

ISADORA CAMPOS RATTES

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROLIFERATIVAS EM RATOS EM
DESENVOLVIMENTO E ADULTOS APÓS O DESMAME PRECOCE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2023

ISADORA CAMPOS RATTES

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROLIFERATIVAS EM RATOS EM
DESENVOLVIMENTO E ADULTOS APÓS O DESMAME PRECOCE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Gama

Versão Original

São Paulo

2023

RESUMO

Rattes, IC. **Caracterização das células proliferativas em ratos em desenvolvimento e adultos após o desmame precoce. 128p.** Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Células proliferativas são encontradas por toda glândula durante o desenvolvimento pós-natal do rato e, após o desmame, estão concentradas na região do istmo e do colo. Nos animais adultos, um nicho adicional é encontrado também na base da glândula, mas a caracterização de marcadores para células-tronco/proliferativas ainda é discutida na literatura e pouco se sabe sobre a atividade dessas células durante o desenvolvimento pós-natal. Desconhece-se a organização do ambiente, em termos de fatores de crescimento e sinalização, e como o padrão de alimentação pode afetar esses elementos e influenciar a maturação da glândula. O período de amamentação é crítico para a maturação do estômago em termos de fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento, e a interrupção abrupta do aleitamento materno pode ser prejudicial ao desenvolvimento do órgão. Assim, nossa hipótese de estudo foi de que a mudança abrupta de dieta com desmame precoce acarretaria perturbações nos nichos proliferativos que poderiam se estender até a vida adulta. Nosso objetivo foi avaliar: como o desmame precoce regula a atividade proliferativa em termos de distribuição e dinâmica de cinética celular; a expressão de genes importantes na regulação dos nichos proliferativos, e a presença de Troy (marcador de célula-tronco) nas populações que compõem o epitélio gástrico de ratos. No 15º dia, filhotes de ratos Wistar foram divididos em dois grupos: amamentado (A) e desmame precoce (DP). Os animais A permaneceram com suas mães e foram amamentados até o 21º dia (desmame no biotério). Já os animais DP foram separados de suas mães e mantidos em outra gaiola, onde a dieta passou a ser uma pasta de ração hidratada. Amostras da mucosa gástrica foram coletadas aos 15, 18, 30, 60 e 120 dias para análises de morfologia, expressão gênica por RT-qPCR e níveis proteicos por imuno-histoquímica e Western Blot. Os resultados indicaram uma distribuição distinta de células proliferativas Ki-67+ entre os A e DP de 18 dias, os quais apresentaram um perfil semelhante ao dos adultos. Além disso, o DP acarretou um aumento da proliferação na base da glândula nos animais de 60 dias, mas não observamos diferenças aos 120 dias. A dinâmica de crescimento da glândula varia com o avanço da idade após o DP, e a cinética celular foi estudada por incorporação de BrdU e EdU. A distribuição de células BrdU+, EdU+ e BrdU/EdU+ variou entre A e DP e ao longo das idades, indicando efeitos específicos do DP sobre a entrada no ciclo celular. Em relação a expressão gênica, o DP diminuiu *Wnt3*, *Notch1*, *Notch2*, e aumentou *Bmp2* aos 18 dias. Já aos 60 dias, o DP aumentou *Axin2*, *Notch1* e *Notch2*, sem diferenças aos 120 dias. Por meio de análise *in silico* observamos que componentes das vias Notch, BMP, Wnt e SHH são diferentemente expressos nas células zimogênicas e parietais. Quanto às células Notch1+ o DP diminuiu a marcação aos 60 dias, enquanto células Notch2+ aumentaram no istmo e diminuíram na base aos 60 dias. Quanto à distribuição de Troy durante o desenvolvimento pós-natal, constatamos que do 3º ao 15º dia, o número de células Troy+ não varia, mas a partir do 18º dia essa população aumenta. Em níveis proteicos, o DP aumentou Troy aos 18 dias, mas aos 60 dias ocorre uma inversão com a diminuição desses níveis. Concluímos que o desmame precoce promove em efeitos imediatos e tardios na distribuição de células proliferativas na glândula gástrica, afeta a entrada de células em ciclo celular e a expressão de marcadores de célula-tronco, modulando genes importantes nas vias de regulação dos nichos proliferativos.

Palavras-chaves: Desmame precoce. Nicho proliferativo. Vias de regulação. Estômago.

ABSTRACT

Rattes, IC. **Characterization of proliferative cells in developing and adult rats after early weaning. 128p.** Thesis (PhD in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Proliferative cells are found throughout the gland during postnatal development of the rat and, after weaning, are concentrated in the isthmus and neck region. In adult animals, an additional niche is also found at the base of the gland, but the characterization of markers for stem/proliferative cells is still discussed in the literature and little is known about the activity of these cells during postnatal development, and the organization of the environment, in terms of growth factors and signaling, and how the feeding pattern can affect these elements and influence the maturation of the gland is unknown. The breastfeeding period is critical for the maturation of the stomach in terms of nutrient supply and growth factors, so abrupt cessation of breastfeeding may be detrimental to the development of the organ. Thus, our hypothesis was that abrupt dietary change with early weaning entails perturbations in the proliferative niche that may extend into adulthood. Our aim was to evaluate how early weaning regulates proliferative activity in terms of distribution and dynamics of cell kinetics, the expression of genes important in the regulation of proliferative niches, and to evaluate the presence of Troy (reserve stem cell marker) in the the gastric epithelium of rats. On day 15, Wistar rat pups were divided into two groups: suckling (S) and early weaning (EW). The S animals remained with their mothers and were breastfed until day 21. The EW rats were separated from their mothers and kept in another cage, where the diet became a paste of hydrated feed. Gastric mucosa samples were collected at 15, 18, 30, 60 and 120 days for analysis of morphology, gene expression by RT-qPCR and protein levels by immunohistochemistry and Western Blot. The results indicated a distinct distribution of Ki-67+ proliferative cells between 18-day S and EW, which showed a similar profile to adults. In addition, EW led to increased proliferation at the base of the gland in the 60-day-old animals, but no differences were observed at 120 days. Gland growth dynamics vary with advancing age after EW, and cell kinetics were studied by BrdU and EdU incorporation. The distribution of BrdU+, EdU+ and BrdU/EdU+ cells varied between S and EW and across ages, indicating specific effects of EW on cell cycle entry. Regarding gene expression, EW decreased *Wnt3*, *Notch1*, *Notch2*, and increased *Bmp2* at 18 days. At 60 days, EW increased *Axin2*, *Notch1* and *Notch2*, with no differences at 120 days. In silico analysis indicated the presence of Notch, BMP, Wnt and SHH pathway components differentially expressed in zymogenic and parietal cells. As for Notch1+ cells, EW decreases the number of labelled cells at 60 days and Notch2+ cells increase the number of cells in the isthmus and decreases at the base at 60 days. Regarding the Troy marker, we found that from day 3 to 15 the number of Troy+ cells does not differ, and from day 18 the number of Troy+ cells increase in the gastric mucosa. In protein levels, EW increases Troy at 18 days, but at 60 days there is a reversal with a decrease in these levels. We conclude that EW causes immediate and delayed effects on proliferation and stem cell markers in the gastric mucosa, modulating important genes in proliferative niche regulation pathways.

