa gástrica.	39
Figura 4 – Efeitos do desmame precoce sobre o ganho de massa corpórea em ratos	51
Figura 5 – Efeitos do desmame precoce sobre a proliferação celular e tamanho da mucosa gástrica em ratos.	56
Figura 6 – Efeitos do aleitamento e do desmame precoce sobre o crescimento da mucosa gástrica.	58
Figura 7 – Efeitos distintos do desmame precoce sobre a diferenciação de células zimogênicas: avaliação do Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação do tempo de exposição da membrana ao filme de raio X para cada idade estudada	46
Tabela 2 – Indicação da diluição do tampão de <i>stripping</i> e o tempo de incubação por idade.	47
Tabela 3 – Representação da profundidade da fosseta por grupo experimental.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amamentado
AGRP	Proteína relacionada com Agouti
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
3,3'DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorídrica
DP	Desmame precoce
ECL	Reagente de detecção de quimioluminescência
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HE	Hematoxilina e Eosina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IOD	Densitometria óptica integrada
IP	Índice proliferativo
LHRH	Hormônio Liberador do hormônio luteinizante
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NaCl	Cloreto de sódio
NP-40	Nonil-fenoxi-polietoxi-etanol
NPY	Neuropeptídeo Y
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogênico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNAP	Sistema de detecção de proteínas
SPF	Livre de patógeno específico
TβRI	Receptor do fator de crescimento transformante β tipo 1
TBS	Salina tamponada com Tris
TGF-α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TGF-β3	Fator de crescimento transformante beta 3
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TTBS	Salina tamponada com Tris contendo Tween 20
UA	Unidade arbitrária
XBP 1	Proteína 1 ligada ao X-Box 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aleitamento e seus benefícios	18
1.2 Estômago de roedores	24
1.2.1 <i>Função e estrutura do estômago</i>	24
1.2.2 <i>Células epiteliais que compõe o corpo gástrico</i>	26
1.2.3 <i>Fator de transcrição Mist 1</i>	28
1.2.4 <i>Pepsinogênio C</i>	30
1.3 Desenvolvimento do epitélio gástrico	31
1.4 Desmame precoce	32
1.5 Justificativa	34
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.1.1 <i>Desmame precoce e tratamento</i>	37
3.2 Efeitos do desmame precoce sobre o Índice Proliferativo da mucosa gástrica	38
3.2.1 <i>Coleta do estômago para avaliação morfológica</i>	39
3.2.2 <i>Coleta de mucosa gástrica para análise por "Immunoblot"</i>	40
3.3 Atividade proliferativa avaliada a partir da reação de imuno-histoquímica para Ki-67	40
3.4 Índice proliferativo (IP)	41
3.5 Espessura da mucosa e profundidade da glândula gástrica	42
3.6 Análise da diferenciação de células zimogênicas por meio do <i>Immunoblot</i> para Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C	43
3.6.1 <i>Protocolo de Immunoblot para Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C</i>	44
3.6.2 <i>Controle de carregamento do Immunoblot</i>	46
3.7 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS	49

4.1 Massa corpórea	49
4.2 Efeitos dos desmame precoce sobre o Índice Proliferativo da mucosa gástrica	52
4.3 Profundidade da glândula gástrica.....	53
4.4 Espessura da mucosa gástrica.....	54
4.5 Profundidade da fosseta gástrica.....	54
4.6 Efeitos do desmame precoce sobre a diferenciação de células zimogênicas: <i>Immunoblot</i> para Mist 1 e Pepsinogênio C	59
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aleitamento e seus benefícios

Amamentar é o ato de nutrir e de estabelecer vínculo afetivo entre a mãe e o neonato, proporcionando repercussões favoráveis à saúde materna, assim como benefícios nutricionais, físicos, imunológicos, cognitivos e emocionais à criança, que podem perpetuar até a vida adulta¹⁻³.

Ao nascer, o contato pele a pele do neonato com a mãe contribui para aceitação e prontidão do lactente para amamentar e melhora a sucção do leite materno, o que favorece o estabelecimento do aleitamento na primeira hora de vida^{4,5}, assegurando ao recém-nascido a redução significativa de morbidades e mortalidade por causas infecciosas^{6,7}.

Durante os primeiros dias do pós-parto, o colostro é o primeiro fluido extrauterino que entra em contato com o trato gastrointestinal do neonato, sendo uma fonte de nutrição e proteção passiva contra patógenos, por regular a microbiota intestinal e modular as respostas imunes no intestino⁸⁻¹⁰, assim como, de estímulo para o crescimento e desenvolvimento de estruturas e órgãos^{11,12}. Nele estão presentes macronutrientes e micronutrientes, como carboidratos, proteínas e lipídios, vitaminas e minerais, além de imunoglobulinas, proteínas antimicrobianas, componentes anti-inflamatórios e fatores de crescimento^{8,13-15}.

Entre 5 dias a duas semanas do pós-parto, o colostro passa a ser incrementado com maiores concentrações de lactose, e, depois de quatro a seis semanas, o leite humano é considerado maduro¹³ contendo 3% a 5% de lipídios, 0,8% a 0,9% de proteínas, 6,9% a 7,2% de carboidratos, 0,2% de minerais, além de

vitaminas (exceto a vitamina K)¹⁶, macrófagos, imunoglobulinas, hormônios, citocinas e fatores de crescimento^{13,17,18}.

Em consonância, a literatura também relata mudanças na constituição do leite de ratos na transição de colostro para leite maduro. O leite materno de ratos, em relação ao colostro, continua com níveis de lipídios elevados, como ácido palmítico, aracdônico, linoleico e oleico, dentre outros, seguido de proteínas e baixa concentração de carboidratos, havendo diminuição da concentração de minerais como magnésio, zinco, cálcio, manganês ao longo do período de lactação¹⁵, sendo constatada a presença de hormônios como corticosterona¹⁹, GnRH²⁰, TSH²¹, IGF-1 e IGF-2²², somatostatina e LHRH²³, GH e prolactina²⁴, leptina²⁵, citocinas e fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF)^{26,27}.

Em paralelo, podemos destacar o papel do leite materno na adaptação da criança ao ambiente extrauterino, por meio das variações de seus componentes¹¹. Puddington e Matson²⁸ (2008) demonstraram que a exposição de ratas lactantes à ovalbumina por via nasal, proporcionou em sua prole, com 6 a 8 semanas de idade, diminuição de resposta inflamatória eosinofílica nas vias aéreas, bem como a produção de anticorpos específicos de ovalbumina e de citocinas.

Em virtude dos benefícios do aleitamento, a Organização Mundial da Saúde recomenda aleitamento exclusivo (somente leite materno) ao longo dos 6 meses de vida da criança e introdução de alimentos sólidos, bem como outros líquidos, juntamente ao leite materno, até os dois anos de idade²⁹. Todavia, as estimativas revelam que, no Brasil, a prevalência de aleitamento exclusivo até os seis meses de vida do neonato é 9,3% inferior ao verificado no 30º dia de vida do recém-nascido, sendo que a prevalência de amamentação no primeiro ano é 50% menor quando comparada aos 30 dias de vida do neonato³⁰. E, globalmente, cerca de metade dos

neonatos com menos de 1 mês, e 3 em cada 10 crianças entre 1 e 5 meses de vida são amamentadas exclusivamente, o que resulta em uma prevalência de morte (11,6%) de crianças com menos de 5 meses, (informações de 2011)³¹.

de Araújo et al.³² (2008) e de Oliveira et al.³³ (2015) apontaram que o contexto sociocultural e familiar, como a inserção da mulher no mercado de trabalho, o conhecimento pautado no discurso biomédico, bem como falhas na conduta assistencial de enfermagem interferem e prejudicam a prática do aleitamento materno, condicionando a problemática do desmame antes dos seis meses de vida.

Desta forma, repensar as práticas profissionais de saúde buscando a promoção de um olhar atento aos aspectos psicossociais, físicos, econômicos, culturais e religiosos, que envolvem a família e o binômio mãe/bebê, possibilita não apenas suporte técnico à lactação, mas a orientação e o aconselhamento necessários para tornar a mulher protagonista do seu processo de amamentar e esclarecida quanto aos benefícios desta ação², que não se restringe ao período perinatal, mas se estende para a infância, adolescência e vida adulta.

Estudos discutem que a mudança no padrão nutricional ocorrida nos primeiros anos de vida pode resultar em alterações epigenéticas, que podem se manifestar em longo prazo. Este evento pode ser denominado programação ou mesmo plasticidade do desenvolvimento, que consiste em “[...] um processo no qual um estímulo aplicado em um período crítico ou sensível do desenvolvimento, resulta em um efeito de longo prazo ou permanente na estrutura ou função do organismo [...]”³⁴, o que pode repercutir em doenças como obesidade, diabetes e hipertensão^{35,36}. Diversos estudos realizados em humanos e animais têm confirmado tais evidências, apontando a relação entre o aleitamento e o desenvolvimento de determinadas patologias na vida adulta.

Shields et al.³⁷ (2006) avaliaram a influência da duração da amamentação sobre a condição de obesidade na adolescência. O estudo mostrou que o aleitamento mantido por um longo período protege contra a obesidade, contudo quando são consideradas variáveis de confusão, como os índices de massa corporal dos pais, fatores biológicos e estilo de vida, esta condição protetiva diminui. Rebhan et al.³⁸ (2009), em um estudo de coorte prospectivo na Alemanha, também identificaram que crianças não amamentadas e amamentadas por menos de 4 meses apresentaram, aos 6 e 7 meses de vida, massa corpórea superior às crianças amamentadas por 4 meses ou mais.

Em experimentos envolvendo animais, Lima et al.³⁹ (2013) constataram que ratos Wistar submetidos ao desmame precoce no 18º dia de vida, por meio do enfaixamento das mamas das lactantes, apresentaram maior ganho de massa corpórea, bem como hipertrofia dos adipócitos visceral e subcutâneo em animais adultos, quando comparado aos animais desmamados aos 21 dias. Evidências similares foram observadas por Peixoto-Silva et al.⁴⁰ (2017), os quais mostraram que ratos desmamados precocemente 18º dia de vida apresentaram menor ganho de massa corpórea do 18º ao 21º dia, mas maior área de adipócitos, hiperfagia e hiperleptinemia na vida adulta, em comparação ao grupo controle desmamado no 21º dia. Tais pesquisas em animais indicam que o período de lactação é crítico para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta.

Outros estudos discutiram a repercussão da variação dos componentes do leite materno sobre o desenvolvimento de patologias no animal adulto. Os autores notaram que o ganho de massa corpórea na idade adulta está relacionado ao tipo de nutriente fornecido às lactantes durante o período de aleitamento, sendo constatado que filhotes aleitados por mães, que receberam dieta com restrição energética

obtiveram maior ganho de massa corpórea do que o controle⁴¹. Somado a isto, pesquisadores têm associado o aleitamento à menor probabilidade de desenvolvimento do diabetes do tipo 2³⁶.

Estudos mostraram que o aumento da duração do aleitamento, reduziu os riscos de tolerância a glicose em crianças com 9,5 anos e diminuiu a resistência à insulina em crianças com 5 anos⁴². Além disso, as crianças amamentadas por pelo menos 4 meses tiveram menor risco de desenvolver diabetes aos 21 anos de vida⁴³ e, aquelas aleitadas por 6 meses ou mais, apresentaram redução dos valores de pressão arterial sistólica em crianças com 5 anos⁴⁴. Outros efeitos benéficos do aleitamento foram descritos na literatura.

Kusunoki et al.⁴⁵ (2010) verificaram menor prevalência de bronquite asmática entre as crianças de 7 a 12 anos, que receberam amamentação completa e leite materno, associado ao leite artificial, em comparação com aquelas que foram aleitadas apenas com fórmula infantil. Outra pesquisa mostrou que a amamentação por 4 meses ou mais reduziu os riscos de rinite alérgica em crianças aos 3 anos⁴⁶. Os neonatos que foram amamentados por mais de 6 meses se mostraram mais protegidos contra otite e eczema aos 2 anos e infecções de ouvido e garganta aos 6 anos⁴⁷⁻⁴⁹, as quais foram reduzidas em 31% a 53% no primeiro ano de vida em crianças amamentadas por 9 meses ou mais, e de 63% a 87% quando amamentadas exclusivamente por 6 meses ou mais⁵⁰.

Estudos utilizando camundongos também constataram que, eventos estressores ocorridos durante o período de lactação, como a substituição do leite materno por ração no 14º dia, pode antecipar o desenvolvimento estrutural de regiões da amígdala envolvidas na regulação do estado de ansiedade e, desta forma, induzir a um menor estado de repouso aos 17 e 19 dias de vida pós-natal e

de ansiedade aos 21 e 35 dias, em relação ao grupo controle desmamado aos 21 dias⁵¹. Tais resultados também foram apontados por Kikusui et al.⁵² (2005), os quais constataram que a prole submetida à privação materna aos 15 dias de vida pós-natal, apresentou comportamento ansioso na vida adulta.

Em consonância, a literatura destaca que o aumento da duração da amamentação melhora o desenvolvimento motor aos 10, 14 e 17 anos de vida da criança⁵³, assim como a inteligência verbal⁵⁴, capacidade de linguagem⁵⁵ e o quociente de inteligência⁵⁶ na infância. Autores questionaram em seus estudos se os fatores imunológicos presentes no leite materno atuariam no desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso de camundongos. Esta pesquisa mostrou que a diminuição dos níveis de TNF- α no leite levaram ao aumento da proliferação de células neurais no giro dentado do hipocampo em filhotes com 14 dias amamentados e, conseqüentemente, aumento da memória espacial e contextual, quando a prole, em idade adulta, foi submetida a ambientes adversos¹².

Deve-se mencionar também, que durante a amamentação, elementos tais como o alto pH gástrico, a ausência de pepsina luminal, e a presença de macroproteínas acessórias no leite desfavorecem a digestão proteica e, desta forma, permitem a absorção intacta das moléculas no intestino delgado^{57,58}. Além disso, a frequência de amamentação determinada em intervalos em bebês, e constante em ninhadas de animais de laboratório, permite o contato permanente dos peptídeos do leite com a mucosa gástrica, mesmo que estes estejam em concentrações baixas.

