MELISSA TELES SILVA

**O DESMAME PRECOCE AUMENTA E REPROGRAMA A DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS MUCOSAS DO COLO EM CÉLULAS ZIMOGENICAS NA
MUCOSA GÁSTRICA DE 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
2018

RESUMO

SILVA MT. O Desmame Precoce Aumenta e Reprograma a Diferenciação de Células Mucosas do Colo em Células Zimogênicas na Mucosa Gástrica de Ratos. 2018.74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Na mucosa gástrica, cinco tipos compõe o epitélio gástrico: mucosas superficiais, parietais (CP), mucosas do colo (CMC), endócrinas e zimogênicas (CZ). As CMC originam as células CZ por transdiferenciação e a população de CP é importante para que o processo ocorra. Durante a transdiferenciação observamos células com características de CMCs e CZs, denominadas células em transição (CT) que ocupam o segmento entre o colo e a base da glândula. Essa transição entre células e a presença de CP são essenciais para a homeostase da base da glândula. Porém, estudos mostram que alterações no padrão alimentar influenciam a organização do epitélio gástrico de ratos, e o desmame precoce (DP) modifica a dinâmica de proliferação, migração e maturação das células. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos imediatos do DP sobre as populações de CMC, CZ, CT e CP, e investigar se tais efeitos são mantidos até a vida adulta. Para isso, ratos Wistar (CEUA ICB USP 18/2015) foram divididos em dois grupos: amamentado controle (A) (permaneceram com a mãe até 21 dias), e DP (separados das mães aos 15 dias). O estômago foi coletado aos 18, 30 e 60 dias de vida pós-natal. Em cortes histológicos, verificamos que o índice de CP não foi alterado pelo DP, porém a distribuição dessa célula na glândula foi modificada aos 18 e 30 dias. Sob microscopia de fluorescência e confocal, observamos que o DP aumentou a população de CMC (GSII-FITC+) aos 18 dias (A vs DP; $P<0,01$), e de CZ (Mist1-Cy3+) aos 18 e 60 dias (A vs DP; $P<0,05$). O número de CT/campo (GSII-FITC+Mist1-Cy3) não se alterou após o DP, evidenciando que o segmento de transição entre o colo e a base da glândula representa um importante controle de tamanho populacional. Para avaliar o comportamento de CT em relação ao seu destino (CZ) e sua origem (CMC), analisamos o índice de CT sobre essas populações. Sobre o destino, devido à ausência de resposta no número de CT/campo e ao aumento de CZ nos animais DP, o índice CT/CZs variou aos 18 e 30 dias. No entanto, o índice de CT/CMC (origem) não foi alterado pelos tratamentos nas diferentes idades. Sob microscopia eletrônica de transmissão, avaliamos as características ultraestruturais das CMC, CT e CZ aos 18 dias, e observamos principalmente as organelas envolvidas na reorganização das células durante a

transdiferenciação. Nosso estudo mostrou que o desmame precoce acelera a diferenciação celular e muda a distribuição de células mucosas do colo e zimogênicas na glândula gástrica, porém esse processo ocorre com preservação do tamanho compartimento de transição e do número de células parietais. Assim, podemos sugerir que o desmame precoce aumenta a população de células zimogênicas por meio de uma passagem mais rápida entre a região do colo e da base, na presença de células parietais, e esse mecanismo seria acionado logo após a transição da dieta, podendo manter-se ativo até a vida adulta.

Palavras chaves: Estômago. Epitélio. Diferenciação celular. Desmame precoce. Amamentação.