Keywords: Early weaning. Proliferative niche. Regulatory pathways. Stomach

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estômago

A mucosa gástrica dos roedores divide-se em três regiões histologicamente distintas: a córnea que está adjacente ao esôfago e é formada por um epitélio queratinizado; as regiões do fundo e corpo, que constituem a maior área, e são formadas por glândulas tubulares, e o antro, formado por glândulas curtas e enoveladas (CHOI; ROLAND; BARLOW; O'NEAL *et al.*, 2014; LEE; TRASLER; DWIVEDI; LEBLOND, 1982; MILLS; SHIVDASANI, 2011). O corpo gástrico é a principal região responsável pelo processo digestivo, e apresenta mucosa espessa formada por glândulas tubulares que se abrem em fossetas na superfície (LEE; TRASLER; DWIVEDI; LEBLOND, 1982). Em indivíduos adultos, as glândulas são divididas em três segmentos: istmo, colo e base e diferentes populações epiteliais estão presentes, tais como células mucosas superficiais e do colo; células parietais; células zimogênicas e células enteroendócrinas (Figura 1) (KARAM, 1993; KARAM; LEBLOND, 1993a; b; c).

As células mucosas superficiais revestem a mucosa gástrica na região da fosseta e são produtoras de muco, sendo a mucina 5AC predominante (REIS; DAVID; CARVALHO; MANDEL *et al.*, 2000). As células mucosas do colo presentes na região do colo da glândula gástrica também são células secretoras de muco, porém diferentemente das superficiais, a mucina 6 é predominante (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Ambas as células desempenham um papel protetor para o epitélio contra agressões químicas e mecânicas, além disso a mucina 6 possui um efeito antibiótico contra bactérias como a *Helicobacter pylori* (KAWAKUBO; ITO; OKIMURA; KOBAYASHI *et al.*, 2004; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Distribuídas por toda a extensão da glândula gástrica estão as células parietais com o citoplasma rico em mitocôndrias e em um sistema túbulo-vesicular que se funde à membrana plasmática, formando canalículos intracelulares quando a célula está ativa (ENGEVIK; KAJI; GOLDENRING, 2020; KARAM, 1993). Estas células desempenham funções importantes as quais podem ser atribuídas: à digestão, sendo produtoras de íons H^+ e Cl^- para o lúmen do órgão (ENGEVIK; KAJI; GOLDENRING, 2020); ao papel estrutural em termos de organização da glândula, sendo que a perda de células parietais ocasiona na hiperplasia glandular e o aparecimento de células metaplasicas (BREDEMEYER; GEAHLEN; WEIS; HUH *et al.*, 2009; LI; KARAM; GORDON, 1996; NOZAKI; OGAWA; WILLIAMS; LAFLEUR *et al.*, 2008; RADYK; BURCLAFF; WILLET; MILLS, 2018; SÁENZ; MILLS, 2018); ao controle da

proliferação, uma vez que as células parietais são volumosas e ocupam o istmo, ficando entre células proliferativas e formando uma barreira física que impede a expansão da glândula horizontalmente (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019), e à secreção moléculas importantes para manutenção da homeostase da glândula, como BMP, TGF β e TGF α , fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) (DE ANDRADE SÁ; BITENCOURT; ALVARES; GAMA, 2008; DE ANDRADE SÁ; JORDÃO; TAKAHASHI; ALVARES *et al.*, 2003; JONES; ITANI; WANG; TOMIKAWA *et al.*, 1999; MALOUM; ALLAIRE; GAGNÉ-SANSFAÇON; ROY *et al.*, 2011; OSAKI; CURI; ALVARES; GAMA, 2010; SHINOHARA; MAO; KEELEY; EL-ZAATARI *et al.*, 2010; ZHANG; QUE, 2020).

Compondo menos de 2% da população celular estão as células enteroendócrinas, tais como células “enterochromaffin-like” (ECL), G, D e “X/A-like” que desempenham funções no controle da regulação da secreção ácida, atuando nas células parietais (BORDI; D'ADDA; BAGGI; PILATO, 1989). As células ECL localizam-se principalmente no corpo gástrico e são repletas de grânulos contendo histamina (KIM; SHIVDASANI, 2016). Células X/A-like secretam ghrelina, que induz a liberação do hormônio de crescimento e estimula o apetite. Respectivamente, as ECL e X/A-like ativam as células parietais através de vias parácrinas e neurais (CHEN; AIHARA; ZHAO; HÅKANSON *et al.*, 2006; ENGEVIK; KAJI; GOLDENRING, 2020). As células G, presentes na região do antro, secretam gastrina, que atua em receptores CCK2 das células ECL, acelerando a síntese e liberação de histamina que, por sua vez, estimula a secreção ácida (BORDI; D'ADDA; BAGGI; PILATO, 1989; CHEN; AIHARA; ZHAO; HÅKANSON *et al.*, 2006). A somatostatina produzida pelas células D diminui a atividade das células parietais, agindo diretamente ou indiretamente pela inibição da ação da gastrina sobre as células ECL (BORDI; D'ADDA; BAGGI; PILATO, 1989; CHEN; AIHARA; ZHAO; HÅKANSON *et al.*, 2006; ENGEVIK; KAJI; GOLDENRING, 2020).

Na base da glândula estão as células zimogênicas que são pequenas e piramidais, e apresentam *turnover* de aproximadamente de 140 dias, sendo esse o período mais longo das células epiteliais gástricas (KARAM; LEBLOND, 1993c). Em relação a função, o citoplasma é rico em grânulos contendo pepsinogênio que em contato com o ambiente ácido do lúmen gástrico é convertido a pepsina, principal enzima digestiva gástrica (JOHNSON, 1985). Entretanto, as células zimogênicas, apesar de diferenciadas, são descritas como um compartimento proliferativo secundário e independente daquele encontrado na região do istmo, considerado a principal região de atividade mitótica da glândula gástrica (BURCLAFF; WILLET; SÁENZ; MILLS, 2020; HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019; HUEBNER;

GORELOV; DEVIATIIAROV; DEMHARTER *et al.*, 2023). Estas células zimogênicas são mantidas por sua própria replicação durante a homeostase, porém quando ocorre uma lesão no tecido essas células passam por um processo denominado de transdiferenciação, e originam células metaplásicas que expressam *Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia* (são conhecidas como células SPEM e reconstituem o epitélio) (CALDWELL; MEYER; WEIS; ENGEVIK *et al.*, 2022; GOLDENRING; NAM; MILLS, 2011; RADYK; BURCLAFF; WILLET; MILLS, 2018; SÁENZ; MILLS, 2018). Quando a lesão se torna crônica e é acompanhada por um processo inflamatório, as células SPEM transformam-se no cerne metaplásico de adenocarcinomas gástricos (BOCKERSTETT; LEWIS; WOLF; NOTO *et al.*, 2020; SÁENZ; MILLS, 2018).