Indubitavelmente, o leite por meio de suas moléculas tem papel modulador do crescimento, da renovação e proteção do organismo¹². No estômago, Gama e Alvares⁵⁹ (1996) evidenciaram que hormônios presentes no leite de ratas como somatostatina e LHRH promovem regulação da proliferação celular no epitélio

gástrico. Neste estudo, ratos de 18 e 22 dias foram submetidos a 20 h e 24 h de jejum, quando receberam os hormônios por gavagem. Os resultados mostraram que ratos de 18 dias apresentaram maior atividade proliferativa que os animais em jejum não tratados com hormônios.

O trabalho de Ogias et al.⁶⁰ (2010) apontou que ratos, submetidos a abrupta mudança de leite materno para ração, desmame precoce, no 15º dia de vida pós-natal, quando em jejum no 17º dia, apresentaram aumento do número de células imunomarcadas para TGF- β 3 e T β RI quando comparado ao grupo amamentado, o que pode ter resultado em inibição da proliferação celular e, desta forma, no aumento do risco de desenvolvimento de úlceras gástricas^{61,62}. A fim de compreender de forma mais clara os efeitos da substituição do leite materno por ração, primeiramente, será abordado os aspectos funcionais, anatômicos e histológicos do estômago.

1.2 Estômago de roedores

1.2.1 Função e estrutura do estômago

O estômago é um órgão que apresenta basicamente três funções: 1) secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, água, eletrólitos, fator intrínseco e glicoproteínas; 2) síntese de hormônios, como gastrina, ghrelina (do original “Gh-relin”), somatostatina, colecistoquinina e outros; 3) mistura do alimento ao fluido estomacal⁶³.

Anatomicamente, o estômago de roedores possui duas porções distintas: a córnea, que apresenta revestimento fino, pálido e transparente; o corpo e antro, com revestimento externo espesso, pigmentado e vascularizado, sendo o revestimento interno, do corpo, formado por uma camada espessa, enrugada, bastante

vascularizada e pigmentada, e, do antro, por uma camada mais fina e menos vascularizada⁶⁴.

A análise histológica mostra que a mucosa gástrica de roedores pode ser dividida em três regiões: córnea, corpo e antro (Figura 1). Subjacente ao esôfago, temos a região da córnea, constituída por epitélio estratificado queratinizado. Seguido do corpo gástrico, formado por profundas glândulas oxínticas e fossetas menos extensas. A partir do corpo há uma área de transição, com glândulas tubulares, as quais são seguidas por uma porção antral, que secreta muco e hormônios, apresentando glândulas tubulares menos profundas e uma fosseta mais longa⁶⁴⁻⁶⁶.

Figura 1 – Organização anatômica e histológica do estômago de ratos. O bolo alimentar, a partir do esôfago, segue para o estômago e intestino delgado, conforme indicado pelas setas. Fonte: Fiore⁶⁷ (2013).

A porção glandular da mucosa gástrica é composta por uma monocamada de células epiteliais que adentram em direção à lâmina própria, formando uma estrutura tubular simples ou ramificada, dispostas em três segmentos: istmo, colo e base⁶⁴ que se abre para o lúmen pela fosseta⁶⁵, conforme mostrado na Figura 2A.

Figura 2 – Fotomicrografia da mucosa gástrica na região do corpo do estômago. (A) Divisão da mucosa gástrica em fosseta e glândula, bem como a subdivisão da glândula em istmo, colo e base. (B) Indicação das células epiteliais presentes na região do corpo gástrico. Imagens obtidas a partir de animais de 60 dias. Cortes corados em Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento original: 20 x.

1.2.2 Células epiteliais que compõe o corpo gástrico

No corpo gástrico, encontram-se diferentes populações de células epiteliais como mucosas superficiais e do colo, células parietais, células zimogênicas, células enteroendócrinas e células com estrutura indiferenciada, podendo tornar-se uma célula-tronco multipotente^{64-66,68,69} (Figura 2B), sendo esta região responsável pela maioria das funções gástricas⁷⁰. Logo, utilizamos essa porção do epitélio gástrico, como objeto de estudo.

Karam et al.⁷¹ (1993) propuseram que as células epiteliais gástricas originam-se a partir de células-tronco localizadas na interface istmo-colo da glândula na região do corpo em animais adultos, sendo constatado por Matsuo et al.⁷² (2017), por meio de marcadores de células-tronco, que estas estão presentes na porção do istmo, bem como em células zimogênicas da base da glândula. Em adultos, considera-se que na unidade fosseta e glândula, as células derivem de células-

tronco. Acredita-se que esta célula entre em ciclo lentamente e mantenha uma população pequena através de divisões assimétricas, a partir da qual as células-filhas saem deste nicho e originam diferentes tipos celulares^{69,73,74}.

Stange et al.⁷⁵ (2013) constataram um reservatório de células zimogênicas positivas para *Troy* (marcador de células-tronco) na base da glândula gástrica. Assim, embora as células-tronco do epitélio gástrico estejam localizadas e proliferando na interface istmo-colo, a pequena população zimogênica *Troy+*, que está protegida na base da glândula, pode ser requerida para se diferenciar e dar origem aos diferentes tipos celulares do epitélio gástrico quando injúrias atingirem as regiões superficiais da mucosa^{75,76}.

Em filhotes, a disposição das células em proliferação ocorre ao longo de toda a glândula gástrica, não havendo uma região onde essas células estão mais concentradas. Assim, o compartimento proliferativo, como presente na mucosa de ratos adultos⁷⁷, pode ser identificado somente a partir de 21 dias, quando as regiões da glândula são definidas e as células em divisão ficam concentradas na interface entre o istmo e o colo⁷⁸.

Nos adultos, as células-tronco, localizadas na porção istmo-colo, se diferenciam e, concomitantemente, migram para cima e para baixo. Estas células dão origem a outras iguais a elas e também a: células pré-mucosas, que migram em direção à fosseta e à superfície luminal, se diferenciando em células mucosas superficiais; células pré-parietais, que têm migração bidirecional, formando as células parietais; células pré-enteroendócrinas, que também migram em direção ao lúmen e à base, originando as células enteroendócrinas; e células pré-mucosas do colo, que migram em direção à região do colo, onde se diferenciam em células mucosas do colo; algumas destas células continuam migrando em direção à base da

glândula, passam por um estágio de transição para originar células zimogênicas^{69,71,79}.

O epitélio da mucosa está em contato com o lúmen e é composto de células mucosas superficiais, as quais formam a fosseta, estando também presente no istmo^{80,81}. Ao longo do processo de migração, essas células tornam-se especializadas em sintetizar e secretar mucina e fator Trefoil 1^{81,82}. Em todas as porções da unidade, fosseta e glândula, mas em sua maioria no istmo e colo da porção glandular, as células parietais estão presentes e se renovam a cada 54 dias^{80,83,84}. Este tipo celular secreta de íons^{80,83}, o que reduz o pH do lúmen gástrico. Os hormônios também são secretados na cavidade gástrica por meio das células enteroendócrinas, as quais estão dispostas na fosseta e nos três compartimentos da glândula, mas em maior concentração na base da mesma⁸⁵.

Na região do colo, encontramos as células mucosas do colo, que apresentam *turnover* de 16 dias, formato triangular, com a porção basal direcionada para a lâmina própria e a apical para o lúmen, local em que secretam mucina 6 e o fator Trefoil 2^{69,74,80,86,87}. As células zimogênicas maduras têm sua localização restrita à porção da base da glândula, havendo maior concentração de células nas partes média e baixa da base, apresentando um *turnover* de 138 dias^{74,80,87}. A completa diferenciação em célula zimogênica caracteriza-se pela presença de grânulos secretórios homogêneos subjacentes a membrana apical, núcleo e retículo endoplasmático rugoso na porção basal, bem como, vesículas secretórias na face trans do Aparelho de Golgi^{79,87,88}. Diversos fatores de transcrição atuam nos processos de especialização celular⁸⁹, como o fator de transcrição Mist 1.

1.2.3 Fator de transcrição Mist 1

O fator de transcrição Mist 1 pertence à família do fator de transcrição *helix-loop-helix basic*⁸⁹ e está presente em células secretórias serosas e mucoserosas de diferentes tecidos como: as células da glândula parótida e da glândula lacrimal; as células acinosas do pâncreas; célula da próstata; do intestino delgado como as células de Paneth e as células zimogênicas, no estômago⁹⁰. A expressão gênica de Mist 1 é induzida pelo fator de transcrição XBP 1 (*x-box binding protein 1*)⁹¹. Essa proteína ativa a transcrição de genes-alvos que estão envolvidos na organização estrutural do aparato secretor da célula, de forma que na ausência de Mist 1, a célula adquire formato cubóide, com citoplasma apical atrofiado, vesículas menores e menos abundantes^{79,92,93}. De acordo com Tian et al.⁹⁴ (2010) foram identificados 16 genes, que podem ser alvos do fator Mist 1, como Rab3D e Rab26, tais proteínas estão envolvidas na formação de grânulos secretores em células gástricas. A Mist 1 também regula a expressão gênica de Mb1, a qual promove organização do aparato secretor das células zimogênicas⁹⁵.

Esse papel de Mist 1 foi evidenciado em outros órgãos como o pâncreas e fígado. A Mist 1 foi descrita como fundamental para a exocitose de enzimas, visto que o grupo *knockout* para Mist 1 não respondeu a estímulos indutores de secreção, assim como foi alterada a disposição dos grânulos zimogênicos na porção apical das células acinosas e do retículo endoplasmático e núcleo na porção basal, o que resultou em células acinosas nos animais adultos do grupo *knockout* semelhantes às células embrionárias⁹⁶. Chikada et al.⁹⁷ (2015) também evidenciaram a participação de Mist 1 na diferenciação de hepatoblastos em hepatócitos maduro.

Em outras pesquisas verificou-se que a proteína Mist 1 induz a transcrição de genes que modificam o aparato secretor das células mucosas do colo em célula zimogênica, por promover alterações na organização estrutural e diferenciação

terminal deste tipo celular, sendo a Mist 1 considerada um marcador de maturidade desta célula^{79,91,98,99}. No rato, os grânulos contidos neste tipo celular consistem de fator intrínseco e pepsinogênio^{100,101}, além disso, nesta célula há expressão de moesina, uma proteína que promove a ligação do citoesqueleto de actina à membrana apical da célula¹⁰² e pode estar envolvida na secreção de pepsinogênio¹⁰¹.

1.2.4 Pepsinogênio C

As células zimogênicas sintetizam e secretam pepsinogênio, na forma pró-enzima inativa, ou seja, uma porção pré, que se refere a uma sequência sinal, e a proenzima, um peptídeo ativado e a região da enzima ativa¹⁰³. Esse peptídeo consiste em zimogênios inativos que podem ser convertidos em pepsina¹⁰⁴. A literatura descreve 7 tipos de isozimogenos de pepsinogênio, sendo os isozimogenos 1 a 5, agrupados como pepsinogênio A e isozimogeno 6 e 7, denominado pepsinogênio C, ambos presentes em ratos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Estudos mostram que essas proenzimas são codificadas por genes de cromossomos distintos, bem como apresentam composições distintas^{105,108,109}.

Com a síntese do peptídeo e formação dos grânulos secretores, estímulos provenientes de secretagogos podem liberar o conteúdo dos grânulos por exocitose para o lúmen¹¹⁰. A proenzima lançada em meio ácido (pH<4) sofre uma mudança em sua conformação, que consiste na redução da interação eletrostática com a porção carboxil da enzima ativa e, conseqüentemente, clivagem da porção N-terminal do peptídeo ativado, sendo formada a pepsina¹⁰³.

A secreção de pepsinogênio é estimulada por secretagogos que podem ser hormônios peptídicos como prostaglandina, peptídeo intestinal vasoativo, colescistocinina e carbacol¹¹⁰⁻¹¹². Esses fatores induzem o aumento de AMP cíclico e

cálcio intracelular¹¹³. As alterações desses mensageiros intracelulares conduzem a modulação de proteínas kinases que promovem a ativação da cascata de sinalização e, com isto, a secreção de pepsinogênio^{114,115}.

Ge et al.¹¹⁶ (1998) detectaram células marcadas para pepsinogênio na mucosa gástrica de ratos com 18,5 dias de vida intraútero, havendo um aumento dessa população no 21º dia de vida pós-natal. Este aumento da concentração de pepsinogênio com o decorrer da maturação do órgão deve-se a atividade de hormônios, como o glicocorticoide que tem sido relacionado ao desenvolvimento de órgãos e estruturas em embriões e após o nascimento. Em roedores, os níveis séricos de glicocorticoide aumentam no final da gestação e se elevam durante o período de transição do aleitamento para o desmame⁵⁷. E, no estômago, induzem o aumento da atividade de pepsinogênio, bem como estimulam a diferenciação de células zimogênicas, dessa forma, a literatura tem descrito o pepsinogênio C como um marcador de diferenciação da mucosa gástrica¹¹⁷.

1.3 Desenvolvimento do epitélio gástrico

Os aspectos morfológicos da mucosa gástrica são modificados durante o período gestacional e pós-natal. Aos 12,5 dias de gestação, observou-se um epitélio simples constituído por células epiteliais indiferenciadas, que se mostrou pseudoestratificado, com formação inicial do lúmen glandular no 14º dia, bem como aumento da extensão do lúmen glandular no 15º dia e separação das unidades glandulares pelo tecido conjuntivo aos 16 dias. Além disso, esse estudo apontou que horas após o nascimento, todo epitélio era composto por células em divisão, sendo constatadas células mucosas superficiais, células parietais e zimogênicas, todas ainda imaturas. Do 14º para o 21º dia, foram verificadas células mucosas do colo,

bem como aumento no número de células parietais, e, somado a isto, diferenciação dos tipos celulares e migração dos mesmos para porções distintas da glândula¹¹⁸.

Os processos de maturação da mucosa gástrica permanecem até o desmame, que corresponde à fase da terceira para a quarta semana de vida pós-natal do rato, quando o aleitamento é gradativamente substituído pela ingestão de alimento sólido⁵⁷. Nesse período, é observado espessamento da mucosa gástrica, devido à formação das glândulas e constituição de todos os tipos celulares¹¹⁸. E, em toda a extensão da glândula estão presentes células em divisão⁷⁸ e em diferenciação, superando as taxas de morte celular, resultando em crescimento e desenvolvimento do órgão¹¹⁹, de forma que em animais com 21 dias de idade é possível identificar o istmo, colo e a base da glândula¹¹⁸. De maneira distinta, no epitélio glandular do animal adulto, as populações celulares em proliferação estão localizadas na região istmo- colo⁷⁸, sendo direcionadas para promover o processo de renovação epitelial¹²⁰, bem como reparação de danos.