ABSTRACT

SILVA MT. Early Weaning Induces and Reprograms Differentiation of Mucous Neck Cells into Zymogenic Cells in the Gastric Mucosa of Rats. 2018. 74f. (Masters thesis in Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Five epithelial cell types are found in the gastric mucosa: surface mucous, parietal (PC), mucous neck (MNC), endocrine, and zymogenic (ZC). The MNC originates ZC through transdifferentiation, and the presence of PC is important for the process. During transdifferentiation, we observe cells that present characteristics from MNC and ZC that are identified as transition cells (TC). They occupy the area between the neck and base of the gastric gland. The transition between these cells and the presence PC are essential for homeostasis at the base of the gland. However, studies show that changes in dietary pattern influence the organization of rat gastric epithelium, and early weaning (EW) modifies the proliferation, migration and maturation dynamics of these cells. Our aim was to evaluate the immediate effects of EW on the populations of MNC, ZC, TC and PC, and to investigate if such effects are maintained until adult life. To that, Wistar rats (CEUA ICB USP 18/2015) were divided into two groups: suckling control (S) (pups remained with the mother until 21 days), and EW (pups were separated from mother at 15 days). The stomach was collected at 18, 30 and 60 postnatal days. After analyses of histological sections, we verified that PC indices were not altered by EW, but the distribution of this cell was modified at the 18 and 30 days. By fluorescence and confocal microscopy, we determined that EW increased MNC population at 18 days (S vs EW, $P < 0.01$), and ZC at 18 and 60 day (S vs EW; $P < 0.05$). TC number/field did not change after EW, indicating that the transition between neck and gland base is under an important population control. In order to evaluate the behavior of TC regarding its final differentiation (ZC) and origin (MNC), we calculated TC index on these populations. In relation to ZC, we found a variation in TC index at 18 and 30 days, specially because TC number did not change, whereas ZC population increased. However, the TC index on GSII + cells (origin) was not altered by treatments throughout growth and ageing. Finally, under electron microscopy, we studied the ultra structure of MNC, TC and ZC and observed the reorganization of secretory apparatus during transdifferentiation at 18 days. Thus, we can suggest that EW increases ZC population through a rapid traffic through transition compartment between neck and base, in the presence of parietal cells, and such mechanism would be triggered soon after dietary transition and be kept activated until adult life.

Keywords: Stomach. Epithelium. Cell differentiation. Early Weaning. Suckling.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O estômago

O estômago é uma dilatação do tubo digestório situada entre o esôfago e o intestino delgado, e é um órgão que apresenta três funções básicas: 1) secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, água, eletrólitos, fator intrínseco e glicoproteínas; 2) síntese de hormônios, como gastrina, ghrelina, somatostatina, colecistoquinina e outros; 3) mistura do alimento ao fluido estomacal (Björkqvist *et al.*, 2002).

Em roedores o estômago é subdividido em três regiões histologicamente distintas (Fig. 1): 1) córnea, região adjacente ao esôfago; 2) corpo, porção mediana, é a principal responsável pelo processo digestivo, e 3) antro, porção distal que antecede o intestino. A organização do epitélio na mucosa gástrica de roedores varia com a região do estômago observada (Lee *et al.*, 1982).

Figura 1 – Organização anatômica do estômago de ratos. O estômago está organizado em regiões histologicamente distintas: córnea, corpo e antro. As setas indicam o caminho feito pelo bolo alimentar (Fiore, 2013).

1.1.1 Mucosa gástrica

A região da córnea é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que não apresenta função glandular; na região do corpo, a mucosa é espessa e formada por profundas glândulas tubulares que se abrem na superfície em uma área denominada fosseta, e a região do antro possui glândulas rasas e enoveladas (Willet e Mills, 2016).

Na região do corpo, as glândulas gástricas podem ser divididas em 3 segmentos: istmo, colo e base (Fig. 2). O istmo é a porção superior da glândula gástrica em contato com a fosseta; o colo representa a porção mediana da glândula, e a base é porção mais profunda da glândula. Em termos de distribuição de populações celulares, o segmento da fosseta é revestido por células mucosas superficiais, enquanto a glândula gástrica é composta por: células- tronco e progenitoras, células parietais, células mucosas do colo, células zimogênicas e células enteroendócrinas; existem também subpopulações de células imaturas como as pré-parietais, pré-mucosas, pré-endócrinas e células em transição entre mucosas do colo e zimogênicas (Mills e Shivdasani, 2011; Choi *et al.*, 2014).

Figura 2 – Fotomicrografia da mucosa gástrica na região do corpo do estômago, indicando a fosseta e a glândula, bem como as regiões de istmo, colo e base. A área de transição entre o colo e a base, importante para o presente estudo, está destacada. Imagem obtida a partir de estômago de rato aos 30 dias vida pós-natal. Corte em parafina corado em Hematoxilina e Eosina (HE).

1.1.1.1 Células- tronco e progenitoras

Atualmente existem duas teorias que discutem a origem das células epiteliais gástricas em adultos (Mills e Shivdasani, 2011; Willet e Mills, 2016; Wright, 2016).