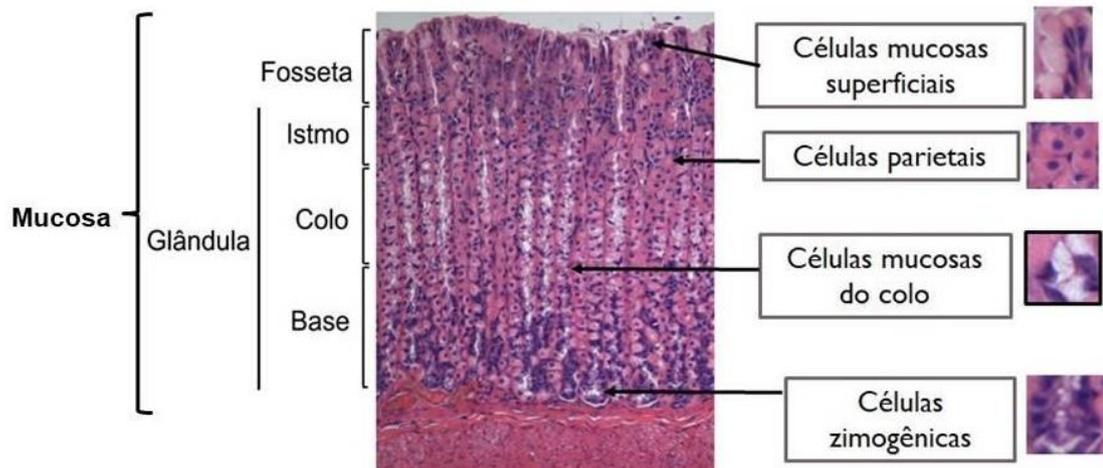


Figura 1: Fotomicrografia da mucosa da região do corpo do estômago do rato de 60 dias de vida pós-natal. A região da fosseta e as três regiões glandulares: istmo, colo e base estão indicados, tais como as principais populações celulares. Corte em parafina corado com Hematoxilina e eosina. Aumento original: 200x.

1.2. Células-tronco no estômago

Diferentemente do intestino delgado e da região do antro gástrico que possuem marcadores de células-tronco bem caracterizados, a região do corpo ainda carece de informações para identificação dessas células. Ao longo dos anos, diversos estudos foram conduzidos na expectativa de identificar a localização e as propriedades das células-tronco presentes na região do corpo gástrico, mas ainda não há evidências que comprovem seu perfil ou até mesmo sua existência no estômago (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019).

Historicamente, Karam e Leblond (1993) a partir de ensaios de incorporação de nucleotídeos radioativos e de microscopia eletrônica mostraram que na região do corpo gástrico de indivíduos adultos as células epiteliais originam-se a partir do nicho presente entre o istmo-colo (KARAM; LEBLOND, 1993a). A partir disso, a teoria que permaneceu em discussão propõe que uma vez formada, cada unidade glandular é funcionalmente monoclonal, e todas as células derivam de uma única célula-tronco (KARAM; LEBLOND, 1993a; WILLET; MILLS, 2016). 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: células pré-mucosas que migram em direção à fosseta e diferenciam-se em mucosas superficiais; células pré-parietais que têm migração bidirecional e originam as parietais, 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 mucosas do colo continuam migrando em direção à base da glândula, passam por uma fase de transição e se organizam em células zimogênicas (essa etapa também pode ser considerada uma transdiferenciação por alguns autores) (KARAM, 1993; KARAM; LEBLOND, 1993a; b; c; MILLS; SHIVDASANI, 2011).

Entretanto, outros estudos foram conduzidos e novas vertentes surgiram sobre a origem das células epiteliais na região do istmo. O estudo de Bjerknes e Cheng (2002) mostrou que poderiam existir células progenitoras comprometidas com determinadas linhagens, com tempo de vida duradouro; estas células apresentariam características iniciais de células mucosas da fosseta e do colo e seriam capazes de auto- renovação, mas dariam origem somente a células da fosseta, células mucosas do colo e zimogênicas diferenciadas (BJERKNES; CHENG, 2002). Assim, a interface istmo-colo foi descrita como principal nicho ativo de renovação do corpo gástrico e, apesar dessa caracterização, a identificação total de fatores moleculares e marcadores celulares ainda permanece incompleta. Dentre os marcadores já discutidos estão Sox2, Mist1, *enhancer* do gene *Runx1* (eR1), *Lrig1* e *Bmi1*, que serão descritos a seguir.

As células Sox2+ foram descritas na mucosa gástrica tanto na região do antro quanto na região do corpo (ARNOLD; SARKAR; YRAM; POLO *et al.*, 2011). Arnold *et al* (2011) descreveram que Sox2 não está presente em células já diferenciadas, sugerindo que células Sox2+ são indiferenciadas não comprometidas com nenhuma das linhagens gástricas. Contudo, o estudo mostrou que células Sox2+ não estão presentes somente na região do istmo- colo, e sim, encontram-se espalhadas ao longo da mucosa (ARNOLD; SARKAR; YRAM; POLO *et al.*, 2011).

O fator de transcrição Mist1 foi, primeiramente, descrito como um regulador importante da diferenciação de células zimogênicas (na base da glândula), e induz a formação da rede de

retículo endoplasmático granular abundante neste tipo celular (RAMSEY; DOHERTY; CHEN; STAPPENBECK *et al.*, 2007). Além da sua presença na região da base, raras células Mist1+ também estão na região do istmo, onde possuem um fenótipo de ausência de grânulos (HAYAKAWA; ARIYAMA; STANCIKOVA; SAKITANI *et al.*, 2015), típico de células-tronco, como descrito por Karam e Leblond (KARAM; LEBLOND, 1993a) (1993). A expansão da pequena população de células Mist1+ no istmo mostrou que elas migram bidireccionalmente na glândula, dando origem às outras populações celulares presentes (HAYAKAWA; ARIYAMA; STANCIKOVA; SAKITANI *et al.*, 2015).

Além dos marcadores Sox2 e Mist1, eR1 foi descrito como um marcador de células não diferenciadas do istmo e está presente também em algumas células já diferenciadas na base da glândula (MATSUO; KIMURA; YAMAMURA; KOH *et al.*, 2017). As células eR1+ coincidem com as células em proliferação e são capazes de gerar organoides *in vitro* (MATSUO; KIMURA; YAMAMURA; KOH *et al.*, 2017). Adicionalmente, experimentos de rastreamento de linhagens indicaram que células Runx1+ geram células diferenciadas para manutenção da glândula (MATSUO; KIMURA; YAMAMURA; KOH *et al.*, 2017).

O Lrig1 é um marcador de células-tronco proliferativas e quiescentes na pele e no intestino e tem como função a regulação negativa da via de sinalização do receptor ErbB. No estômago, o Lrig1 foi descrito nas regiões do antro e do corpo, sendo expresso por células progenitoras no istmo, sendo capaz de gerar todos os tipos células presentes na glândula em resposta a lesões agudas (CHOI; LANTZ; VLACICH; KEELEY *et al.*, 2017). Além disso, células Lrig1+ são encontradas a partir do primeiro dia de vida pós-natal, sugerindo que elas contribuem para o desenvolvimento do estômago nessa fase (CHOI; LANTZ; VLACICH; KEELEY *et al.*, 2017).