1.4 Desmame precoce

Os mecanismos que coordenam o crescimento e desenvolvimento órgãos podem ser influenciados por fatores genéticos, hormonais e de dietas¹²¹. Diferentes estudos mostraram que a expressão, síntese e secreção das mucinas no trato gastrointestinal são processos regulados pelo padrão de alimentação durante o desenvolvimento pós-natal^{122,123}. Em adição, a privação alimentar por meio do jejum induziu o aumento da proliferação celular em filhotes, contrariamente, em adultos, este modelo reduziu os processos de divisão celular^{77,78}.

A retirada antecipada do leite e de todos os seus fatores, assim como a separação abrupta dos cuidados maternos no 15º dia caracteriza o modelo de desmame precoce. Esta condição foi descrita como indutora de mudanças

morfológicas e funcionais na mucosa gástrica de filhotes. Ghizoni et al.¹²⁴ (2014) mostraram que o desmame precoce, no 15º dia, resultou em aumento dos níveis de corticosterona nos dois primeiros dias pós-desmame e se manteve no terceiro dia, todavia foi verificado aumento da concentração da proteína de ligação de corticosterona nessas idades, o que denota uma reação protetiva do organismo contra possíveis ações deletérias do glicocorticoide na mucosa gástrica.

Além disso, o desmame precoce induz a atividade da enzima ornitina descarboxilase, a qual está envolvida na síntese e acúmulo de poliaminas, necessárias para o rápido crescimento celular¹²⁵. E, em associação, foi descrito que o desmame precoce, aos 15 dias, também aumenta a imunomarcagem e expressão gênica de TGF- α , assim como a imunomarcagem de seu receptor, EGFR, na mucosa gástrica de ratos com 18 dias de vida pós-natal, em comparação aos animais amamentados até 21 dias, sendo o TGF- α um indutor da atividade proliferativa¹²². Estudos descreveram que o desmame precoce (no 15º dia) estimula a fosforilação de ERK1/2 e aumento da expressão proteica de p21 pela via de sinalização da MAPK^{126,127}. Isso resultou aos 18 dias de vida de ratos precocemente desmamados, no aumento da atividade proliferativa e da espessura da mucosa gástrica^{119,126}. Assim como, estimulou a diferenciação de células mucosas do colo, o que levou ao aumento da síntese de mucina 6 e o aparecimento da atividade pepsinogênica na mucosa gástrica em filhotes^{122,125}, o que sustenta a ideia de que o desmame precoce pode antecipar a maturação gástrica¹²² nos filhotes. Somado a isto, o desmame precoce aumenta os níveis de expressão gênica e o número de células marcadas para ghrelina, a qual pode estar envolvida na atividade proliferativa das células epiteliais do estômago¹²⁸.

Na literatura, poucos estudos retratam as repercussões do desmame precoce sobre a cinética celular, ou seja, os processos proliferativos e de diferenciação no epitélio gástrico de animais adultos. Zulian et al.¹²⁹ (2017) propuseram avaliar a influência da corticosterona no desmame precoce, realizado aos 15 dias de vida pós-natal de ratos, sobre os processos de diferenciação das células mucosas do colo e células zimogênicas, assim como sua consequência no epitélio gástrico de animais jovem-adultos. Neste estudo, foi constatado que a substituição de leite por ração levou ao aumento da expressão gênica que codificam mucinas, Mist 1 e pepsinogênio C em filhotes, sendo verificado que tal resposta foi mantida aos na vida juvenil. Em adição, os autores constataram que o desmame precoce promove o aumento da população de células mucosas do colo aos 18 dias de vida e esta reposta se mantém aos 30 dias.

Jacobs et al.¹³⁰ (1984) mostraram que o desmame precoce, aos 15 dias de vida pós-natal, em ratos Wistar, influenciou as características morfológicas e a proliferação de determinados tipos celulares em filhotes, resultando no aumento do tamanho de células parietais e zimogênicas, e diminuição do número de células parietais, contudo tais alterações não foram observadas aos 100 dias.

1.5 Justificativa

Em vista dos efeitos do desmame precoce aos 15 dias sobre a mucosa gástrica em filhotes, questionamos se essas modificações poderiam ser mantidas na vida adulta. Todavia, as buscas na literatura não trouxeram nenhum dado a respeito das consequências da abrupta mudança de leite materno para ração sobre a cinética celular e os processos de diferenciação no epitélio gástrico de ratos adultos.

Nosso grupo tem estudado o papel de distúrbios alimentares durante o desenvolvimento pós-natal, considerando variações de condição alimentar (jejum) e

de padrão e qualidade de ingesta (desnutrição proteica, desmame precoce e separação materno-neonatal). Entretanto, buscamos até este momento detalhar as respostas iniciais e os gatilhos moleculares imediatos que modificam o crescimento e a maturação da mucosa gástrica do rato. Consideramos que se tornou necessário estudar os efeitos na vida adulta e avaliar se as respostas encontradas durante o desenvolvimento pós-natal perduram e afetam o funcionamento do estômago.

Sabemos que perturbações do padrão alimentar durante o desenvolvimento pós-natal modificam a resposta da mucosa gástrica ao estresse e podem alterar o crescimento e a maturação das funções digestivas. Considera-se que essas variações podem ter papéis importantes em doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, alergias alimentares e ulcerações.

Em epitélios de renovação rápida, como o que reveste o estômago, a diferenciação errônea de células está no cerne do estudo de diferentes lesões. Soma-se a isto o fato de que a interrupção da amamentação é uma prática social constante tanto por meio do desmame precoce quanto pela separação materna diária, e essas condições podem ter consequências importantes para o crescimento dos indivíduos.

Consideramos que este estudo poderá trazer informações importantes para outros projetos destinados à pesquisa básica (ciência e conhecimento), e aplicada (clínica), ao estabelecer experimentalmente como e quais parâmetros se modificam nas funções gástricas em indivíduos que passam por distúrbios alimentares durante o crescimento. A importância da amamentação já é ressaltada anualmente em campanhas no país, e os resultados dessa proposta poderão corroborar e ampliar o conjunto de informações para divulgação e conscientização da população (impacto social).

2 OBJETIVOS

Neste estudo, o objetivo geral consistiu em avaliar os efeitos tardios do desmame precoce sobre a proliferação e diferenciação de células zimogênicas na mucosa gástrica, a fim de verificar se as modificações induzidas por esse padrão de alimentação são mantidas na vida adulta e se comprometem o funcionamento do estômago. Dessa forma, estudamos o perfil proliferativo, bem como a espessura da mucosa e profundidade da glândula e fosseta gástrica diante das alterações do padrão alimentar, além dos níveis proteicos do Mist 1 e pepsinogênio C, que caracterizam a diferenciação e atividade das células zimogênicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo utilizou ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, produzidos em condições *Specific Pathogen Free* - SPF – ou seja, livre de patógenos específicos e agentes oportunistas), que foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com acesso à ração e água *ad libitum*, em regime de 12 h claro e 12 h escuro, com temperatura e exaustão controladas.

Os procedimentos experimentais receberam aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo 18/2015-2019). Fundamentado nesta autorização, desempenhamos o seguinte planejamento com a finalidade de obter animais para uso em experimentos: mantivemos duas a três fêmeas em acasalamento com um macho por 4 a 5 dias, ao final deste período, os machos foram retirados e as fêmeas continuaram juntas até três dias antes do término do período gestacional, quando foram distribuídas em gaiolas individuais. Para estudo, considerou-se o dia de nascimento das ninhadas como dia 0 (zero).

No terceiro dia de vida pós-natal, o tamanho das ninhadas foi ajustado de forma a manter 8 a 9 filhotes por fêmea. As ninhadas permaneceram com as mães em aleitamento até o 14º dia de vida.

3.1.1 Desmame precoce e tratamento

No 15º dia de vida pós-natal, às 10h00, os filhotes foram divididos em dois grupos: amamentado controle (A) e desmame precoce (DP). O grupo controle A permaneceu com a mãe, sendo nutrido com leite materno, ração (Nuvilab CR-1, Quimtia S/A, registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -

04453, Colombo, PR, Brasil) e água até o desmame definitivo, realizado no 21º dia de vida pós-natal e, a partir daí, receberam apenas ração e água. Em contrapartida, os filhotes do grupo DP foram separados das mães e transferidos para outra gaiola, onde a dieta passou a ser uma pasta de ração e água, disponível 24 h por dia¹²².

O tratamento dos animais precocemente desmamados compreendeu a oferta de pasta de ração e água com uma pipeta Pasteur descartável, duas vezes ao dia (no período da manhã, às 9:00 h e, à tarde, às 15:00 h), somado a massagens na região abdominal para facilitar a excreção de urina e fezes¹²². Estes cuidados iniciaram-se no 15º dia, à tarde, e se estenderam até o período da manhã no 19º dia de vida pós-natal. Com a ressalva de que no 18º dia, à tarde e, no 19º dia, o tratamento consistiu somente da oferta de pasta de ração e água.

3.2 Efeitos do desmame precoce sobre o Índice Proliferativo da mucosa gástrica

Os animais dos grupos, amamentado e desmame precoce, nas idades de 15 e 18 (filhotes), 30 (jovem-adulto) e 60 (adulto) dias foram submetidos, às 10:00 h, à anestesia com injeção via intraperitonal de cloridrato de cetamina (Dopalen) e xilazina (Anasedan) (Vetbrands®, Paulínia, SP, Brasil), na proporção 1:1, utilizando um volume total de 0,5 mL para cada 100 g de massa corpórea. Sob efeito do anestésico, o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre uma placa de cortiça, sendo realizada uma incisão na parede abdominal para a retirada do estômago.

Em todos os procedimentos considerou-se no mínimo 4 animais por grupo experimental de ambos os sexos, sendo o número total de animais indicado nos resultados. A massa corpórea dos animais foi monitorada ao longo de todo o processo. E, para esclarecer de maneira resumida os procedimentos efetuados, foi elaborado um esquema retratado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema das etapas desenvolvidas a partir do nascimento das ninhadas às coletas da mucosa gástrica.

3.2.1 Coleta do estômago para avaliação morfológica

Os estômagos foram coletados, abertos pela menor curvatura, lavados em solução de cloreto de sódio a 0,9%, a fim de remover o conteúdo gástrico, e esticados em cortiça para fixação em formaldeído a 10%. O órgão foi mantido imerso nesse fixador por 4 h. Em seguida, o material foi seccionado em três segmentos, contendo as regiões da córnea, corpo e antro, e colocado em um cassete de plástico, sendo mantido por mais 4 - 6 h no mesmo fixador.

Após esse procedimento, iniciou-se a etapa de desidratação, a partir de trocas sucessivas de soluções alcoólicas crescentes, com álcool 70 °, 95 ° e absoluto por um período de 1 h cada. Em sequência, o material foi mantido durante 1 h em xilol/álcool, seguido de mais 1 h em xilol e, depois, banhado em parafina (duas vezes por 1 h) para inclusão final.

Na inclusão, os segmentos foram colocados em recipiente retangular contendo parafina líquida e orientados de forma que a mucosa gástrica fosse cortada longitudinalmente. A microtomia dos blocos de parafina permitiu obter cortes que foram destinados ao estudo morfológico.

3.2.2 Coleta de mucosa gástrica para análise por "Immunoblot"

Para análise da distribuição de proteínas, os estômagos coletados, esticados em cortiça, tiveram a mucosa gástrica da região do corpo raspada (*scraping*) com auxílio de uma tesoura oftalmológica sob microscópio estereoscópio (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A amostra foi armazenada em solução salina tamponada com Tris (TBS 0,02 M) contendo PMSF 0,1 M (Merck, Darmstadt, HE., Alemanha) no freezer a - 80 °C para posterior extração proteica.

3.3 Atividade proliferativa avaliada a partir da reação de imuno-histoquímica para Ki-67

A partir da microtomia do material em 6 µm de espessura, foram obtidos cortes não seriados para impedir a análise sequencial dos mesmos núcleos. Estes cortes foram distendidos sobre lâminas cobertas de poli-L-lisina, em um procedimento realizado em banho-maria. As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente (TA) e, depois, em estufa a 45 °C, para a completa secagem e adesão dos cortes. Em seguida, foi realizada a desparafinização do material em banhos sequenciais de 20 min em xilol e hidratados durante 10 min em xilol-álcool, álcool absoluto, álcool 95 °, 70 ° e, por 5 min, em água corrente. Por fim, as lâminas foram armazenadas em estufa a 37 °C por, no mínimo, 48 h antes das reações.

Primeiramente, os cortes foram corados em HE para avaliação morfológica da mucosa gástrica, sendo utilizados apenas aqueles que estavam de acordo com os seguintes critérios: boa orientação das glândulas, extensão e estrutura da mucosa íntegra.

Após a verificação da morfologia, os cortes foram reidratados em salina com fosfato de sódio (PBS) 0,05 M (pH 7,4) por 5 min e imersos em solução contendo metanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO., EUA) e peróxido de hidrogênio 3% (lote

k42389487; Merck) por 20 min com a finalidade de inativar a peroxidase endógena. Em seguida, foram lavados em água destilada e imersos em PBS 0,05 M, para posterior recuperação antigênica em ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0; Merck) em banho-maria no micro-ondas (2 vezes de 5 min em potência 600 W e 2 vezes de 3 min em potência 300 W), seguido de resfriamento lento, por 40 min, em TA e lavagem com PBS 0,05 M. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro de cabra 20% por 20 min. Os cortes foram incubados, *overnight* a 4 °C, com anticorpo monoclonal de coelho para Ki-67 (1:50 [SP6]ab16667; Abcam Inc., Cambridge, MA., EUA).

No dia seguinte, o material foi lavado em PBS 0,05 M e incubado com anticorpo secundário de cabra para coelho conjugado com biotina (11 µg/mL; lote 41465; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA., EUA) por 2 h em TA. Logo após, os cortes foram lavados em PBS 0,05 M e mantidos no complexo estreptavidina conjugado com peroxidase (5 µg/mL; lote 71651; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) durante 1 h em TA. Para a revelação, foi utilizada 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorídrica (3,3'DAB) (lote SLBF8928V; Sigma-Aldrich) 0,07% em TBS 0,02 M contendo peróxido de hidrogênio 3% (lote k42389487; Merck) por 3 min no escuro. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer 0,1% por 3 min, diferenciados em solução saturada de carbonato de lítio, montados em Goma de Damar e observados em microscópio de luz. O controle negativo das reações foi obtido pela omissão do anticorpo primário.