A primeira defende que todas as células epiteliais que compõem a unidade glandular são derivadas de uma única célula- tronco pluripotente. Acredita-se que esta célula cicle lentamente e mantenha uma população de células- filhas indiferenciadas que saem do nicho, migram pela glândula e se diferenciam em subpopulações de: pré-mucosas superficiais, pré-parietais, pré-mucosas do colo e pré-endócrinas, que após a maturação originam as células epiteliais anteriormente citadas (Karam e Leblond, 1993a; McDonald *et al.*, 2008; Goldenring *et al.*, 2011; Mills e Shivdasani, 2011)

A segunda teoria propõe que as células- tronco pluripotentes são perdidas durante o desenvolvimento, restando apenas células progenitoras já comprometidas com determinadas linhagens epiteliais, e essas células ciclam e originam populações específicas de células gástricas (Bjerknes e Cheng, 2002; Willet e Mills, 2016).

Estudos estão sendo realizados para aprofundar as investigações sobre as células- tronco e progenitoras no corpo gástrico (Wright, 2016). Entretanto, sabemos que em animais adultos as células epiteliais gástricas têm origem na interface entre istmo e colo da glândula, sendo este considerado o principal nicho ativo de células proliferativas na mucosa adulta (Willet e Mills, 2016). Um nicho secundário e inativo se localiza na base da glândula, sendo ativado em caso de lesão aguda, e considerado assim, um nicho proliferativo reserva (Stange *et al.*, 2013).

Previamente, nosso grupo demonstrou que em filhotes as células proliferativas são detectadas ao longo de toda a extensão da glândula, indicando que na fase de crescimento, antes do estabelecimento das regiões glandulares, a proliferação celular não está restrita ao nicho principal (istmo - colo) (Alvares e Gama, 1993; Ghizoni *et al.*, 2014; Zonta *et al.*, 2018). Apesar da diversidade de células epiteliais na glândula gástrica, no presente trabalho destacaremos as populações de células parietais, células mucosas do colo, células zimogênicas e a subpopulação de células em transição. Nosso grupo ainda está desenvolvendo pesquisas sobre o tema, portanto, não nos comprometeremos com nenhuma das duas teorias existentes no momento, apenas identificaremos as células que dão origem às outras populações como células- tronco e progenitoras.

1.1.1.2 Células parietais

A célula parietal (CP) tem origem nas células- tronco e progenitoras gástricas. Células imaturas saem do nicho proliferativo e migram de forma bidirecional pela glândula originando as parietais, que tem um ciclo de maturação de aproximadamente

50 dias. A CP madura é observada em toda a extensão da glândula, e é uma célula grande, com núcleo arredondado e centralizado (Fig. 3); o citoplasma é rico em mitocôndrias e em um sistema tubulo- vesicular que se funde à membrana plasmática, formando canalículos intracelulares quando a célula esta ativa (Ito e Schofield, 1974; Karam, 1993).

Essa população é conhecida pelo seu papel no transporte de íons H^+ e Cl^- que se combinam em HCl (ácido clorídrico) na luz do estômago. Entretanto, as CP apresentam diversas funções, como síntese e secreção de fatores de crescimento como TGF β e TGF α (De Andrade Sá *et al.*, 2008; Ogias, De Andrade Sá, Alvares, *et al.*, 2010), fatores angiogênicos como fator de *crescimento endotelial vascular* (VEGF) (Jones *et al.*, 1999), e recentemente discutiu-se o papel da CP na organização do nicho de células-tronco e sua importância na manutenção da estrutura da glândula gástrica (Goldenring *et al.*, 2011; Mills e Sansom, 2015).

1.1.1.3 Células mucosas do colo

A célula mucosa do colo (CMC) também tem origem nas células-tronco e progenitoras gástricas, das quais uma subpopulação se diferencia e migra em direção à região do colo, tornando-se uma CMC madura; o tempo de *turnover* é de aproximadamente 16 dias (Karam e Leblond, 1993b).

As CMCs localizam-se entre as células parietais da região do colo da glândula, são pequenas e triangulares, com núcleo basal (Fig.3). O citoplasma é repleto de grânulos mucosos, que contêm mucina 6 e fator espasmolítico (ou *trefoil factor 2* - TFF2) (Laine *et al.*, 2008). Esse muco ácido contribui para a proteção da glândula contra agressões químicas e mecânicas, e tem efeito antibiótico, inibindo o crescimento de *Helicobacter pylori* (De Bolós *et al.*, 1995; Bartman *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2000; Kawakubo *et al.*, 2004).

Estruturalmente, a mucina 6 apresenta o epitopo (N-acetilglicosamina) ao qual o marcador histoquímico lectina *Griffonia simplicifolia* II (GSII) se liga (Goldstein e Poretz, 1986). Por razões ainda desconhecidas, algumas CMC continuam a migrar em direção à base da glândula, e entram em um segundo processo de diferenciação, passando por uma fase de transição (região indicada Fig. 2), que ao final resultará em uma célula zimogênica madura (Karam e Leblond, 1993b; Mills e Shivdasani, 2011).