Finalmente, Bmi1 foi descrito, como os outros marcadores, tanto no antro quanto no corpo gástrico. As células Bmi1+ localizadas no istmo são capazes de gerar outras que migram bidireccionalmente, e sua ausência acarreta má formação da glândula (YOSHIOKA; FUKUDA; ARAKI; OGAWA *et al.*, 2019).

Apesar do consenso que o istmo é a principal região proliferativa do corpo gástrico, muitos dos estudos de identificação de células-tronco indicaram a presença dos marcadores fora do istmo, principalmente na região da base. Em 2013, os grupos do Dr Hans Clevers (Hubrecht Institute, Holanda) e do Dr Jason Mills (Washington University, St Louis, EUA) caracterizaram um reservatório de células zimogênicas positivas para *tumor necrosis fator receptor super family member 19* (Troy) na base da glândula gástrica (STANGE; KOO; HUCH; SIBBEL *et al.*, 2013). Essas células, embora diferenciadas, possuem a capacidade de entrar em divisão

celular e *in vitro* gerar organoides de estômago. Esse estudo mostrou também que a população Troy+ não é marcada para *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (Lgr5), mas é dependente da via de sinalização de Wnt (STANGE; KOO; HUCH; SIBBEL *et al.*, 2013). Entretanto, em 2017, o grupo liderado por Nick Barker mostrou que Lgr5 está presente também nesse nicho secundário ou reserva. Sua ativação ocorre quando o tecido apresenta alguma lesão, e desencadeia a geração de outros tipos celulares da glândula (LEUSHACKE; TAN; WONG; SWATHI *et al.*, 2017). Diante desses estudos, os principais marcadores do nicho-reserva/secundário na base seriam Troy e Lgr5. Lgr5 é considerada a principal molécula na identificação de células-tronco ativas do intestino delgado e da região antral do estômago (BARKER; VAN ES; KUIPERS; KUJALA *et al.*, 2007; FAFILEK; KRAUSOVA; VOJTECHOVA; POSPICHALOVA *et al.*, 2013; RITSMA; ELLENBROEK; ZOMER; SNIPPERT *et al.*, 2014). Quanto à Troy, sua expressão está aumentada em linhagens de células de câncer colorretal humano e em tumores intestinais de camundongos, e funciona como um modulador negativo da via Wnt em células-tronco Lgr5+ intestinais (FAFILEK; KRAUSOVA; VOJTECHOVA; POSPICHALOVA *et al.*, 2013).

A despeito das publicações sobre os marcadores celulares ao longo dos anos, eles se mostraram insuficientes para definir a identidade de células-tronco do istmo, já que muitos deles também são expressos em diferentes regiões da glândula e em células com fenótipos distintos, o que torna ambíguas as conclusões sobre rastreamentos de linhagens e marcadores moleculares.

Em razão da falta de informações específicas, os estudos na área evoluem continuamente, e em 2019, um artigo publicado na *Cell Stem Cell*, caracterizou as populações de células-tronco do istmo a partir de ensaios de sequenciamento de RNA de célula única (*sc-RNAseq*) e rastreamento de linhagem sem nenhum marcador específico (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019). As conclusões do estudo sugerem que a glândula gástrica é compartimentalizada, sendo mantida por duas populações distintas de células-tronco (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019). A primeira está localizada no istmo e contém células-tronco com alta capacidade de proliferação, sendo responsáveis por cerca de 80% da manutenção da população epitelial glandular. Já o segundo compartimento está localizado na base da glândula e contém uma população celular já diferenciada com taxas mais lentas de proliferação (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019). Os ensaios de *sc-RNAseq* definiram uma heterogeneidade de expressão gênica nestas células presentes no istmo, sugerindo que não existe um marcador específico para esta população e, sim, que há um balanço na expressão de marcadores que irão definir a prole

de células, e essas migrarão e darão origem às linhagens de células (HAN; FINK; JÖRG; LEE *et al.*, 2019).

A origem de células zimogênicas foi primeiramente sugerida por Karam e Leblond (1993) e depois expandida por outros grupos, que mostraram zimogênicas formadas a partir da diferenciação de uma parcela da população de células mucosas do colo na interface entre o colo e a base da glândula (KARAM; LEBLOND, 1993c). A diferenciação gera uma célula com um fenótipo transitório com marcadores celulares de ambas as populações de mucosas do colo e zimogênicas, e essa célula em transição continua migrando em direção à base, terminando a diferenciação em células zimogênicas maduras (KARAM; LEBLOND, 1993c; RAMSEY; DOHERTY; CHEN; STAPPENBECK *et al.*, 2007). Porém, o estudo de Burclaff e Willet (2020) complementa o trabalho publicado por Hans *et al* (2019), sugerindo que, diferentemente do que era discutido desde Karam e Leblond, as células zimogênicas na base não se originam somente da diferenciação de células mucosas do colo e, sim, se mantêm independentemente por replicação própria, assumindo que as células-tronco no istmo não contribuem substancialmente para a constituição desta população específica (BURCLAFF; WILLET; SÁENZ; MILLS, 2020).

Todos os estudos relatados acima se referem principalmente à mucosa gástrica adulta. Durante o desenvolvimento pós-natal células proliferativas são observadas ao longo de toda a glândula (GAMA; ALVARES, 2000; MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021; OSAKI; FIGUEIREDO; ALVARES; GAMA, 2011), e se desconhece quais fatores estão envolvidos na restrição dos nichos no istmo e na base, ou até mesmo quais dispositivos são disparados para que células saiam dos nichos e migrem para as outras porções da glândula para gerar/manter os tipos celulares. Resultados anteriores do laboratório mostraram que o primeiro mês de vida do rato, a cinética celular de crescimento é variável conforme a idade (SIMÕES, 1992). Aos 14 dias, a glândula apresenta células proliferativas em toda sua extensão e não apresenta regiões populacionais bem definidas e o tempo de migração das células em direção ao lúmen do órgão é mais lenta sugerindo um ativo crescimento da glândula com pouca perda celular, já aos 21 dias, têm-se células proliferando em maior predominância na região do istmo e do colo, a migração em direção ao lúmen é mais rápida e a glândula já apresenta regiões definidas. Porém, os ratos de 30 dias a glândula gástrica apresentam um perfil intermediário de cinética celular em comparação aos animais de 21 dias e adultos, apesar da presença de glândulas bem definidas, com células proliferativas em predominância no istmo e com tempo de migração rápido (cerca de 24h) em direção ao lúmen (SIMÕES, 1992).

1.3. Vias de regulação do nicho de célula-tronco

Sonic hedgehog (SHH), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Wnt e Notch são vias que constituem uma rede de sinalização de células-tronco que desempenham diversas funções em uma variedade de processos como embriogênese, manutenção de homeostase em tecidos adultos e regeneração após injúria.

1.3.1. SHH

A via de sinalização de *sonic hedgehog*, SHH, é dividida em canônica e não-canônica. A via canônica consiste dos componentes principais: os receptores PTCH1, PTCH2, SMO; na proteína regulatória SUFU, e na família de fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3)(JENG; CHANG; LIN, 2020)(Figura 2). A transdução da via não-canônica ainda não está totalmente elucidada, mas ela pode ocorrer em condições de inflamação. A transcrição de GLI pode ocorrer por outras vias de sinalização como PKA, GTPase, P13K, Rho(JENG; CHANG; LIN, 2020) .