3.4 Índice proliferativo (IP)

A proteína Ki-67 tem sido empregada como marcador de proliferação celular em diversos estudos¹³¹⁻¹³⁵. Segundo autores, ela está localizada na superfície dos cromossomos durante a mitose, sendo também expressa nas fases G1, S e G2, não estando presente na fase G0 (fase de quiescência)^{136,137}. Durante as fases de

divisão do material nuclear, o Ki-67 tem sua importância na manutenção da separação espacial dos cromossomos¹³⁷.

Dessa forma, neste estudo, as reações de imuno-histoquímica para a marcação da proteína Ki-67 destinaram-se a determinar o índice proliferativo das células epiteliais da mucosa da região do corpo gástrico. Foi realizada a contagem de 2200 - 2500 núcleos de células epiteliais marcados e não marcados para o Ki-67¹³⁸, dentro de um campo com boa orientação das glândulas.

A contagem transcorreu em microscopia de luz e objetiva 100 X (imersão), associada à ocular integradora 8 x (nº 2; Zeiss), a qual possui um retículo com cinco linhas paralelas que dividem o campo (região quadrangular com 0,52 mm²) em quatro espaços idênticos. A primeira linha da ocular foi posicionada entre o final da fosseta e o início do istmo (região onde aparecem as primeiras células parietais). De acordo com o estudo de Alvares e Gama⁷⁸ (1993), em filhotes, o compartimento proliferativo compreende a extensão da glândula gástrica, enquanto que em animais adultos, a área restringe-se à interface istmo-colo. Baseado nestes resultados, nas idades de 15 e 18 dias, a contagem abrangeu toda a porção glandular, sendo necessário o deslocamento cuidadoso da lâmina. Já, aos 30 e 60 dias, a análise percorreu a região istmo-colo. O índice proliferativo (IP) (%) foi estabelecido por animal, e consistiu na razão entre o número de núcleos marcados pelo número total de núcleos (marcados e não marcados) X 100.

3.5 Espessura da mucosa e profundidade da glândula gástrica

A determinação da espessura da mucosa e profundidade da glândula ocorreu ao longo da região do corpo em campos com orientação adequada das glândulas e tecido com estrutura íntegra. As medidas da mucosa e da glândula compreenderam

os limites da lâmina própria até a superfície da mucosa e início do istmo, respectivamente.

Para isso, foram capturadas imagens em microscópio de luz (Olympus, Montreal, QB., Canadá) (aumento 20 X), nas quais foram realizadas as medidas por meio do programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, Montgomery Count, MD., EUA). Na análise, considerou-se 10 a 15 medidas por animal e estes valores foram apresentados em micrômetros.

Em consonância, optamos por aproveitar as medidas efetuadas para averiguar outra região que também compõe a mucosa gástrica, a fosseta, que representa a abertura das glândulas. Assim, a média da profundidade da fosseta gástrica (F) foi obtida da subtração das médias da medida da espessura da mucosa (M) pelas médias da profundidade da glândula (G). Ou seja, $M - G = F$, por animal, de ambos os grupos.

3.6 Análise da diferenciação de células zimogênicas pelo *Immunoblot* para Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C

As amostras coletadas pela raspagem da mucosa dos animais em experimentação foram extraídas para obtenção de proteínas, que foram quantificadas e separadas por eletroforese. O fator de transcrição Mist 1 e pepsinogênio C foram detectados por *immunoblot*.

A extração proteica consistiu na homogeneização das amostras (homogeneizador T10 Basic, IKA®), em 200 µL de tampão de lise RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM; NP-40 1%, ácido deoxicolato de sódio 1%) diluído com inibidores de proteases e fosfatases (Leupeptina 100 µg/mL, Aprotinina 100 µg/mL, Benzamidina 15 mg/mL, Ortovanadato de sódio 5 mM e PMSF 0,1 M). Em seguida,

a mistura foi centrifugada a 12.000 g a 4 °C por 5 min, o sobrenadante foi aliquoteado e conservado a - 80 °C.

Posterior à extração, determinou-se a quantificação proteica, a partir do sobrenadante, pelo método de Bradford¹³⁹ (1976). As amostras extraídas foram adicionadas em tampão de amostra (Tris 0,5 M, glicerol 17%, SDS 1,7%, Azul de Bromofenol 0,04%), ao qual se adicionou β -mercaptoetanol (concentração final 1%), para decorrente aquecimento a 100 °C durante 5 min a fim de promover a desnaturação das proteínas.

Em gel de poliacrilamida-SDS 12%, foram aplicados 30 μ g de amostra, sendo submetido à corrida eletroforética em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% em água Milliq) em 80 V por 2 h e 10 min. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (código RPN303D; GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) em tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20% em água Milliq), em 200 mA por 2 h e 10 min a 4 °C, para avaliação dos níveis proteicos de pepsinogênio C e, por 2 h, para a detecção do fator Mist 1. A membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau 0,5%, para verificação da transferência, e o gel de poliacrilamida-SDS mantido em solução de Coomassie *blue* 0,025% *overnight* em TA. Após este período, os géis foram colocados em solução descorante (ácido acético 8%, metanol 25% em água destilada) com a finalidade de observar o padrão da corrida e a eficiência do processo. E, *a posteriori*, o gel foi digitalizado em impressora multifuncional (Photosmart, HP).

3.6.1 Protocolo de Immunoblot para Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C

Com o objetivo de verificar a presença e concentração de fator Mist 1 e pepsinogênio C nos grupos A e DP, utilizamos um sistema de incubação de

anticorpos (SNAP i.d.TM, Millipore, Bedford, MA., EUA). Neste equipamento, foi realizada a lavagem da membrana com TBS 0,02 M e Tween 20 0,1% em TBS 0,02 M (TTBS) (2 vezes), seguida de incubação com solução de bloqueio Superblock-TBS (lote AG41422; Pierce, Rockford, Il., EUA) por 10 min em TA.

Após lavagem, algumas membranas foram mantidas com anticorpo monoclonal de camundongo para Mist 1 (0,20 µg/mL; lote Sc-80984; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., EUA) por 10 min e, em seguida, lavadas com TBS 0,02 M e TTBS (2 vezes) e incubadas com anticorpo secundário de cabra para camundongo conjugado com peroxidase (0,26 µg/mL; lote 116816; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), que permaneceu em contato com a membrana por 10 min.

Em separado, outras membranas foram expostas ao anticorpo policlonal de cabra contra pepsinogênio C (I-19) (0,01 µg/mL; sc-51188; Santa Cruz Biotechnology) (10 min em TA), seguido de lavagem com TBS 0,02 M e TTBS (2 vezes) e incubação com anticorpo secundário de coelho para cabra conjugado com peroxidase (0,53 µg/mL; lote 113402; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) por 10 min em TA.

Logo após incubação com anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com TBS 0,02 M e TTBS (2 vezes), e mantidas em TTBS para revelação. As membranas incubadas com anticorpo para Mist 1 foram expostas a solução de ECL prime (lote 9466589; GE Healthcare) por 1 min e, em seguida, ao filme de raio X (lote 424016; Carestream Health; Rochester, NY., EUA) em períodos de tempo que foram padronizados para cada idade (Tabela 1). Já, as membranas incubadas com pepsinogênio C foram mantidas em ECL (lote 9606038; GE Healthcare) por 1 min e, em filme de raio-X, também por 1 min.

Tabela 1 – Representação do tempo de exposição da membrana ao filme de raio X para cada idade estudada.

Idade (dias)	Tempo de exposição ao filme
15	5 min
18	2 min
30	10 s
60	10 s

3.6.2 Controle de carregamento do Immunoblot

A proteína β -actina possui peso molecular semelhante ao da proteína pepsinogênio C. Assim, para que o controle do carregamento das amostras fosse possível, as membranas incubadas com anticorpo policlonal para pepsinogênio C foram lavadas em soluções tamponadas com Tris (TBS 0,02 M e TTBS) (2 vezes de 5 min) e mantidas em tampão de *stripping* (*Re-blot plus mild solution 10 x*) (lote 2393902; Millipore, Temecula, CA., EUA) - tampão para retirada dos ligantes – sob agitação lenta, em concentrações e períodos de tempo distintos para cada idade, como especificado na Tabela 2. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS 0,02 M e TTBS por 1 h cada e coradas com solução de Ponceau 0,5% para confirmar a presença das proteínas. Após lavagem, as membranas foram imersas *overnight* a 4 °C em leite desnatado em pó 2,5% (Molico, Nestlé, Brasil) diluído em 50 mL de TTBS, a fim de bloquear ligações inespecíficas.

Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS 0,02 M e TTBS e incubada com anticorpo monoclonal de camundongo para β -actina (0,29 μ g/mL; lote A5441; Sigma-Aldrich) por 1 h em TA. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS 0,02 M (2 vezes de 5 min) e TTBS (2 vezes de 5 min) para, então, receber o anticorpo secundário de cabra para camundongo conjugado com peroxidase (0,26 μ g/mL; lote

116816; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), que foi mantido por 1 h em TA. Na revelação, utilizou-se ECL plus (lote 9606038; GE Healthcare) por 1 min, permanecendo em exposição ao filme de raio-X por 15 s.

Tabela 2 – Indicação da diluição do tampão de *stripping* e o tempo de incubação por idade.

Idade (dias)	Diluição tampão de <i>stripping</i> (em mL)	Tempo de incubação
15	1:50	3 min
18	1:40	7 min
30	1:40	10 min
60	1:10	10 min

As membranas incubadas com anticorpo monoclonal para Mist1 foram lavadas durante 2 h com TBS 0,02 M e TTBS (1h com TBS 0,02 M e 1h com TTBS), a fim de remover o ECL prime, para assim receber o anticorpo monoclonal de camundongo para β -actina (0,29 μ g/mL; lote A5441; Sigma-Aldrich) por 1 h em TA. Em sequência, foi realizada nova lavagem com TBS 0,02 M (2 vezes de 5 min) e com TTBS (2 vezes de 5 min) e incubação com anticorpo secundário de cabra para camundongo conjugado com peroxidase (0,26 μ g/mL; lote 116816; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) durante 1 h em TA, seguido de ECL por 1 min e exposição ao filme por 10 s.

Os filmes de raio-X expostos às membranas incubadas com Mist 1, Pepsinogênio C e β -actina receberam banhos sequenciais de revelador (código 8610248; Kodak; Rochester, NY., EUA), água de torneira e fixador (código 1562826; Kodak), sendo digitalizados em impressora multifuncional (Photosmart, HP) após secagem.

A densitometria das bandas foi realizada por intermédio do programa de domínio público Image J (1.37v, National Institute of Mental Health, NIH, EUA), sendo os valores reconhecidos como densidade óptica integrada (IOD) em unidades arbitrárias (UA). Os níveis proteicos foram estabelecidos por meio da razão entre a leitura da proteína de interesse pela proteína controle de carregamento, β -actina. Essas leituras foram realizadas em filmes obtidos a partir de uma mesma membrana, que foi incubada com a proteína de interesse e a proteína controle.

3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram reunidos de acordo com os grupos experimentais, representados como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida de teste de Tukey para avaliar a variação ontogênica de ambos os grupos experimentais, e teste *t* de Student, para análise dos efeitos do desmame precoce, sendo considerado significativo o valor $P < 0,05$. Para análise estatística do índice proliferativo, utilizou-se a transformação arco-seno das porcentagens obtidas para cada animal¹⁴⁰.

4 RESULTADOS

4.1 Massa corpórea

Durante o período de experimentação (de 15 a 60 dias), realizamos a avaliação da massa corpórea, em intervalos de tempo que permitiram a observação do ganho de peso e crescimento nos animais amamentados e em desmame precoce (Figura 4A). Registramos e analisamos também a massa corpórea no momento da coleta de amostras, em 15, 18, 30 e 60 dias (Figura 4B).

Constatamos que o grupo DP apresentou massa corpórea menor quando comparado aos animais A aos 18 dias de vida pós-natal ($p<0,01$; Figura 4A e 4B). É importante destacar que entre o 18º e 45º dia, a massa corpórea do grupo DP mostrou-se menor em comparação a do grupo A, apesar desta diferença ser significativa apenas no 21º dia de vida pós-natal ($p<0,05$; Figura 4A). Ademais, verificamos (Figura 4A) que, o grupo DP apresentou massa corpórea superior ao A no 50º e 55º ($p=0,41$), bem como no 60º dia de vida ($p=0,34$), embora estes resultados não apresentem significância estatística.

Em associação, propomos avaliar se houve efeitos distintos no ganho de massa corporal entre fêmeas e machos em virtude do desmame precoce. Assim, analisamos os valores de ambos os sexos separadamente (Figura 4C e 4D).

Na Figura 4C, podemos verificar que as fêmeas DP apresentaram massa corpórea inferior as do grupo A até o 30º dia de vida pós-natal ($p=0,07$), havendo diferença significativa apenas no 18º e 21º dia ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Aos 35 dias, constatamos inversão deste padrão, que foi mantido até 60 dias ($p=0,08$). De forma distinta aos dados obtidos das fêmeas, a massa corpórea dos machos DP permaneceu inferior a do grupo A em todas as idades analisadas, não

havendo diferença estatística, salvo no 18º dia de vida pós-natal ($p < 0,01$) como verificado na Figura 4D.

Figura 4 – Efeitos do desmame precoce sobre o ganho de massa corpórea em ratos. (A), (C) e (D) Massa corpórea (g) representada por médias $\pm$ desvio padrão nos grupos A (vermelho) e DP (azul) nas idades de 15 a 60 dias. O número total de animais foi de 71, sendo 40 do grupo A (24 fêmeas e 16 machos) e 31 do grupo DP (18 fêmeas e 13 machos). (B) Massa corpórea (g) representada

por médias $\pm$ desvio padrão nos grupos A (em vermelho) e DP (em azul) nas idades em que houve coleta de amostras. (n) indica o número de animais de cada grupo. Para análise, utilizamos teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ e ** e *** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo amamentado da mesma idade.