1.1.1.4 Células zimogênicas

A célula zimogênica (CZ) está localizada na base da glândula, é pequena e piramidal e ocupa a base da glândula gástrica (Fig. 3), o *turnover* dessa célula é de aproximadamente de 140 dias e é o mais longo das células epiteliais gástricas. (Karam e Leblond, 1993b).

Durante a transição da alimentação entre a amamentação e a dieta sólida (desmame), a CZ sintetiza e secreta o pepsinogênio do tipo C que no meio ácido do estômago é ativado em pepsina, enzima que faz a digestão de proteínas (Karam e Leblond, 1993b). A população de CZ é a única do estômago que não deriva diretamente das células progenitoras gástricas, mas sim das CMC (Karam e Leblond, 1993b; Ramsey *et al.*, 2007; Willet e Mills, 2016).

Em roedores, as CZs também sintetizam e secretam uma glicoproteína denominada fator intrínseco gástrico (GIF), que é importante para o desenvolvimento do animal nos períodos pré- e pós-natal, pois o GIF se liga à vitamina B12 para que essa seja absorvida no intestino. A deficiência em GIF causa baixo peso ao nascer, anemia severa e perda de massa óssea em camundongos (Roman-Garcia *et al.*, 2014).

Estudos recentes comprovaram que no corpo do estômago, algumas CZs maduras podem apresentar marcadores de células- tronco como o *tumor necrosis factor receptor superfamily member 19* (Troy) e o *Leucine- rich repeat- containing G-protein coupled receptor 5* (Lgr5) (Stange *et al.*, 2013; Leushacke *et al.*, 2017).

Além disso, trabalhos mostraram que embora já diferenciadas, essas células possuem a capacidade de entrar em divisão celular e gerar outros tipos de células epiteliais gástricas *in vitro e in vivo*. Atualmente acredita-se que as CZs constituam o nicho de células- tronco reserva, mencionado anteriormente, que é mobilizado em caso de uma lesão grave na glândula (Bredemeyer *et al.*, 2009; Stange *et al.*, 2013; Leushacke *et al.*, 2017). Por exemplo, diante de inflamações, as CZs podem passar por um novo processo de transdiferenciação, e originar as células metaplásicas que expressam *Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia* (células SPEM). Essas células caracterizam o cerne metaplásico de adenocarcinomas gástricos (Goldenring *et al.*, 2011; Radyk *et al.*, 2018).

Figura 3 – Fotomicrografia da mucosa gástrica na região do colo e transição para a base da glândula (rato 30 dias de vida pós- natal). Observa- se a distribuição de células parietais (CP no destaque), mucosas do colo (CMC no destaque) e zimogênicas (CZ no destaque). Corte em parafina corado em HE. Destaques apresentados em zoom digital em 100%.

1.1.1.5 Células em transição

A região entre o colo e a base da glândula gástrica (Fig. 2 e Fig. 3) caracteriza um espaço importante para a diferenciação de CMC em CZ. Conforme mencionado acima, parte da população de CMC se diferencia em CZ e as modificações moleculares, celulares e funcionais podem ser detectadas em um grupo de células em transição (CT). Esta é uma população singular, pois apresenta modificações na maquinaria de síntese (de glicoproteínas, predominantemente, para proteínas: mucosa para serosa) e contém grânulos de secreção heterogêneos em seu citoplasma (conteúdo misto, mucoso e seroso) (Fig. 4), indicando simultaneamente características de CMC e CZ (Karam e Leblond, 1993b).

A diferenciação de CMC em CZ tem sido alvo de vários estudos, e muitos descrevem a expressão de genes importantes para o desenvolvimento e funcionamento de seu aparato secretor durante o processo de transição. Zhu et al. (2008) mostraram que a proteína moesina tem papel importante na maturação do aparato secretor e aumenta gradualmente conforme a transição de CMC-CZ avança (Zhu *et al.*, 2009).

Mist1 está presente tanto nas CTs quanto nas CZs maduras, e tem papel fundamental na transdiferenciação de CMC em CZ, uma vez que é o fator de transcrição de genes- alvo envolvidos na organização estrutural do aparato secretor da célula. Estudos em camundongos *knockout* para Mist1 demonstraram que as CTs não conseguem completar o processo de transição e diferenciação, o que provoca a deficiência de CZs maduras e diversos problemas estruturais na glândula (Ramsey *et al.*, 2007; Goldenring *et al.*, 2011; Mills e Taghert, 2012).