Na embriogênese, durante o desenvolvimento do trato gastrointestinal, há uma maior expressão de SHH na porção do intestino anterior (futuramente esôfago e região do corpo gástrico) e sua sinalização ocorre potencialmente de forma autócrina (MERCHANT, 2012). No estômago adulto, as células parietais são as principais secretoras de SHH, e a presença da molécula está próxima da membrana basolateral ou associada à bomba de H⁺/K⁺-ATPase(VAN DEN BRINK; HARDWICK; TYTGAT; BRINK *et al.*, 2001; ZAVROS; ORR; XIAO; MALINOWSKA, 2008). A gastrina estimula a expressão do gene e o processamento do precursor de 45kDa para a molécula ativa de 19 kDa. Esse processamento ocorre por um mecanismo dependente de protease e de ambiente ácido (no estômago sob ação da pepsina A) (ZAVROS; ORR; XIAO; MALINOWSKA, 2008; ZAVROS; WAGHRAY; TESSIER; BAI *et al.*, 2007). Portanto, no estômago, a proteína SHH é regulada por um hormônio gástrico, e processada em ambiente ácido com ação de protease (ZAVROS; ORR; XIAO; MALINOWSKA, 2008; ZAVROS; WAGHRAY; TESSIER; BAI *et al.*, 2007).

SHH é necessária para a completa diferenciação das células parietais, a ausência da proteína não altera o número de células, mas altera sua funcionalidade em relação a secreção ácida (HEIJMANS; VAN DEN BRINK, 2010). Ela é considerada um regulador negativo da proliferação gástrica, e camundongos *knockout* para *Shh* apresentam uma condição de hipocloridria, hipergastrinemia e hiperplasia foveolar com diminuição de células zimogênicas e células mucosas do colo (VAN DEN BRINK; HARDWICK; TYTGAT; BRINK *et al.*, 2001;

XIAO; OGLE; SCHUMACHER; ORR-ASMAN *et al.*, 2010). O gradiente de SHH está mais concentrado nas regiões do istmo e colo com baixa concentração na porção da base da glândula (MERCHANT, 2012; VAN DEN BRINK; HARDWICK; NIELSEN; XU *et al.*, 2002).

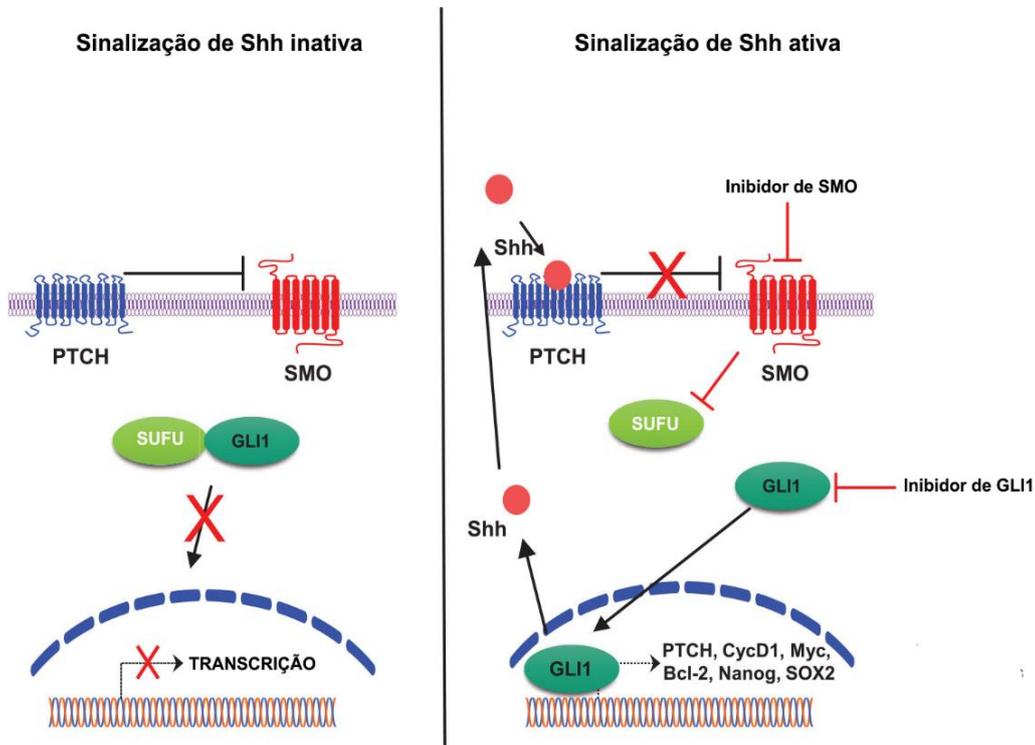


Figura 2: Via de sinalização SHH. A sinalização inativada (esquerda) ocorre na ausência de ligantes SHH, em que PTCH inibe SMO resultando no sequestro de GLI1 no citoplasma por SUFU. Na presença de Shh (direita), a supressão de PTCH de SMO é anulada, resultando na acumulação nuclear de GLI1, acarretando a transcrição de genes alvos. (Adaptado de Dae-Hee Lee et al, 2017(LEE; LEE; OH, 2017))

1.3.2. BMP

As BMPs (*bone morphogenetics proteins*) são fatores de crescimento pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF β) (ZHANG; QUE, 2020). Desempenham diversas funções durante a embriogênese e na homeostase do tecido adulto. Sua sinalização ocorre a partir da ligação das BMPs ao receptor tirosina-quinase do subtipo I em associação ao receptor do subtipo II. O complexo do receptor tipo I e II ativado acarreta a fosforilação de proteínas SMADs as quais agem como transdutoras de sinal da via. Para BMP, as SMADs são Smad1, Smad 5 e Smad 8, e quando fosforiladas associam-se à Smad4 (CO-SMAD). As CO-SMADs atuam como um fator comum entre todas as SMADs. Assim é formado o complexo SMAD/CO-SMAD, o qual se transloca para o núcleo onde pode ativar e

reprimir genes específicos (Figura 3) (HEIJMANS; VAN DEN BRINK, 2010; ZHANG; QUE, 2020).

No estômago de humanos, BMP e EGF participam no processo de diferenciação celular. O gradiente na glândula formado por BMP e EGF orienta a diferenciação das populações de células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas. A concentração mais elevada de EGF e BMP está presente na porção superior da glândula e torna-se mais diluída em direção à base da glândula (WÖLFFLING; DADDI; IMAI-MATSUSHIMA; FRITSCHÉ *et al.*, 2021). Wölffling *et al* (2021) demonstraram, *in vitro*, que em conjunto, EGF e BMP direcionam a diferenciação de células mucosas superficiais, e somente na presença de BMP têm-se a diferenciação de células parietais, enquanto na ausência de EGF e BMP têm-se células zimogênicas (WÖLFFLING; DADDI; IMAI-MATSUSHIMA; FRITSCHÉ *et al.*, 2021).