4.2 Efeitos dos desmame precoce sobre o Índice Proliferativo da mucosa gástrica

A princípio, verificamos a integridade do epitélio e nenhuma área lesionada foi encontrada. Observamos, por meio de fotomicrografias representadas na Figura 5A, que a mucosa de animais amamentados com 15 e 18 dias comporta células em proliferação em toda a extensão da glândula. Distintamente do observado aos 18 dias no grupo DP, assim como aos 30 e 60 dias, em que o compartimento proliferativo foi deslocado para a região istmo-colo da glândula, conforme descrito na literatura por Gama e Alvares¹¹⁹ (2000).

Ademais, ao analisar a influência do desmame precoce sobre a atividade proliferativa das células epiteliais gástricas, percebemos diminuição dos 15 dias para os 18 dias no grupo DP ($p < 0,05$; Figura 5B) e índice proliferativo 4,9% maior no grupo DP quando comparado aos animais A aos 18 dias ($p < 0,05$; Figura 5B). Aos 30 dias de vida pós-natal, constatamos inversão do perfil proliferativo verificado aos 18 dias, ou seja, a resposta proliferativa do grupo DP foi 8,4% menor que a do grupo A ($p < 0,01$; Figura 5B). Na idade de 60 dias, o grupo A apresentou resposta proliferativa 1,5% maior que a do grupo DP, todavia esta diferença não teve significância estatística (Figura 5B).

Constatamos também diminuição da atividade proliferativa dos 15 dias para os 18 dias no grupo A ($p < 0,01$; Figura 6A). Dos 18 para 30 dias, houve aumento de 3,5% na proliferação celular no grupo DP, mas sem significância estatística (Figura 6A). Enquanto, no grupo A, o crescimento foi de 48,7% ($p < 0,01$; Figura 6A). Em ambos os grupos experimentais, constatamos redução da atividade proliferativa dos

30 para os 60 dias. No grupo DP, a proliferação reduziu em 6%, contudo sem significância (Figura 6A) e, no grupo A, 20,2% ($p<0.05$; Figura 6A).

É importante salientar, na Figura 6A, que os animais DP, quando filhotes, apresentaram um perfil proliferativo similar ao observado nos animais com 30 e 60 dias, o que difere do constatado nos animais A, nos quais observamos crescimento da proliferação do filhote para a idade de 30 dias e, diminuição, do 30º dia para a idade adulta.

A partir dos resultados da atividade proliferativa em resposta ao desmame precoce, questionamos se o crescimento da mucosa corresponderia ao comportamento proliferativo da mesma. Desta forma, analisamos a profundidade da glândula e a espessura da mucosa.

4.3 Profundidade da glândula gástrica

A partir do estudo da profundidade da glândula gástrica notamos que, dos 15 para os 18 dias no grupo DP, houve um crescimento de 7,5% (Figura 5B). Observamos um aumento de 21,0 μm nos animais DP em relação ao grupo A na idade de 18 dias ($p<0,05$; Figura 5B). E, aos 30 e 60 dias, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos em relação à profundidade da glândula (Figura 5B).

Pelos dados obtidos, da idade de 15 dias para 18 dias no grupo A, a glândula apresentou uma retração de 6,1% (Figura 6B), não havendo diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos. Além disso, dos 18 para os 30 dias houve aumento de 117,4% no grupo A ($p<0,01$; Figura 6B) contra 77,8% nos animais DP ($p<0,01$; Figura 6B). Interessante notar que, dos 30 para os 60 dias, o crescimento da glândula foi similar, no grupo A aumentou 17% e, no DP, 29,5% ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente; Figura 6B).

4.4 Espessura da mucosa gástrica

Como analisado por Gama e Alvares¹¹⁹ (2000), o grupo DP aos 18 dias apresentou espessura da mucosa gástrica superior a do grupo A. Em conformidade com este resultado, no presente estudo, constatamos uma diferença na média da medida de espessura da mucosa de 28,3 μm maior no DP em comparação aos animais A ($p < 0,05$; Figura 5B). Contrariamente, aos 30 dias, a espessura da mucosa foi 46,4 μm maior no grupo A em comparação ao DP ($p < 0,05$; Figura 5B). E, no 60º dia, a mucosa gástrica dos animais DP alcançou altura semelhante ao do grupo A (Figura 5B).

Os resultados mostraram que dos 15 aos 18 dias de vida, no grupo DP, houve aumento da mucosa gástrica em 0,25%, mas sem significância estatística. Diferentemente, do encontrado nos animais A, em que não verificamos crescimento da mucosa (Figura 6C). Notamos também que, de 18 para 30 dias, a mucosa cresceu 68,7% entre os animais DP contra 112,7% dos A (ambos $p < 0,01$; Figura 6C). Em relação ao crescimento da espessura da mucosa nas idades de 30 para 60 dias, o grupo DP aumentou de 16,6% ($p < 0,01$) contra 3,3% entre os animais A, em que não foi encontrada significância estatística (Figura 6C).

4.5 Profundidade da fosseta gástrica

Na Tabela 3, estão dispostos os valores das médias e do desvio padrão para cada idade e grupo experimental. A partir dos dados obtidos, podemos inferir que as médias das medidas da profundidade da fosseta mostraram-se semelhantes entre os filhotes, de 15 e 18 dias, e entre os animais adultos tanto do grupo A quanto do DP. Todavia, ao considerar as médias da espessura da mucosa, profundidade da glândula e da fosseta, na idade de 18 dias, constatamos que os animais DP apresentaram valores maiores do que o grupo A, contrariamente ao verificado aos

30 dias. Contudo, no 60º dia, os animais DP apresentaram maiores valores de espessura da mucosa e profundidade da glândula, mas menor profundidade da fosseta em comparação ao grupo A.

Tabela 3 – Representação da profundidade da fosseta por grupo experimental.

Idade (dias)	Grupos	Espessura da Mucosa (μm)		Profundidade da Glândula (μm)		Profundidade da Fosseta (μm)	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
15	A	241,7	27,4	153,3	14,8	88,4	14,2
18	A	214,0	18,7	143,8	13,5	70,2	11,4
	DP	242,3	23,7	164,8	11,8	77,5	17,3
30	A	455,4	31,1	312,7	31,6	142,6	9,2
	DP	409,0	29,9	293,1	27,3	115,8	8,1
60	A	470,5	23,0	366,2	31,1	104,2	23,9
	DP	477,0	32,3	379,9	16,5	97,1	24,1

Figura 5 – Efeitos do desmame precoce sobre a proliferação celular e tamanho da mucosa gástrica em ratos. (A) Fotomicrografias representativas da atividade proliferativa na mucosa gástrica da região do corpo do estômago após reação de imuno-histoquímica para Ki-67 nas idades de 15, 18, 30 e 60 dias de vida pós-natal; o controle negativo da reação (-) está apresentado à direita da prancha; Aumento original: 20 x. As letras, F, G, I, C e B representam à fosseta, glândula, istmo, colo e base, respectivamente. **(B)** índice proliferativo (IP) (%); medida da profundidade da glândula e espessura da mucosa. Os valores obtidos estão representados em gráfico de dispersão com média $\pm$ desvio padrão nos grupos: A nas idades de 15 (●), 18 (■), 30 (▲) e 60 (◆)

dias e DP nas idades de 18 (■), 30 (▲) e 60 (◆) dias. Os resultados foram avaliados por teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ e ** e *** $p < 0,01$, quando comparado ao amamentado.

experimental. Na análise, foi utilizado ANOVA seguida de teste de Tukey. * $p<0,05$ e ** e *** $p<0,01$, em relação ao grupo amamentado.

4.6 Efeitos do desmame precoce sobre a diferenciação de células zimogênicas: *Immunoblot* para Mist 1 e Pepsinogênio C

O marcador de diferenciação celular, Fator de transcrição Mist 1, foi constatado na mucosa de filhotes com 15 dias, em níveis proteicos similares aqueles encontrados no 18º dia no grupo A. Além disso, observamos aumento dos níveis aos 18 dias no grupo DP quando comparado ao A ($p<0,05$; Figura 7A), havendo inversão desta resposta no 30º dia, todavia sem significância estatística ($p=0,06$; Figura 7A). E, níveis de Mist 1 semelhantes entre os grupos aos 60 dias (Figura 7A).

Em relação aos níveis de pepsinogênio C, notamos que, aos 15 dias, os níveis proteicos foram semelhantes aqueles obtidos aos 18 dias nos animais A. No grupo DP, aos 18 dias, houve aumento dos níveis desta proteína em relação ao grupo A ($p<0,01$; Figura 7B). Tal resposta também foi constatada no 30º dia, mas nenhuma diferença foi percebida entre os grupos ($p=0,22$; Figura 7B). No 60º dia, os níveis de pepsinogênio C mostraram-se superiores no grupo A em comparação com o DP, contudo não houve diferença estatística entre os grupos, ($p=0,052$; Figura 7B).

Figura 7 – Efeitos distintos do desmame precoce sobre a diferenciação de células zimogênicas: avaliação do Fator de transcrição Mist 1 e Pepsinogênio C. Em (A) e (B), *immunoblot* para Mist 1 (22 kDa) e Pepsinogênio C (42,5 kDa), respectivamente, seguido do *immunoblot* para β -actina (42 kDa) em ambos os grupos, A com de 15 (●), 18 (■), 30 (▲) e 60 (◆) dias e DP nas idades de 18 (■), 30 (▲) e 60 (◆) dias. Nos *immunoblots* estão representadas quatro amostras por grupo experimental, as quais foram distribuídas em um mesmo gel de poliácridamida-SDS (12%), na concentração de 30 μ g/ml de amostra. Os resultados obtidos a partir da densitometria (IOD em UA) estão representados em gráficos

de dispersão com médias $\pm$ desvio padrão em cada grupo e idade. Os resultados foram analisados por teste t de *Student*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao amamentado.

5 DISCUSSÃO

A influência do padrão de dieta no crescimento e desenvolvimento da mucosa gástrica de ratos foi abordada por diferentes estudos. O objetivo ora traçado foi avaliar se os efeitos do desmame precoce sobre a massa corpórea, o crescimento e desenvolvimento do epitélio gástrico no estágio precoce do desenvolvimento são mantidos na vida adulta.

A princípio, encontramos que a abrupta mudança no padrão de dieta associado à precoce retirada dos cuidados maternos encurtou o período de adaptação dos animais a transição alimentar (leite materno para ração). De forma que, os filhotes com 18 dias, precocemente desmamados, apresentaram menor massa corpórea quando comparado ao controle, resultado respaldado por estudos prévios^{122,128,129}. A massa corpórea também foi menor no grupo DP do que no amamentado aos 21 dias.

Em vista dos trabalhos que utilizaram este modelo de DP, já foi descrito que a concentração de corticosterona plasmática eleva-se dos 15 aos 17 dias, porém a atividade hormonal é dependente de diversos fatores, que podem acabar por proteger o filhote de efeitos deletérios¹²⁴. Entretanto, mesmo durante o período hiporresponsivo, Liu et al.¹⁴¹ (2011) observaram que injeções peritoneais de hidrocortisona em ratos durante vinte dias resultaram em menor peso corporal quando comparado aos animais controle, que receberam solução salina. A corticosterona atua na regulação da massa corpórea por promover a hiperglicemia e hiperinsulinemia, o que pode estar relacionado à diminuição da expressão gênica de NPY e AGRP, neuropeptídeos orexigênicos, os quais controlam a ingesta alimentar constatada com a administração de hidrocortisona^{141,142}. Em contrapartida, Zulian et al.¹²⁹ (2017) não verificaram diferença entre os animais DP tratados com antagonista

para corticosterona e o grupo A, ou seja, o grupo DP apresentou massa corpórea menor que o A dos 15 aos 30 dias, mesmo bloqueando a ação do hormônio.

Nos animais DP, após os 21 dias, constatamos recuperação do peso corporal e aumento da massa corpórea ao longo da idade, alcançando o limiar de significância aos 60 dias. Tal resposta pode refletir um comportamento adaptativo de retomada do crescimento após um período de separação materna e, conseqüente, privação do leite materno¹⁴³. Estudos mostraram que a submissão de ratos com 18 dias a três dias consecutivos de desmame, bem como mudanças na composição do leite¹⁴⁴ resultaram em aumento no ganho de massa corpórea na vida adulta (ratos com 6 meses de idade) e na área dos adipócitos visceral e subcutâneo a longo prazo^{144,39}.

A leptina, presente no leite materno, contribui para o desenvolvimento e ativação do circuito hipotalâmico durante o período neonatal, o qual está envolvido no controle da adiposidade e na diminuição da ingesta alimentar^{145,146}. Sua ausência em um período crítico do desenvolvimento pode ser relacionada à programação metabólica e a obesidade na vida adulta^{147,148}.

Outros estudos também encontraram que ratos adultos, que passaram por desmame prematuro, mostraram hiperfagia e aumento da adiposidade, bem como resistência hipotalâmica à leptina¹⁴⁸. Szostaczuk et al.¹⁴⁹ (2017) questionaram se a suplementação com leptina no decorrer da lactação poderia prevenir os efeitos sobre o metabolismo em ratos submetidos à restrição calórica durante a fase fetal. O estudo constatou que os animais que não receberam leptina tiveram maior massa corpórea dos 4 aos 6 meses de vida quando comparado ao grupo que recebeu esse neurohormônio.

Outro hormônio que pode estar envolvido é a ghrelina. Esta consiste em um hormônio peptídico orexigênico que apresenta efeitos antagônicos aos da leptina, de

forma que, em ratos com 8 semanas de idade, a injeção intracerebroventricular desse hormônio resultou em aumento da ingesta alimentar quando comparado aos animais controle¹⁵⁰.

Interessantemente, quando os efeitos do desmame na massa corpórea foram avaliados entre fêmeas e machos separadamente, encontramos que as fêmeas DP apresentaram menor massa corpórea aos 18 e 21 dias em relação ao controle e, nenhuma diferença significativa dos 21 até os 60 dias. Todavia, aos 35 dias as fêmeas DP apresentaram maior massa corpórea que as amamentadas e esta condição foi mantida até o 60º dia, quando a diferença entre os grupos atingiu iminente significância. Este resultado difere dos machos DP, os quais tiveram menor peso corporal somente aos 18 dias, mas massa corpórea similar ao dos amamentados do 21º ao 60º dia de vida, resultado sustentado pela literatura^{122,128,151}.