Além da necessidade de fatores que façam a regulação da diferenciação em si, como reportamos acima, sabe-se também que a presença de células parietais é importante para o microambiente no controle da proliferação, diferenciação e maturação das células epiteliais, e em especial na transição CMC- CZ. Nesse sentido, a perda de CP após um processo inflamatório prejudica a diferenciação CMC- CZ, e consequentemente a população CT (Judd *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2005; Nozaki *et al.*, 2008; Bredemeyer *et al.*, 2009).

Figura 4 – Fotomicrografia de mucosa gástrica na região de transição entre o colo e a base da glândula (rato de 18 dias de vida pós- natal). Corte semi- fino em resina corado em azul de toluidina. Nos destaques observam- se: células mucosa do colo (CMC), células em transição (CT), célula zimogênica (CZ), nas quais notam- se respectivamente, grânulos claros (mucosos), claros e escuros (mucosos e serosos) e escuros (serosos). Destaque: zoom digital em 100%.

1.2 Amamentação e o desmame precoce

O aleitamento materno (AM) em humanos é um excelente meio de promover a nutrição do neonato e a efetivação de vínculo mãe/bebê. Além das vantagens nutritivas, o AM é uma forma barata e simples de oferecer proteção contra a mortalidade infantil (Brasil *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil (MSB) recomendam que em bebês o aleitamento materno exclusivo (AME) deva se estender até os 6 meses de idade; a partir daí, deve-se introduzir alimentos sólidos e saudáveis como frutas, verduras, legumes e carnes, sem a suspensão do AM, que deve prosseguir até 2 anos de idade (Organization, 2009; Brasil *et al.*, 2015).

O MSB e a OMS são incisivos em afirmar a superioridade do leite humano sobre o leite de outras espécies e fórmulas industriais na promoção do bem-estar de crianças menores de 2 anos, pois somente o leite materno tem os nutrientes na quantidade certa a ser oferecida ao lactente (Organization, 2009; Brasil *et al.*, 2015).

Estudos mostram que bebês que passam pelo AME durante os 6 primeiros meses de vida tem como benefício imediato uma melhor nutrição, e menores chances de terem diarreia, infecções respiratórias, otites e alergias alimentares (Brasil *et al.*, 2015; Victora *et al.*, 2016). Em longo prazo, indivíduos que foram amamentados por mais tempo apresentaram menor risco de ter diabetes do tipo 2; menor possibilidade de sobrepeso/obesidade; pressões sistólicas e diastólicas mais baixas, e menores níveis de colesterol. Além disso, há evidências que apontam que o AM contribui para um melhor desenvolvimento cognitivo, e que as repercussões do desenvolvimento cerebral otimizadas pelo leite materno são detectadas até a vida adulta (Brasil *et al.*, 2015; Victora *et al.*, 2016).

Apesar das evidentes vantagens do AM, o desmame precoce (DP) em humanos é uma prática social comum, e é caracterizada pela interrupção do AM antes do 6 meses de idade. O último levantamento sobre AM no Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 (Boccolini *et al.*, 2017) constatou que somente 36,6% dos bebês brasileiros têm o AME até os 6 meses de idade, e apenas 31,8% tem acesso ao AM aos 2 anos. Além disso, uma pesquisa feita pelo MSB mostrou que a duração mediana do AME é de 54,1 dias (1,8 meses), e a duração mediana do AM é de 341,6 dias (11,2 meses) no conjunto das capitais brasileiras e Distrito federal. Constatou-se também o consumo elevado de

alimentos inadequados como café (8,7%), refrigerantes (11,6%) e bolachas e/ou salgadinhos (71,7%) entre as crianças de 9 e 12 meses (Saúde, 2009)

Uma revisão publicada pelo Departamento Científico de Aleitamento Materno da Sociedade Brasileira de Pediatria aponta que crenças/tabus sociais, e a volta das mães ao mercado de trabalho são os principais motivos pelos quais as crianças têm sido desmamadas precocemente (Pediatria, 2017).

Analogamente a humanos, outras espécies de mamíferos também passam pelo DP e estudos apontam efeitos adversos nos filhotes desmamados precocemente comparados a filhotes amamentados pelo período ideal.