A via de sinalização de BMP também é um regulador da proliferação gástrica. O aumento de BMP2 diminui a proliferação com aumento da proteína p21, e a super expressão de Noggin (regulador negativo da via) ocasiona um aumento de proliferação com maior espessura de mucosa, glândulas dilatadas e formação de cistos (WEN; MIYAKE; AKIYAMA; YUASA, 2004). A via também é um regulador negativo da diferenciação de células enteroendócrinas, uma vez que a deleção do receptor *Bmpr1a* (o mais expresso na mucosa gástrica) em camundongos eleva o número de células enteroendócrinas, diminui células parietais e aumenta células zimogênicas (MALOUM; ALLAIRE; GAGNÉ-SANSFAÇON; ROY *et al.*, 2011). Essa população tem sua distribuição alterada, de forma que ao invés de ficarem restritas à base da glândula, ficam espalhadas pela mucosa na ausência de *Bmpr1a* (MALOUM; ALLAIRE; GAGNÉ-SANSFAÇON; ROY *et al.*, 2011).

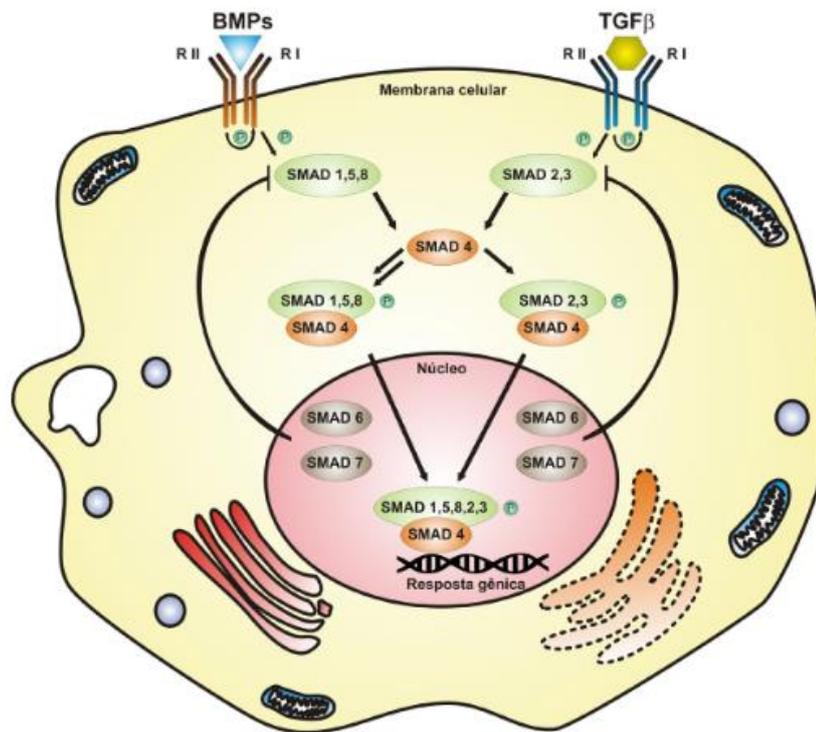


Figura 3: Sinalização BMP. As BMPs são ligantes que interagem tanto com receptores tipo I, quanto receptores tipo II. A associação entre os receptores I e II resulta no complexo sinal-transdução. O complexo quinase BMP e BMPRI fosforila os substratos de sinalização Smad-1,-5 ou -8. A fosforilação BMP é inibida e/ou modulada pelos Smads inibitórios -6 e -7. As Smads-1, -5 ou -8 fosforiladas interagem com a Smad-4 e penetram no núcleo desencadeando a resposta dos genes alvos de BMP. (Adaptado de V.R. Araújo et al, 2010)

1.3.3. Notch

Em mamíferos, a via de sinalização Notch possui quatro receptores: Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 e cinco ligantes: Delta-like 1, 3 e 4, Jagged 1 e 2 (DEMITRACK; SAMUELSON, 2017). No estômago, Notch promove a regulação de células-tronco/progenitoras através dos receptores Notch1 e Notch2 (DEMITRACK; GIFFORD; KEELEY; HORITA *et al.*, 2017; GIFFORD; DEMITRACK; KEELEY; TAM *et al.*, 2017).

A ativação da via Notch ocorre por contato célula-célula. A célula que emite o sinal expressa o ligante e a célula receptora do sinal expressa o receptor (Figura 4). Após ligação do receptor ao ligante da célula vizinha, Notch sofre clivagens proteolíticas que resultam no fragmento ativo do domínio intracelular do Notch conhecido como NICD, que se desloca para o núcleo onde se liga ao fator de transcrição CSL. O principal efetor da via é o fator de transcrição Hes1 (KIM; SHIVDASANI, 2011). No intestino, o papel de Notch e de Hes1 é bem

estabelecido e caracterizado, sendo essencial para manter a identidade das células-tronco na base da cripta e para direcionar o destino das linhagens absorptivas e secretórias na zona de amplificação transiente (KUROKAWA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020). No estômago, o papel de Hes1 não é caracterizado, sendo sua função e seus genes regulados desconhecidos.

Na porção do antro gástrico, a combinação da inibição de Notch1 e Notch2 resulta na diminuição da proliferação, perda das células-tronco Lgr5+ e aumento da apoptose e da diferenciação celular de todas as linhagens presentes no antro (DEMITRACK; GIFFORD; KEELEY; CARULLI *et al.*, 2015; GIFFORD; DEMITRACK; KEELEY; TAM *et al.*, 2017). Porém, a inibição individual de cada receptor apresenta efeitos mais moderados sobre os mesmo parâmetros da proliferação, sugerindo que para a região do antro a regulação da proliferação da via de Notch depende dos dois receptores (GIFFORD; DEMITRACK; KEELEY; TAM *et al.*, 2017). Quando ocorre uma ativação contínua de Notch, têm-se os efeitos contrários: aumento da proliferação e diminuição da diferenciação (GIFFORD; DEMITRACK; KEELEY; TAM *et al.*, 2017). A ativação de Notch em células Lgr5+ ocasiona uma expansão tecidual a partir da fissão das glândulas e essa ativação está relacionada a via de mTOR (HIBDON; RAZUMILAVA; KEELEY; WONG *et al.*, 2019). A disfunção da sinalização está associada à tumorigênese gástrica, em adenocarcinomas gástricos humanos há um aumento da expressão de todos os componentes da via: receptores, ligantes e genes alvos (HIBDON; RAZUMILAVA; KEELEY; WONG *et al.*, 2019).

Em relação aos ligantes, Delta-like 1 (DLL1) e Jagged 2 (Jag2) (Figura 4) são os mais presentes para o antro, sendo que DLL1 está concentrado na base e Jag2 está localizado na porção superior da glândula. A inibição do DLL1 ou em conjunto com outros ligantes diminui a proliferação e crescimento de organoides *in vitro*. Entretanto, a inibição dos outros ligantes não causa efeitos para a mucosa gástrica, portanto, é necessário a presença do ligante DLL1 para o funcionamento correto da proliferação (HORITA; KEELEY; HIBDON; DELGADO *et al.*, 2022). Diferentemente do antro, a região do corpo gástrico ainda não há na literatura descrição sobre os ligantes da via, porém os receptores Notch1 e Notch2 também estão presentes na glândula assim como no antro. A inibição dos dois receptores leva a uma diminuição da proliferação sem alterações na diferenciação, mas quando se ativa os receptores têm-se o efeito oposto aumento da proliferação com uma hipertrofia gástrica, e para esse caso

há uma diminuição da diferenciação (DEMITRACK; GIFFORD; KEELEY; HORITA *et al.*, 2017).