As repostas no peso corporal entre machos e fêmeas mostram-se similares quando alimento rico em fibras como oligofrutose e inulina e rico em proteínas são ofertados as mães durante a lactação. Aos 26 e 27 dias de vida pós-natal, a prole de ambos os sexos, cujas mães foram nutridas com alimento rico em fibras, apresentaram menor massa corpórea quando comparado ao controle. Observou-se que nesta prole, as fêmeas mantiveram o peso dos 26 até os 28 dias de vida, contrariamente aos machos que reduziram a massa corpórea no mesmo período¹⁵². Ou seja, mudanças na composição da dieta das mães geraram em sua prole, distinto ganho de peso entre machos e fêmeas, o que também pode ser notado nos resultados descritos neste trabalho.

Resultado semelhante foi observado por Lee et al.¹⁵³ (2016), os quais avaliaram, em ratos machos, os efeitos da restrição alimentar durante a gestação e

lactação no peso corporal, bem como sobre o perfil metabólico. Os pesquisadores identificaram menor massa corpórea aos 22 dias da prole cuja mãe recebeu restrição alimentar durante a lactação. Em vista de avaliar as influências da mudança do padrão alimentar sobre o ganho de massa corpórea na vida adulta, Velkoska et al.¹⁵⁴ (2008) propuseram avaliar a influência a curto e longo prazo da subnutrição e nutrição aumentada sobre o balanço energético e ingesta alimentar. Para isso, os pesquisadores utilizaram um modelo de estudo em que a quantidade de leite materno ingerida pelos animais após o nascimento foi regulado por meio do número de animais mantidos com a mãe durante a lactação. A ninhada que foi mantida em maior número (18 filhotes para cada lactante) apresentou aos 24 dias menor depósito de gordura e peso corporal, o que foi mantido na vida adulta. No presente estudo, a diferença entre machos e fêmeas pode ser atribuída ao fato de fêmeas terem maior propensão ao ganho de massa em virtude do aumento dos níveis de ghrelina¹⁵⁵. Além da análise da massa corpórea, esta pesquisa avaliou os efeitos do DP sobre a proliferação celular.

Resultados obtidos no laboratório mostraram que a taxa de entrada das células em mitose aos 14 dias de vida corresponde a $0,72 \pm 0,08$ células/%/h e aos 21 dias, $1,27 \pm 0,18$ células/%/h, ou seja, observou-se um aumento da entrada de células em ciclo, o que pode remeter ao crescimento da mucosa gástrica¹⁵⁶. Alvares⁷⁷ (1992) e Alvares e Gama⁷⁸ (1993) obtiveram índice metafásico em ratos com 14 dias (em aleitamento) de $0,9 \pm 0,05\%$, aos 18 dias (ainda em aleitamento) de $1,84 \pm 0,05\%$ e, aos 30 dias (alimentados com ração), $1,02 \pm 0,16\%$, o que revela maior número de células em ciclo aos 18 dias, quando comparado aos 14 e 30 dias.

Todavia, no presente estudo, deve-se notar que o perfil ontogênico não foi registrado quando o índice proliferativo foi comparado entre 15 e 18 dias.

Encontramos valores superiores aos 15 dias quando comparado aos 18 dias (tanto no grupo A quanto no DP). Isto nos remete a pensar sobre a possibilidade de desenvolvimento de processos atróficos na mucosa, em virtude da diminuição da proliferação celular.

Dessa forma, cortes histológicos da mucosa gástrica foram avaliados, porém nenhuma lesão foi observada, o que contrapõe evidências descritas na literatura que afirmam a ocorrência de lesões e ulcerações na mucosa gástrica decorrentes do desmame prematuro, aos 15 dias. Ackerman¹⁵⁷ (1980) mostraram que a retirada do leite materno aos 15 dias levou a processos ulcerativos no rato. Em outros estudos, constataram que a privação do leite materno, bem como a privação do contato materno aos 15 dias, resultou em formação de úlceras com hemorragia na mucosa gástrica, sendo aumentada em 5 vezes a incidência de processos ulcerativos aos 30 dias de vida de ratos^{158,159}. Nossos achados não confirmam essas observações, e nos fazem considerar que outros fatores presentes nos estudos acima podem ter originado as lesões.

A partir de 18 dias, constatamos nos animais que foram amamentados normalmente, gradativo aumento do índice proliferativo até o 60º dia (Figura 6). Em contrapartida, no grupo DP, percebemos que a atividade proliferativa presente aos 18 dias mostrou-se similar ao constatado nas idades de 30 e 60 dias, ou seja, a resposta proliferativa do DP em filhotes correspondeu ao perfil encontrado na mucosa gástrica de animais adultos do mesmo grupo experimental (Figura 6).

Interessantemente, verificamos que a substituição precoce do leite pelo alimento sólido antecipa o desenvolvimento e crescimento do epitélio gástrico em filhotes. No grupo DP, encontramos que aos 18 dias a atividade proliferativa das células epiteliais gástricas e a espessura da mucosa aumentaram quando

comparadas ao grupo A, e tal resultado corrobora com estudos prévios^{119,124}. Além disso, constatamos que o grupo DP apresentou maior profundidade da glândula aos 18 dias do que os animais A. Em paralelo, também notamos que o DP antecipou o deslocamento do compartimento proliferativo para a região istmo-colo, um perfil encontrado em animais adultos⁷⁸. Estes resultados confirmaram estudos prévios¹²⁴ e, podem estar relacionados à atividade da corticosterona¹²⁴, aumento da sinalização de EGFR¹²⁶, ação da ghrelina¹²⁸ e outros fatores bioativos, tal como TGF- β , no controle da proliferação celular e crescimento do epitélio gástrico⁶⁰.

Na mucosa gástrica de ratos, Osaki et al.¹²² (2010) avaliaram a distribuição e os níveis proteicos de EGFR/TGF- α , os resultados mostraram aumento da imunomarcacão e expressão proteica de TGF- α nos animais de 18 dias, desmamados aos 15 dias, em comparação ao grupo amamentado até 21 dias. Assim como, foi constatado que o DP induz o aumento da imunomarcacão para EGFR na mucosa gástrica. Estes fatores, indutores de atividade proliferativa, aumentados na mucosa gástrica contribui para a compreensão dos motivos que fazem com que aos 18 dias a mucosa tenha uma resposta proliferativa superior ao do grupo amamentado.

O crescimento da mucosa apoia-se em eventos cinéticos, que levam ao desequilíbrio entre proliferação e morte celular. Aos 18 dias, o DP estimulou a proliferação e aumentou a profundidade da glândula, porém não verificamos a taxa de morte celular no presente estudo. Em estudo anterior realizado no laboratório, não foi encontrada diferença no número de células apoptóticas entre A e DP. Em contrapartida, no grupo amamentado foi constatada maior expressão proteica de caspase-3 ativada (p12) do que no DP, o que poderia indicar menor atividade apoptótica na mucosa do DP.

Os estudos mencionados até este ponto permearam a avaliação dos efeitos do DP sobre o epitélio gástrico de filhotes, ou seja, a resposta imediata do tecido epitelial. De forma que, nenhum trabalho na literatura propôs entender sua influência sobre a mucosa de animais adultos. Este é o primeiro estudo a demonstrar as respostas tardias da abrupta transição de dieta. Conforme descrito, verificamos que, aos 30 dias, há uma inversão na atividade proliferativa. Os animais amamentados mostraram altos valores de proliferação e espessura da mucosa, quando comparados ao grupo DP. Estudos anteriores demonstraram que o desmame precoce não afetou a divisão celular, mas aumentou a espessura da mucosa aos 22 dias de vida pós-natal, isto é, 7 dias depois de iniciar a ingesta de ração¹¹⁹. Assim, a inversão da resposta proliferativa de 18 para 30 dias passa através de um período não responsivo, mas garante crescimento e estrutura da mucosa, se considerarmos sua espessura.

Os resultados do presente estudo confirmam as diferentes repostas ao desmame ao longo do desenvolvimento. Estudos têm mostrado que a privação precoce do leite conduz a atrofia dos vilos no intestino delgado de filhotes¹⁶⁰ e alongamento dos vilos em porcos durante a vida juvenil (34 dias)¹⁶¹. Isto sugere que a retirada antecipada do leite materno ativa mecanismos envolvidos no controle do crescimento epitelial, uma vez que, distúrbios de dietas podem influenciar o controle da proliferação celular¹⁶².

A modulação das repostas pode elucidar a ausência dos efeitos do DP sobre a atividade proliferativa e espessura da mucosa de ratos adultos (60 dias). Em contraste, outros padrões de dietas e de alimentação podem induzir mudanças a longo-prazo. A desnutrição durante a vida fetal e neonatal em ratos conduz a prejuízos estruturais e funcionais de órgãos, tais como pâncreas, por interferir na

proliferação de células β -pancreáticas¹⁶³. Além disso, a restrição proteica inibe a atividade proliferativa das células na zona subgranular, e de células-tronco da zona subventricular no hipocampo em ratos adultos¹⁶⁴, prejudicando o processamento e consolidação da memória¹⁶⁵. Na mucosa gástrica, a dieta com restrição de proteínas, na vida intrauterina e pós-natal, inibe a proliferação celular de células do epitélio gástrico em ratos com 50 dias de vida (ratos adultos)¹⁶⁶, indicando que distúrbios nutricionais durante o desenvolvimento afetam o órgão adulto.

Em relação à profundidade da glândula, o DP não acarretou nenhum efeito sobre seu crescimento e desenvolvimento aos 30 e 60 dias. Gama e Alvares¹¹⁹ (2000) mostraram que aos 22 dias de vida, a mucosa gástrica de ratos submetidos ao DP e o jejum durante 24 h aos 21 dias, não alterou a profundidade da mucosa quando comparado ao grupo DP alimentado.

Ao avaliarmos a profundidade da fosseta, verificamos médias maiores entre os animais com 15 dias e 18 dias DP, em contrapartida, aos 30 dias, a média da fosseta dos animais DP é inferior ao do A. Curiosamente, aos 60 dias, no grupo DP seus valores são menores que no grupo A. Estudos descrevem que a gastrina pode estar envolvida no alongamento da fosseta na mucosa gástrica de camundongos¹⁶⁷, o que pode indicar que os níveis deste hormônio podem estar alterados nesta idade, em virtude do DP.

Entretanto, como mencionado acima, não detectamos lesões na mucosa gástrica, e observamos um padrão normal de renovação epitelial¹⁶⁸. Se compararmos diferentes órgãos gastrintestinais e consideramos que existe uma atenuação da apoptose ao longo do desenvolvimento, associado com uma lenta atividade na reparação^{120,168}, podemos sugerir que o DP não representa um prejuízo para a mucosa gástrica, em termos de proliferação celular e renovação. De forma

que, observamos que a mucosa gástrica acompanhou o padrão ontogênico, ou seja, a espessura da mucosa, bem como a profundidade da glândula e fosseta não foi comprometida pelo desmame precoce a longo prazo.

Como citado acima, diversos componentes têm sua concentração regulada pelo DP e influenciam a atividade proliferativa na mucosa gástrica. Moore et al.¹⁶⁹ (2016) mostraram que o fator nuclear de hepatócitos 4 α é expresso na mucosa gástrica de camundongos e regula processos proliferativos, bem como a expressão gênica de XBP 1, o qual é requerido para a transcrição de Mist 1. Ou seja, este fator está envolvido na proliferação e diferenciação celular do epitélio gástrico e novas pesquisas devem ser realizadas a fim de relacioná-lo aos efeitos do DP.

Somado às modificações que o DP promoveu sobre a cinética celular, bem como no crescimento, avaliamos parâmetros relacionados à maturação morfológica do epitélio gástrico. Zulian et al.¹²⁹ (2017) apontaram que o desmame precoce, aos 15 dias, desencadeou aumento da expressão gênica de Mist 1 e pepsinogênio C nos animais filhotes (18 dias), o que foi mantida em jovens- adultos. Associado a este achado, outros resultados de nosso grupo fizeram com que questionássemos se essa mudança também se refletiria no conteúdo proteico. Assim, o presente estudo avaliou se a mudança de dieta em ratos com 15 dias poderia influenciar na diferenciação das células zimogênicas e provocar alterações dos níveis proteicos de Mist 1 e pepsinogênio C em animais adultos.

Demonstramos que, aos 18 dias no grupo DP, os níveis de Mist 1 estavam superiores aos animais A. E, isto confirma resultados apresentados por Zulian et al.¹²⁹ (2017) que constatou maior imunomarcagem para Mist 1 entre os animais DP aos 18 dias, do que no A. Contudo, esta resposta não foi verificada posteriormente, ou seja, na vida juvenil (30 dias) de ratos e, ademais, nenhuma diferença entre os

grupos foi observada nesta idade. Tal evidência também foi retratada no presente estudo.

Aos 30 dias, em que percebemos uma inversão na concentração dessa proteína entre os grupos, quando relacionamos com os dados encontrados aos 18 dias, de forma que, o nível proteico no grupo A mostrou-se superior ao DP, mas sem significância estatística ($p=0,06$). Ao avaliarmos a repercussão do DP na vida adulta, no 60º dia, verificamos similaridade nos valores de DP e A, ou seja, a resposta verificada no 3º dia pós-desmame precoce não resultou em consequente alteração proteica no animal adulto.

Estudos retrataram a influência da dieta sobre as enzimas digestivas. Tanaka et al.¹⁷⁰ (1999) avaliou os níveis proteicos e de expressão gênica do pepsinogênio em ratos, sendo verificado redução do conteúdo do zimógeno após 24 h e 72 h de jejum e aumento da expressão do gene na mucosa gástrica depois de 48 h e 72 h. Em outro estudo, foi avaliado os efeitos da mudança da dieta sobre a expressão gênica do pepsinogênio no estômago de aves. Os resultados apontaram que a dieta rica em fibras repercutiu no aumento da expressão gênica de pepsinogênio C quando comparado ao controle¹⁷¹.