Em porcos um estudo mostrou que filhotes que passaram pelo DP (separados da mãe no 6º dia de vida) apresentaram precocemente capacidade postural e de exploração do ambiente, comportamento mais agressivo e perda de peso, em relação aos animais da mesma idade que permaneceram com a mãe até o 28º dia de vida (Orgeur *et al.*, 2001). Um outro estudo mostrou que bezerros desmamados precocemente (separados das mães na 6ª semana) apresentavam maior atividade na microbiota intestinal que bezerros amamentados pelo período normal (até 8 semanas de vida) na mesma idade, e eles concluíram que o AM proporciona uma transição gradual do padrão alimentar, o que melhora as funções fermentativas e metabólicas do intestino, diminuindo o estresse do animal (Meale *et al.*, 2017).

Em ratos e camundongos utilizados para fins experimentais, consideramos o período de amamentação normal até o 21º dia (na natureza, o desmame ocorre por volta do 28º dia nesses roedores), enquanto em nosso modelo, o DP ocorre quando o filhote é abruptamente separado da mãe no 15º dia de vida (Osaki *et al.*, 2010).

Nosso grupo já demonstrou que o DP altera a atividade da corticosterona na mucosa gástrica, elevando os níveis hormonais nos primeiros dias de dieta sólida (Ghizoni *et al.*, 2014), além de provocar uma perda de massa corpórea em filhotes (Gama e Alvares, 2000; Zulian *et al.*, 2017). Outros estudos demonstraram o aumento de populações de CMC e CZ, e de células endócrinas secretoras de ghrelina em filhotes (Osaki *et al.*, 2010; Bittar *et al.*, 2016; Zulian *et al.* 2017), além de alterações da proliferação celular e a espessura da glândula gástrica (Gama e Alves, 2000; Zonta, 2017). Essas modificações ocorrem por meio mecanismos de regulação que envolvem a via de sinalização por MAPK (Alvares e Gama, 1993; Osaki *et al.*, 2011; Osaki e Gama, 2013) e receptores de glicocorticóides (Ghizoni *et al.*, 2014).

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que embora o desmame precoce acelere a diferenciação celular e modifique a distribuição de células mucosas do colo e zimogênicas, os elementos essenciais para que esse processo ocorra são mantidos, ou seja, há preservação do tamanho compartimento de transição e de células parietais na glândula. Adicionalmente, sugerimos que o desmame precoce aumenta a população de células zimogênicas por meio da passagem mais rápida entre a região do colo e da base, e destacamos que estes efeitos se iniciam logo após a transição da dieta, porém podem manter-se até a vida adulta.

8. REFERENCIAS

ALVARES, E. P.; GAMA, P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 8, p. 869-73, Aug 1993. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298523> >.

BARTMAN, A. E. et al. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. **J Pathol**, v. 186, n. 4, p. 398-405, Dec 1998. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209489> >.

BITTAR, N. M. et al. Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? **Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 101-7, Jan 2016. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26520918> >.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, n. 3, p. G767-77, Sep 2002. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181193> >.

BJÖRKQVIST, M. et al. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. **Regul Pept**, v. 108, n. 2-3, p. 73-82, Oct 2002. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220729> >.

BOCCOLINI, C. S. et al. Breastfeeding indicators trends in Brazil for three decades. **Rev Saude Publica**, v. 51, p. 108, 2017. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29166437> >.

BRASIL, M. D.; SAÚDE, S. D. A. À.; BÁSICA., D. D. A. **SAÚDE DA CRIANÇA: Aleitamento Materno e Alimentação Complementar**. Coordenação-Geral de Documentação e Informação. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 184 ISBN 978-85-334-2290-2. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_aleitamento_materno_cab23.pdf >.

BREDEMEYER, A. J. et al. The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. **Dev Biol**, v. 325, n. 1, p. 211-24, Jan 2009. ISSN 1095-564X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013146> >.

BURCLAFF, J. et al. Targeted Apoptosis of Parietal Cells Is Insufficient to Induce Metaplasia in Stomach. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 762-766.e7, 03 2017. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932312> >.

CHOI, E. et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**, v. 63, n. 11, p. 1711-20, Nov 2014. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24488499> >.

DE ANDRADE SÁ, E. R. et al. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. **Regul Pept**, v. 146, n. 1-3, p. 293-302, Feb 2008. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068234> >.

DE BOLÓS, C.; GARRIDO, M.; REAL, F. X. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. **Gastroenterology**, v. 109, n. 3, p. 723-34, Sep 1995. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657100> >.

ENGEVIK, A. C. et al. The acid-secreting parietal cell as an endocrine source of Sonic Hedgehog during gastric repair. **Endocrinology**, v. 154, n. 12, p. 4627-39, Dec 2013. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092639> >.