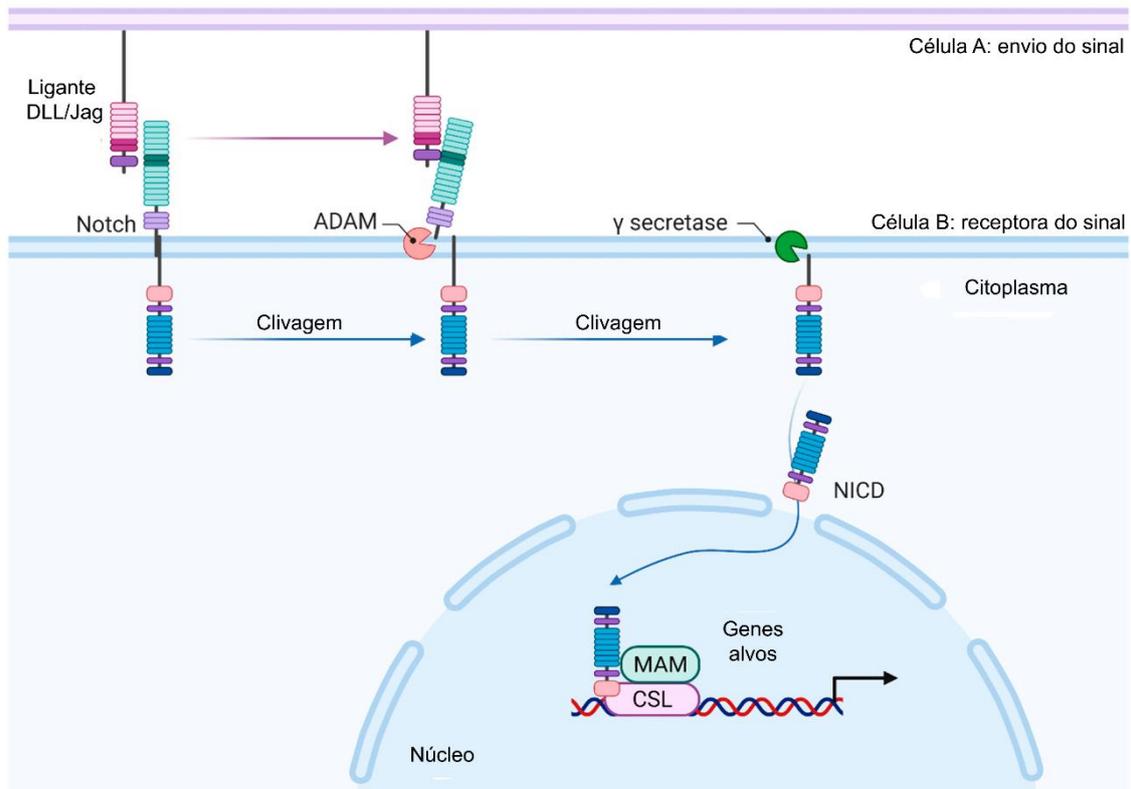


Figura 4: Os ligantes DLL/Jag ligam-se aos receptores Notch. A clivagem do receptor Notch envolve dois eventos de clivagem proteolítica, o primeiro catalisado pelas metaloproteases ADAM e o segundo pela γ -secretase. Isto liberta o domínio intracelular Notch (NICD). No núcleo, o NICD interage com a proteína de ligação CSL e com MAM para promover a transcrição de genes alvos. (Adaptado de Katie A. O'Brien et al, 2022)

1.3.4. Wnt

A sinalização Wnt canônica é transmitida através da interação entre o receptor Frizzled e o receptor LRP5/6. Esta interação induz uma alteração de conformação dos receptores com subsequente fosforilação. A fosforilação permite então que o complexo de receptores iniba a proteína glicogênio-sintase quinase-3 beta (GSK3beta) (Figura 5). A GSK3beta faz parte de um complexo de destruição que também inclui a axina e o complexo polipose adenomatosa (APC) e que, na ausência da ativação do receptor, leva à desestabilização do fator de transcrição beta-catenina. No entanto, após a inibição da GSK3beta, a beta-catenina é protegida da degradação e é translocada para o núcleo, onde interage com os fatores de transcrição Tcf/Lef e, subsequentemente, resulta na expressão de genes alvo Wnt (FLANAGAN; AUSTIN; VINCAN; PHESSÉ, 2018).

A sinalização de Wnt é importante para a manutenção dos nichos de células-tronco, e no estômago, ligantes de Wnt concentram-se no istmo e na base das glândulas da região antral (FISCHER; SIGAL, 2019). A variedade de ligantes e receptores da via faz com que Wnt desempenhe diversas funções a depender da combinação ligante-receptor. Foram descritas para humanos e camundongos cerca de 19 ligantes e 7 receptores (FLANAGAN; AUSTIN; VINCAN; PHESSÉ, 2018). No antro já foram descritas a presença de Wnt 2b, Wnt3a, Wnt4, Wnt5, Wnt9a, e 9b e Wnt 11 (FLANAGAN; BARKER; NOWELL; CLEVERS *et al.*, 2017). Quanto aos receptores, há uma maior expressão de Fzd10 na fosseta e Fdz6 e Fdz7 na porção inferior da glândula, indicando que a sinalização de Wnt pode ser distinta a depender da região da glândula gástrica (FLANAGAN; BARKER; NOWELL; CLEVERS *et al.*, 2017) .

No antro, a ativação de Axin2 (gene alvo de Wnt) e de Lrg5 é dependente da secreção de R-espondina 3, que estabiliza os receptores Fdz e mantém a sinalização ativa, produzida por miofibroblastos presentes próximos a essas células (FISCHER; SIGAL, 2019) . A fonte de ligantes de Wnt ainda não está elucidada, mas na região do antro têm-se a participação de células do mesênquima, os pericitos localizados próximos às células proliferativas, os quais garantem uma fonte de ligantes Wnt no epitélio (MURAKAMI; TERAKADO; SAITO; JOMEN *et al.*, 2021). Na região do corpo também não foi estabelecido o papel desses elementos de sinalização, mas sabe-se que as células que são responsivas a Wnt são células Troy+ localizadas na base da glândula adulta, sugerindo que a regulação desse *pool* de células-tronco possa ocorrer por esta via (STANGE; KOO; HUCH; SIBBEL *et al.*, 2013).