Zulian et al.¹²⁹ (2017) mostraram que o DP aos 15 dias em ratos, promoveu aumento da expressão gênica de pepsinogênio C aos 18 dias, o que corrobora com os resultados proteicos deste estudo, o qual constatou que o DP aos 18 dias elevou a concentração dessa proteína na mucosa em comparação ao grupo A. Em contrapartida, a resposta de aumento da expressão gênica foi mantida aos 30 dias¹²⁹, o que, nesse trabalho, não foi constatado a nível proteico. Aos 30 dias, não verificamos nenhuma diferença entre os grupos, sendo evidenciado maior nível proteico nos animais DP do que no amamentado na vida adulta (60 dias), mas sem

significância estatística, visto que encontramos iminente significância entre os grupos nesta idade.

Em síntese, podemos sugerir que o DP interferiu no ganho de massa corpórea e tal efeito foi diferentemente detectado em machos e fêmeas na vida adulta, confirmando que diferentes mecanismos estão envolvidos no controle metabólico e na ingesta alimentar. Além do mais, como os estímulos para o crescimento e desenvolvimento do estômago imediatamente depois da transição abrupta de leite para alimento sólido pode ser compensados por uma reação modulatória, uma taxa balanceada na renovação epitelial, síntese e secreção de proteínas foram alcançadas na vida adulta. Em vista disto, pontuamos os achados desse estudo:

- A massa corpórea dos animais DP, aos 18 e 21 dias, foi menor que o grupo A, sendo observado ganho de peso a partir de 18 dias no grupo DP, resultando, posteriormente, em maior massa corpórea neste grupo após 50º dia de vida pós-natal;
- Entre os sexos, as fêmeas e os machos DP apresentaram massa corpórea menor que o A, em filhotes, e tal resposta foi mantida até a vida adulta. Com a ressalva de que, em fêmeas DP, a massa corpórea aos 60 dias alcançou o limiar de significância;
- A atividade proliferativa e espessura da mucosa observadas em filhotes DP foram revertidas aos 30 dias, e no 60º dia nenhum efeito do tratamento foi constatado. Além disso, a profundidade da glândula nos animais DP aos 18 dias foi maior que o grupo A, contudo nenhuma diferença foi observada aos 30 e 60 dias;
- Na análise, não constatamos nenhuma anormalidade no crescimento e desenvolvimento do órgão ao longo da idade dos animais de ambos os grupos;

- A nível funcional, o DP alterou a concentração proteica de Mist 1 e pepsinogênio C em filhotes, mas este resultado não se mostrou presente nas idades de 30 e 60 dias.

6 CONCLUSÃO

A substituição precoce do leite materno por ração não acarretou comprometimento morfológico e funcional à mucosa gástrica de ratos, mas sugeriu uma reação de aumento da massa corpórea na vida adulta, principalmente, ao observarmos o ganho de massa das fêmeas. Isto nos permite inferir que o organismo possui mecanismos regulatórios que revertem os efeitos do desmame precoce constatados em filhotes. Contudo, este resultado, não anula a importância do aleitamento no controle do crescimento e desenvolvimento de órgãos, visto que sua ausência provocou alterações em filhotes, os quais em outras condições ambientais poderiam não ter sido revertidas pelo organismo. Como enfatizamos, o aleitamento propicia o fornecimento de componentes fundamentais para o adequado crescimento e desenvolvimento, bem como adaptação da criança ao ambiente externo, de forma que sua ausência pode ser um fator crucial para a saúde do indivíduo na vida adulta.

REFERÊNCIAS*

1. Bayardo RA, Peixoto LFS, Corrêa MSNP. Natural and artificial nursing: general considerations. *J. bras. clin. odontol. Integr.* 2003;7(39):257-260.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 112 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos); (Cadernos de Atenção Básica, n. 23).
3. de Gamburgo LJJ, Munhoz SRM, Amstalden LG. Newborn feeding: breastfeeding, bottle-feeding and cup feeding. *Fonol atual.* 2002;5(20):39-47.
4. Beiranvand S, Valizadeh F, Hosseinabadi R, Pournia Y. The Effects of Skin-to-Skin Contact on Temperature and Breastfeeding Successfulness in Full-Term Newborns after Cesarean Delivery. *Int J Pediatr.* 2014;2014:846486.
5. Widström AM, Lilja G, Aaltomaa-Michalias P, Dahllöf A, Lintula M, Nissen E. Newborn behavior to locate the breast when skin-to-skin: a possible method for enabling early self-regulation. *Acta Paediatr.* 2011;100(1):79-85.
6. Boccolini CS, Carvalho ML, Oliveira MI, Pérez-Escamilla R. Breastfeeding during the first hour of life and neonatal mortality. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(2):131-6.
7. Arifeen S, Black RE, Antelman G, Baqui A, Caulfield L, Becker S. Exclusive breastfeeding reduces acute respiratory infection and diarrhea deaths among infants in Dhaka slums. *Pediatrics.* 2001;108(4):E67.
8. Bernabucci U, Basiricò L, Morera P. Impact of hot environment on colostrum and milk composition. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2013;59(1):67-83.
9. Penttilä IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S21-5.
10. Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(8):3074-9.
11. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S3-7.
12. Parylak SL, Deng W, Gage FH. Mother's milk programs offspring's cognition. *Nat Neurosci.* 2014;17(1):8-9.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

13. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(1):49-74.
14. Lönnerdal B. Novel insights into human lactation as a driver of infant formula development. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2010;66:19-29.
15. Keen CL, Lönnerdal B, Clegg M, Hurley LS. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr.* 1981;111(2):226-36.
16. Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol.* 1979;3(3):225-39.
17. Gridneva Z, Kugananthan S, Hepworth AR, Tie WJ, Lai CT, Ward LC, et al. Effect of Human Milk Appetite Hormones, Macronutrients, and Infant Characteristics on Gastric Emptying and Breastfeeding Patterns of Term Fully Breastfed Infants. *Nutrients.* 2016;9(1).
18. Hawkes JS, Bryan DL, James MJ, Gibson RA. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatr Res.* 1999;46(2):194-9.
19. Yeh KY. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallel changes after induced stress. *Endocrinology.* 1984;115(4):1364-70.
20. Baram T, Koch Y, Hazum E, Fridkin M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science.* 1977;198(4314):300-2.
21. Krulich L, Koldovsky O, Jumawan T, Lau H, Horowitz C. TSH in serum and milk of normal, thyroidectomized, and hyperthyroid lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1977;155(4):599-601.
22. Donovan SM, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in rat milk. *Pediatr Res.* 1991;29(1):50-5.
23. Koldovský O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J Nutr.* 1989;119(11):1543-51.
24. Kacsóh B, Tóth BE, Grosvenor CE. Thyrotropin-releasing hormone mediates growth hormone release induced by milk and nursing in neonatal rats. *J Neuroendocrinol.* 1992;4(6):663-72.
25. Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(8):1199-209.
26. Dvorák B, Koldovský O. The presence of transforming growth factor-alpha in the suckling rat small intestine and pancreas and the absence in rat milk. *Pediatr Res.* 1994;35(3):348-53.

27. Penttilä IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression. In postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res*. 1998;44(4):524-31.
28. Puddington L, Matson A. Breathing easier with breast milk. *Nat Med*. 2008;14(2):116-8.
29. World Health Organization [internet]. Geneva; c2008 [acesso em 13 abr 2017]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/world_breastfeeding_week_20090731/en/.
30. Departamento de Informação do Sistema Único de Saúde [internet]. Brasília; c2012 [acesso em 13 abr 2017]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>.
31. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2013;382(9890):427-51.32.
32. de Araújo OD, da Cunha AL, Lustosa LR, Nery IS, Mendonça RCM, Campelo SMA. Aleitamento materno: fatores que levam ao desmame precoce. *Rev. bras. Enferm*. 2008;61(4):488-492.
33. de Oliveira CS, Iocca FA, Carrijo MLR, Garcia RATM. Amamentação e as intercorrências que contribuem para o desmame precoce. *Rev. Gaúcha Enferm*. 2015;36(spe):16-23.
34. Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses. Geneva: World Health Organization; 2007.
35. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*. 2010;6(1):25-36.
36. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015;104(467):14-9.
37. Shields L, O'Callaghan M, Williams GM, Najman JM, Bor W. Breastfeeding and obesity at 14 years: a cohort study. *J Paediatr Child Health*. 2006;42(5):289-96.
38. Rebhan B, Kohlhuber M, Schwegler U, Fromme H, Abou-Dakn M, Koletzko BV. Breastfeeding duration and exclusivity associated with infants' health and growth: data from a prospective cohort study in Bavaria, Germany. *Acta Paediatr*. 2009;98(6):974-80.
39. Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res*. 2013;45(1):22-30.

40. Peixoto-Silva N, Moura EG, Carvalho JC, Nobre JL, Quitete FT, Pinheiro CR, et al. Bromocriptine treatment at the end of lactation prevents hyperphagia, higher visceral fat and liver triglycerides in early-weaned rats at adulthood. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44(4):488-499.
41. de Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem*. 2007;18(2):134-9.
42. Veena SR, Krishnaveni GV, Wills AK, Hill JC, Karat SC, Fall CH. Glucose tolerance and insulin resistance in Indian children: relationship to infant feeding pattern. *Diabetologia*. 2011;54(10):2533-7.
43. Al Mamun A, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM, Callaway L, McIntyre HD. Breastfeeding is protective to diabetes risk in young adults: a longitudinal study. *Acta Diabetol*. 2015;52(5):837-44.
44. Nobre LN, Lessa AD. Influence of breastfeeding in the first months of life on blood pressure levels of preschool children. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92(6):588-94.
45. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Mukaida K, et al. Breastfeeding and the prevalence of allergic diseases in schoolchildren: Does reverse causation matter? *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(1 Pt 1):60-6.
46. Codispoti CD, Levin L, LeMasters GK, Ryan P, Reponen T, Villareal M, et al. Breast-feeding, aeroallergen sensitization, and environmental exposures during infancy are determinants of childhood allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1054-60.e1.
47. Bowatte G, Tham R, Allen KJ, Tan DJ, Lau M, Dai X, et al. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015;104(467):85-95.
48. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015;104(467):38-53.
49. Pukander J, Luotonen J, Timonen M, Karma P. Risk factors affecting the occurrence of acute otitis media among 2-3-year-old urban children. *Acta Otolaryngol*. 1985;100(3-4):260-5.
50. Li R, Dee D, Li CM, Hoffman HJ, Grummer-Strawn LM. Breastfeeding and risk of infections at 6 years. *Pediatrics*. 2014;134 Suppl 1:S13-20.
51. Ono M, Kikusui T, Sasaki N, Ichikawa M, Mori Y, Murakami-Murofushi K. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. *Neuroscience*. 2008;156(4):1103-10.
52. Kikusui T, Isaka Y, Mori Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. *Behav Brain Res*. 2005;162(2):200-6.

53. Grace T, Oddy W, Bulsara M, Hands B. Breastfeeding and motor development: A longitudinal cohort study. *Hum Mov Sci.* 2017;51:9-16.
54. Oddy WH, Kendall GE, Blair E, De Klerk NH, Stanley FJ, Landau LI, et al. Breast feeding and cognitive development in childhood: a prospective birth cohort study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2003;17(1):81-90.
55. Whitehouse AJ, Robinson M, Li J, Oddy WH. Duration of breast feeding and language ability in middle childhood. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011;25(1):44-52.
56. Fonseca AL, Albernaz EP, Kaufmann CC, Neves IH, Figueiredo VL. Impact of breastfeeding on the intelligence quotient of eight-year-old children. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(4):346-53.
57. Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol.* 1981;241(3):G199-214.
58. Shanks N, Lightman SL. The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J Clin Invest.* 2001;108(11):1567-73.
59. Gama P, Alvares EP. LHRH and somatostatin effects on the cell proliferation of the gastric epithelium of suckling and weaning rats. *Regul Pept.* 1996;63(2-3):73-8.
60. Ogias D, de Andrade Sá ER, Alvares EP, Gama P. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. 2010;26(2):224-9.
61. Glavin GB, Pare WP. Early weaning predisposes rats to exacerbated activity-stress ulcer formation. *Physiol Behav.* 1985;34(6):907-9.
62. Greenberg D, Ackerman SH. Reduced fat stores after early weaning: a correlate of vulnerability of stress ulcers. *Physiol Behav.* 1986;38(3):375-9.
63. Bjorkqvist M, Dornonville de la Cour C, Zhao CM, Gagnemo-Persson R, Hakanson R, Norlen P. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. *Regul Pept.* 2002;108(2-3):73-82.
64. Lee ER, Trasler J, Dwivedi S, Leblond CP. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. *Am J Anat.* 1982;164(3):187-207.
65. Karam SM. Cell lineage relationship in the stomach of normal and genetically manipulated mice. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(2):271-9.
66. Willet SG, Mills JC. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: From Embryogenesis to Adult Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;2(5):546-559.
67. Fiore APZP. Regulação de p27^{kip1} pelo fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) na mucosa gástrica de ratos lactentes. [tese (Doutorado em Biologia

Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

68. Choi E, Roland JT, Barlow BJ, O'Neal R, Rich AE, Nam KT, et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. *Gut*. 2014;63(11):1711-20.

69. MRuchaudills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology*. 2011;140(2):412-24.

70. Kim TH, Shivdasani RA. Stomach development, stem cells and disease. *Development*. 2016;143(4):554-65.

71. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec*. 1993;236(2):259-79.

72. Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, Kohu K, Voon DC, Hiai H, Unno M, So JB, Zhu F, Srivastava S, Teh M, Yeoh KG, Osato M, Ito Y. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. *Gastroenterology*. 2017;152(1):218-231.

73. McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deheragoda M, Leedham SJ, et al. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology*. 2008;134(2):500-10.

74. Hoffmann W. TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol*. 2015;47(3):806-16.

75. Stange DE, Koo BK, Huch M, Sibbel G, Basak O, Lyubimova A, et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell*. 2013;155(2):357-68.

76. Mills JC, Sansom OJ. Reserve stem cells: Reprogramming of differentiated cells fuels repair, metaplasia, and neoplasia in the adult gastrointestinal tract. *Sci Signal*. 2015;8(385):re8.

77. Alvares EP. The effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day-old suckling rat. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(6):641-9.

78. Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26(8):869-73.

79. Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development*. 2007;134(1):211-22.

80. Stevens CE, Leblond CP. Renewal of the mucous cells in the gastric mucosa of the rat. *Anat Rec*. 1953;115(2):231-45.