GAMA, P.; ALVARES, E. P. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. **J Nutr**, v. 130, n. 10, p. 2594-8, Oct 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015495> >.

_____. Localization of luteinizing-hormone releasing hormone binding sites in the gastric mucosa of suckling rats. **Anat Rec**, v. 264, n. 1, p. 43-50, Sep 2001. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505370> >.

GHIZONI, H. et al. Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. **Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 343-9, Mar 2014. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484684> >.

GOLDENRING, J. R.; NAM, K. T.; MILLS, J. C. The origin of pre-neoplastic metaplasia in the stomach: chief cells emerge from the Mist. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 19, p. 2759-64, Nov 2011. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907708> >.

GOLDSTEIN, I.; PORETZ, R. Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. In: *LIENER, I. (Ed.). The Lectins : Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. New York: Liener IE. Sharon N. Goldstein IJ., 1986. cap. 2 - Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins, p.33-247.

GÓMEZ-SANTOS, L. et al. Characterization by Lectin Histochemistry of Two Subpopulations of Parietal Cells in the Rat Gastric Glands. **J Histochem Cytochem**, v. 65, n. 5, p. 261-272, 05 2017. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438092> >.

HENNING, S. J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am J Physiol**, v. 241, n. 3, p. G199-214, Sep 1981. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7025659> >.

HOFFMANN, W. Current Status on Stem Cells and Cancers of the Gastric Epithelium. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 8, p. 19153-69, Aug 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287172> >.

HUH, W. J. et al. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. **Gastroenterology**, v. 139, n. 6, p. 2038-49, Dec 2010. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816838> >.

ITO, S.; SCHOFIELD, G. C. Studies on the depletion and accumulation of microvilli and changes in the tubulovesicular compartment of mouse parietal cells in relation to gastric acid secretion. **J Cell Biol**, v. 63, n. 2 Pt 1, p. 364-82, Nov 1974. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4138520> >.

JACOBS, D. M.; ACKERMAN, S. H. Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. **Am J Physiol**, v. 247, n. 6 Pt 1, p. G645-50, Dec 1984. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6507621> >.

JONES, M. K. et al. Activation of VEGF and Ras genes in gastric mucosa during angiogenic response to ethanol injury. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6 Pt 1, p. G1345-55, Jun 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362637> >.

JUDD, L. M. et al. Autoimmune gastritis results in disruption of gastric epithelial cell development. **Am J Physiol**, v. 277, n. 1 Pt 1, p. G209-18, Jul 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10409169> >.

KARAM, S. M. 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**, v. 236, n. 2, p. 314-32, Jun 1993. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8338235> >.

KARAM, S. M.; FORTE, J. G. Inhibiting gastric H(+)-K(+)-ATPase activity by omeprazole promotes degeneration and production of parietal cells. **Am J Physiol**, v. 266, n. 4 Pt 1, p. G745-58, Apr 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8179010> >.

KARAM, S. M.; LEBLOND, C. P. 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**, v. 236, n. 2, p. 259-79, Jun 1993a. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8338232> >.

_____. 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**, v. 236, n. 2, p. 297-313, Jun 1993b. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8338234> >.

KAWAKUBO, M. et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 1003-6, Aug 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310903> >.

KEELEY, T. M.; SAMUELSON, L. C. Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 6, p. G1241-51, Dec 2010. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813912> >.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, Jul 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549814> >.

LEE, E. R. et al. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. **Am J Anat**, v. 164, n. 3, p. 187-207, Jul 1982. ISSN 0002-9106. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7124652> >.

LEUSHACKE, M. et al. Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. **Nat Cell Biol**, v. 19, n. 7, p. 774-786, Jul 2017. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28581476> >.

MCDONALD, S. A. et al. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 500-10, Feb 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242216> >.

MEALE, S. J. et al. Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 198, 03 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298634> >.

MILLS, J. C.; SANSOM, O. J. Reserve stem cells: Differentiated cells reprogram to fuel repair, metaplasia, and neoplasia in the adult gastrointestinal tract. **Sci Signal**, v. 8, n. 385, p. re8, Jul 2015. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175494> >.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology**, v. 140, n. 2, p. 412-24, Feb 2011. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144849> >.

MILLS, J. C.; TAGHERT, P. H. Scaling factors: transcription factors regulating subcellular domains. **Bioessays**, v. 34, n. 1, p. 10-6, Jan 2012. ISSN 1521-1878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028036> >.