81. Keeley TM, Samuelson LC. Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(6):G1241-51.
82. Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(15):1946-54.
83. Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat Rec*. 1993;236(2):314-32.
84. Li H, Helander HF. Parietal cell kinetics after administration of omeprazole and ranitidine in the rat. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30(3):205-9.
85. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat Rec*. 1993;236(2):333-40.
86. Kang W, Rathinavelu S, Samuelson LC, Merchant JL. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy. *Lab Invest*. 2005;85(5):702-15.
87. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec*. 1993;236(2):297-313.
88. Karam SM, Leblond CP. Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. *Anat Rec*. 1992;232(2):231-46.
89. Lemerrier C, To RQ, Swanson BJ, Lyons GE, Konieczny SF. Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Dev Biol*. 1997;182(1):101-13.
90. Pin CL, Bonvissuto AC, Konieczny SF. Mist1 expression is a common link among serous exocrine cells exhibiting regulated exocytosis. *Anat Rec*. 2000;259(2):157-67.
91. Huh WJ, Esen E, Geahlen JH, Bredemeyer AJ, Lee AH, Shi G, et al. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. *Gastroenterology*. 2010;139(6):2038-49.
92. Judd LM, Gleeson PA, Toh BH, van Driel IR. Autoimmune gastritis results in disruption of gastric epithelial cell development. *Am J Physiol*. 1999;277(1 Pt 1):G209-18.
93. Mills JC, Taghert PH. Scaling factors: transcription factors regulating subcellular domains. *Bioessays*. 2012;34(1):10-6.
94. Tian X, Jin RU, Bredemeyer AJ, Oates EJ, Błazewska KM, McKenna CE, et al. RAB26 and RAB3D are direct transcriptional targets of MIST1 that regulate exocrine granule maturation. *Mol Cell Biol*. 2010;30(5):1269-84.

95. Capoccia BJ, Jin RU, Kong YY, Peek RM Jr, Fassan M, Rugge M, Mills JC. The ubiquitin ligase Mindbomb 1 coordinates gastrointestinal secretory cell maturation. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1475-91.
96. Drenzo D, Hess DA, Damsz B, Hallett JE, Marshall B, Goswami C, et al. Induced *Mist1* expression promotes remodeling of mouse pancreatic acinar cells. *Gastroenterology.* 2012;143(2):469-80.
97. Chikada H, Ito K, Yanagida A, Nakauchi H, Kamiya A. The basic helix-loop-helix transcription factor, *Mist1*, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts. *Sci Rep.* 2015;5:14989.
98. Bredemeyer AJ, Geahlen JH, Weis VG, Huh WJ, Zinselmeyer BH, Srivatsan S, et al. The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. *Dev Biol.* 2009;325(1):211-24.
99. Nozaki K, Weis V, Wang TC, Falus A, Goldenring JR. Altered gastric chief cell lineage differentiation in histamine-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(6):G1211-20.
100. Schepp W, Ruoff HJ, Miederer SE. Cellular origin and release of intrinsic factor from isolated rat gastric mucosal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1983;763(4):426-33.
101. Zhu L, Hatakeyama J, Zhang B, Makdisi J, Ender C, Forte JG. Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(2):G185-95.
102. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell.* 2000;101(3):259-70.
103. Richter C, Tanaka T, Yada RY. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J.* 1998;335 (Pt 3):481-90.
104. Sanny CG, Hartsuck JA, Tang J. Conversion of pepsinogen to pepsin. Further evidence for intramolecular and pepsin-catalyzed activation. *J Biol Chem.* 1975;250(7):2635-9.
105. Furihata C, Saito D, Fujiki H, Kanai Y, Matsushima T, Sugimura T. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *Eur J Biochem.* 1980;105(1):43-50.
106. Taggart RT, Mohandas TK, Shows TB, Bell GI. Variable numbers of pepsinogen genes are located in the centromeric region of human chromosome 11 and determine the high-frequency electrophoretic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(18):6240-4.
107. Hersey SJ. Gastric Secretion of Pepsins. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3. ed. New York: Raven Press; 1994. v. 2, p. 1227-1238.

108. Nakai H, Byers MG, Shows TB, Taggart RT. Assignment of the pepsinogen gene complex (PGA) to human chromosome region 11q13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):215-7.
109. Pals G, Azuma T, Mohandas TK, Bell GI, Bacon J, Samloff IM, et al. Human pepsinogen C (progastricsin) polymorphism: evidence for a single locus located at 6p21.1-pter. *Genomics.* 1989;4(2):137-48.
110. Chew CS. Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine, and forskolin increase $[Ca^{2+}]_i$ in gastric glands. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 1):G814-23.
111. Berger S, Raufman JP. Prostaglandin-induced pepsinogen secretion from dispersed gastric glands from guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 1985;249(5 Pt 1):G592-8.
112. Gespach C, Bataille D, Dupont C, Rosselin G, Wünsch E, Jaeger E. Evidence for a cyclic AMP system highly sensitive to secretin in gastric glands isolated from the rat fundus and antrum. *Biochim Biophys Acta.* 1980;630(3):433-41.
113. Defize J, Hunt RH. Control of pepsinogen synthesis and secretion in primary monolayer cultures of canine gastric chief cells. *Dig Dis Sci.* 1988;33(12):1583-91.
114. Raufman JP, Malhotra R, Xie Q, Raffaniello RD. Expression and phosphorylation of a MARCKS-like protein in gastric chief cells: further evidence for modulation of pepsinogen secretion by interaction of Ca^{2+} /calmodulin with protein kinase C. *J Cell Biochem.* 1997;64(3):514-23.
115. Xie G, Raufman JP. Association of protein kinase A with AKAP150 facilitates pepsinogen secretion from gastric chief cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(4):G1051-8.
116. Ge YB, Ohmori J, Tsuyama S, Yang DH, Kato K, Miyauchi M, et al. Immunocytochemistry and in situ hybridization studies of pepsinogen C-producing cells in developing rat fundic glands. *Cell Tissue Res.* 1998;293(1):121-31.
117. Kumegawa M, Takuma T, Hosoda S, Kunii S, Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Biochim Biophys Acta.* 1978;543(2):243-50.
118. Kataoka K, Sakano Y, Miura J. Histogenesis of the mouse gastric mucosa, with special reference to type and distribution of proliferative cells. *Arch Histol Jpn.* 1984;47(5):459-74.
119. Gama P, Alvares EP. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. *J Nutr.* 2000;130(10):2594-8.
120. Xiao ZQ, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligiel SE, Majumdar AP. Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(15):1849-64.

121. Lee PC, Lebenthal E. Early weanling and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. *Pediatr Res.* 1983;17(8):645-50.
122. Osaki LH, Curi MA, Alvares EP, Gama P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGF α /EGFR. *Differentiation.* 2010;79(1):48-56.
123. Biol-N'garagba MC, Louisot P. Regulation of the intestinal glycoprotein glycosylation during postnatal development: role of hormonal and nutritional factors. *Biochimie.* 2003;85(3-4):331-52.
124. Ghizoni H, Figueiredo PM, Moisan MP, Ogias D, Osaki LH, Gama P. Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. *Nutrition.* 2014;30(3):343-9.
125. Lin CH, Lyons H, Seelbach MS, Tolia V, Vijesurier R. Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. *Digestion.* 2001;63(4):214-9.
126. Osaki LH, Figueiredo PM, Alvares EP, Gama P. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. *Cell Prolif.* 2011;44(2):174-82.
127. Osaki LH, Gama P. MAPK signaling pathway regulates p27 phosphorylation at threonine 187 as part of the mechanism triggered by early-weaning to induce cell proliferation in rat gastric mucosa. *PLoS One.* 2013;8(6):e66651.
128. Bittar NM, Zulian JG, Ogias D, Gama P. Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? *Nutrition.* 2016;32(1):101-7.
129. Zulian JG, Hosoya LY, Figueiredo PM, Ogias D, Osaki LH, Gama P. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. *Sci Rep.* 2017;(7):45867.
130. Jacobs DM, Ackerman SH. Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. *Am J Physiol.* 1984;247(6 Pt 1):G645-50.
131. Chen C, Zhu WD, Zhang XH, Zhu YH, Huang JA. Value of Ki-67 and computed tomography in the assessment of peripheral lung adenocarcinoma. *Br J Biomed Sci.* 2016;73(1):32-7.
132. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
133. Gonzalez-Sistal A, Baltasar-Sánchez A, Menéndez P, Arias JI, Ruibal Á. Breastfeeding and Immunohistochemical Expression of ki-67, p53 and BCL2 in Infiltrating Lobular Breast Carcinoma. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151093.

134. Shiraishi T. Cell kinetic analysis of brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67: in vitro and in situ study. *Acta Med Okayama*. 1990;44(4):187-201.
135. Wierzbicka-Tutka I, Sokołowski G, Baldys-Waligórska A, Adamek D, Radwańska E, Gołkowski F. PTTG and Ki-67 expression in pituitary adenomas. *Przegl Lek*. 2016;73(2):53-8.
136. Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988;56(1):25-33.
137. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016;535(7611):308-12.
138. Aherne WA, Camplejohn RS, Al-Wiswasy M, Ford D, Kellerer AM. Assessment of inherent fluctuations of mitotic and labelling indices of human tumours. *Br J Cancer*. 1977;36(5):577-82.
139. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
140. Gama P, Alvares EP. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation in the gastric epithelium of suckling rats *J Gastroenterol*. 1998;33(1):32-8.
141. Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):977-84.
142. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci*. 2004;7(5):493-4.
143. Boueri BFC, Pessanha CR, Costa LR, Ferreira MR, Melo HS, Abreu MDC, Pessoa LR, Silva PCA, Pereira AD, Ribeiro DC, Meneses JA, Costa CAS, Boaventura GT. Body composition in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. *J Dev Orig Health*. 2015;6(6):553-557.
144. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res*. 2000;20(11):1603-1612.
145. Jang M, Mistry A, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice. *J Nutr*. 2000;130(11):2813-20.
146. Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet*. 2006;70(4):295-301.

147. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. *Pediatric Research*. 2011;70(6):633-637.
148. Lima NS, De Moura EG, Passos MCF, Neto JFN, Reis AM, De Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin-resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2011;105(9):1405-13.
149. Szostaczuk N, Priego T, Palou M, Palou A, Picó C. Oral leptin supplementation throughout lactation in rats prevents later metabolic alterations caused by gestational calorie restriction. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(3):360-71.
150. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001;50(2):227-32.
151. Lin CH, Correia L, Tolia K, Gesell MS, Tolia V, Lee PC, Luk GD. Early weaning induces jejunal ornithine decarboxylase and cell proliferation in neonatal rats. *J Nutr*. 1998;128:1636-42.
152. Hallam MC, Reimer RA. Impact of Diet Composition in Adult Offspring is Dependent on Maternal Diet during Pregnancy and Lactation in Rats. *Nutrients*. 2016;8(1).
153. Lee S, You YA, Kwon EJ, Jung SC, Jo I, Kim YJ. Maternal Food Restriction during Pregnancy and Lactation Adversely Affect Hepatic Growth and Lipid Metabolism in Three-Week-Old Rat Offspring. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
154. Velkoska E, Cole TJ, Dean RG, Burrell LM, Morris MJ. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *J Nutr*. 2008;138(9):1622-7.
155. Gayle DA, Desai M, Casillas E, Beloosesky R, Ross MG. Gender-specific orexigenic and anorexigenic mechanisms in rats. *Life Sci*. 2006;79(16):1531-1536.
156. Simões C. Proliferação, diferenciação, maturação e migração de populações celulares do epitélio gástrico do rato durante o primeiro mês de vida. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1992.
157. Ackerman SH. Early life events and peptic ulcer susceptibility: an experimental model. *Brain Res Bull*. 1980;5 Suppl 1:43-9.
158. Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Age at maternal separation and gastric erosion susceptibility in the rat. *Psychosom Med*. 1975;37(2):180-4.
159. Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Predisposition to gastric erosions in the rat: behavioral and nutritional effects of early maternal separation. *Gastroenterology*. 1978;75(4):649-54.

160. Tsukahara T, Inoue R, Yamada K, Yajima T. A mouse model study for the villous atrophy of the early weaning piglets. *J Vet Med Sci.* 2010;72(2):241-244.
161. Marion J, Petersen YM, Romé V, Thomas F, Sangild PT, Le Dividich J, Le Huërou-Luron I. Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(4):401-410.
162. Bullough WS. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1962;37:307-342.
163. Garofano A, Czernichow P, Bréant B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia.* 1998;41(9):1114-1120.
164. Godoy MA, Souza AS, Lobo MA, Sampaio OV, Moraes L, Baldanza MR, Magri TP, Wernerck de Castro JP, Tavares do Carmo Md, Soares-Mota M, Rocha MS, Mendez-Otero R, Santiago MF. Effects of protein restriction during gestation and lactation on cell proliferation in the hippocampus and subventricular zone: functional implications. Protein restriction alters hippocampal/SVZ cell proliferation. *Brain Res.* 2013;1496:10-27.
165. Pérez-García G, Guzmán-Quevedo O, Aragão RS, Bolaños-Jiménez F. Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Sci Rep.* 2016;17(6):21275.
166. Kasai A, Gama P, Alvares EP. Protein restriction inhibits gastric cell proliferation during rat postnatal growth in parallel to ghrelin changes. *Nutrition.* 2012;28(6):707-712.
167. Nakajima T, Konda Y, Izumi Y, Kanai M, Hayashi N, Chiba T, Takeuchi T. Gastrin stimulates the growth of gastric pit cell precursors by inducing its own receptors. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2002;282(2):G359-G366.
168. Liu L, Turner JR, Yu Y, Khan AJ, Jaszewski R, Fligiel SE, Majumdar AP. Differential expression of EGFR during early reparative phase of the gastric mucosa between young and aged rats. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):G943-950.
169. Moore BD, Khurana SS, Huh WJ, Mills JC. Hepatocyte nuclear factor 4 α is required for cell differentiation and homeostasis in the adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311(2):G267-75.
170. Tanaka T, Yasunami S, Ohtani K, Nakano J, Tani S. Regulation of gastric mucosal pepsinogen and intrinsic factor contents, and their m RNA levels during starvation and refeeding in rats. *Biol Pharm Bull.* 1999;22(12):1293-5.
171. Yokhana JS, Parkinson G, Frankel TL. Effect of insoluble fiber supplementation applied at different ages on digestive organ weight and digestive enzymes of layer-strain poultry. *Poultry Science.* 2015;00:1-10.