NOMURA, S. et al. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild-type and gastrin-deficient mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 2, p. G362-75, Feb 2005. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647607> >.

NOZAKI, K. et al. A molecular signature of gastric metaplasia arising in response to acute parietal cell loss. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 511-22, Feb 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242217> >.

OGIAS, D. et al. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 224-9, Feb 2010. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524404> >.

_____. Fasting differentially regulates plasma corticosterone-binding globulin, glucocorticoid receptor, and cell cycle in the gastric mucosa of pups and adult rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 1, p. G117-25, Jan 2010. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833863> >.

ORGANIZATION, W. H. **Infant and young child feeding : model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals**. Suíça: WHO, 2009. 99 ISBN 978 92 4 159749 4. Disponível em: < http://www.wpro.who.int/nutrition_wpr/publications/infantchildfeeding.pdf >.

ORGEUR, P. et al. Behavioural, growth and immune consequences of early weaning in one-week-old large-white piglets. **Reprod Nutr Dev**, v. 41, n. 4, p. 321-32, 2001 Jul-Aug 2001. ISSN 0926-5287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789889> >.

OSAKI, L. H. et al. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGFalpha/EGFR. **Differentiation**, v. 79, n. 1, p. 48-56, Jan 2010. ISSN 1432-0436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783352> >.

_____. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. **Cell Prolif**, v. 44, n. 2, p. 174-82, Apr 2011. ISSN 1365-2184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401759> >.

OSAKI, L. H.; 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**, v. 8, n. 6, p. e66651, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762493> >.

PEARSON, M. A. et al. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 259-70, Apr 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10847681> >.

PEDIATRIA, S. B. D. **Aleitamento Materno Continuado Versus Desmame**. Guia Prático de Atualização. MATERNO, D. C. C. D. A.: 10 p. 2017.

PETERSEN, C. P. et al. Macrophages promote progression of spasmodic polypeptide-expressing metaplasia after acute loss of parietal cells. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1727-38.e8, Jun 2014. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534633> >.

PLEBANI, M. Pepsinogens in health and disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 30, n. 3, p. 273-328, 1993. ISSN 1040-8363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8260073> >.

RADYK, M. D. et al. Metaplastic Cells in the Stomach Arise, Independently of Stem Cells, via Dedifferentiation or Transdifferentiation of Chief Cells. **Gastroenterology**, v. 154, n. 4, p. 839-843.e2, 03 2018. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248442> >.

RAMSEY, V. G. et al. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. **Development**, v. 134, n. 1, p. 211-22, Jan 2007. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164426> >.

REIS, C. A. et al. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. **J Histochem Cytochem**, v. 48, n. 3, p. 377-88, Mar 2000. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681391> >.

ROMAN-GARCIA, P. et al. Vitamin B₁₂-dependent taurine synthesis regulates growth and bone mass. **J Clin Invest**, v. 124, n. 7, p. 2988-3002, Jul 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911144> >.

SAÚDE, M. D. **II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal**. ESTRATÉGICAS, S. D. A. À. S. D. D. A. P. E. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 1 2009.

STANGE, D. E. et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 357-68, Oct 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120136> >.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475-90, Jan 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869575> >.

WANG, T. C. et al. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 36-47, Jan 2000. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611152> >.

WATERLAND, R. A. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers. **Annu Rev Nutr**, v. 34, p. 337-55, 2014. ISSN 1545-4312. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24850387> >.

WEIS, V. G. et al. Maturity and age influence chief cell ability to transdifferentiate into metaplasia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 312, n. 1, p. G67-G76, Jan 2017. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881402> >.

WILLET, S. G.; MILLS, J. C. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 5, p. 546-559, Sep 2016. ISSN 2352-345X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27642625> >.

WRIGHT, N. The Gastric Epithelium: Slow Starter in the Stem Cell/Lineage Specification Stakes? **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 5, p. 538-539, Sep 2016. ISSN 2352-345X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174732> >.

ZHU, L. et al. Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 296, n. 2, p. G185-95, Feb 2009. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074636> >.

ZONTA, G. M. A. **Efeitos tardios do desmame precoce sobre a renovação e diferenciação do epitélio gástrico em ratos**. São Paulo: Estômago. Desmame precoce. Proliferação. Diferenciação. 2017.

ZONTA, G. M. A. et al. **Suckling-weaning transition influences cell proliferation, Troy distribution and progenitor cell niches in the rat gastric mucosa during growth and ageing** (Submetido).

ZULIAN, J. G. et al. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Sci Rep**, v. 7, p. 45867, Mar 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28361902> >.