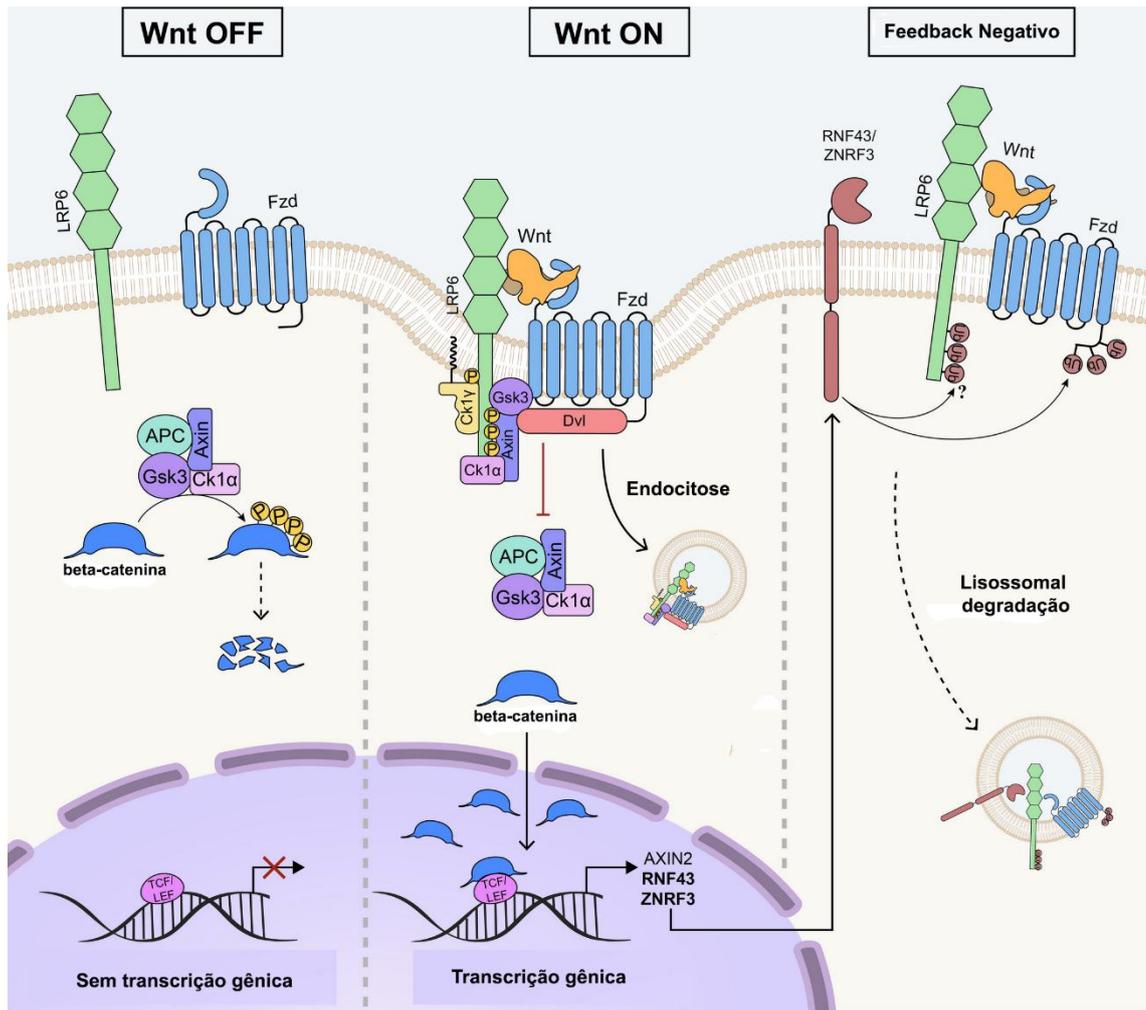


Figura 5: Sinalização Wnt/ β -catenina. Na ausência de ligantes Wnt, um complexo de destruição formado por Axina, APC, GSK3 e CK1 promove ativamente o *turnover* da proteína β -catenina através de um mecanismo dependente do proteossoma, mantendo a sinalização Wnt desligada (OFF). Por outro lado, no estado Wnt ligado (ON), um ligante Wnt liga-se aos seus receptores, Fzd e Lrp5/6, induzindo a formação de um complexo multiprotéico conhecido como sinalossoma, e inibindo a atividade do complexo de destruição. A endocitose do sinalossoma é necessária para transduzir o sinal Wnt. Consequentemente, a proteína β -catenina é estabilizada e transloca-se para o núcleo, onde, juntamente com TCF/LEF, ativa a transcrição de genes alvo da Wnt. Entre os genes ativados por β -catenina/TCF, as E3 ligases transmembranares RNF43/ZNRF3 representam elementos de um importante mecanismo de *feedback* negativo, que atenuam a sinalização Wnt por ubiquitinação e degradação do complexo receptor Fzd/Lrp5/6 através do sistema endolisossomal. (Adaptado de Gabriele Colozza et al, 2021)

1.4. Outras vias

Além dessas vias descritas, outras vias também estão envolvidas na homeostase dos nichos de células-tronco. O fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10) e seu receptor

(FGFR2) é uma delas. Durante o desenvolvimento embrionário do estômago FGF10 é expresso no mesênquima e sua inibição leva ao desenvolvimento de uma glândula defeituosa, porém, sua expressão e seu papel na glândula adulta ainda são pouco estudados (SPENCER-DENE; SALA; BELLUSCI; GSCHMEISSNER *et al.*, 2006). O FGF10 exerce um papel importante na regulação da via Notch1 e Notch2 durante a morfogênese, uma vez que altos níveis de FGF10 mantêm elevada a expressão de Hes1, que é um efetor da via Notch, como mencionado anteriormente (NYENG; NORGAARD; KOBBERUP; JENSEN, 2007; SPEER; AL ALAM; SALA; FORD *et al.*, 2012). Sabe-se que durante o desenvolvimento pré-natal há uma taxa alta de Notch1, de Jag2 e de seu efetor Hes1, que levam a um processo de diferenciação celular, principalmente de células endócrinas.

Já o EGF, o fator de crescimento transformante alfa (TGF α) e seu receptor EGFR também exercem funções importantes na glândula, uma vez que o aumento de expressão é acompanhado no aumento da proliferação no intestino e na mucosa gástrica (GOODLAD; WILSON; LENTON; GREGORY *et al.*, 1987; OSAKI; CURI; ALVARES; GAMA, 2010), e da diferenciação celular. O EGFR utiliza diversas vias de sinalização, que podem se interligar, tais como MAPK, PIK3 e Src, e resultar em modificação/ modulação de proliferação, migração e diferenciação (OSAKI; GAMA, 2013b).

O padrão de organização descrito acima se refere à glândula adulta, e este perfil desenha-se durante o desenvolvimento pós-natal em roedores, especialmente durante as três primeiras semanas de vida. Assim, no primeiro dia de vida, a mucosa apresenta glândulas rasas e células mucosas superficiais e parietais imaturas, e entre 15 e 21 dias, fase de transição entre amamentação e desmame, há proliferação, migração, diferenciação e amadurecimento de todas as populações epiteliais mencionadas anteriormente (KARAM; LEBLOND, 1993a). Após o 21º dia, as células estão diferenciadas e organizadas nas glândulas. É importante ressaltar que durante toda essa fase de transição ocorre o início da produção endógena de peptídeos, como o TGF β e TGF α , fundamentais para controlar a cinética epitelial e o desenvolvimento do estômago.

1.5. Amamentação e Desmame Precoce

Durante o desenvolvimento pós-natal, a amamentação é um agente importante na programação do crescimento. Nesse período, o colostro e o leite materno são os primeiros alimentos ingeridos pelo neonato e são a fonte de nutrientes e peptídeos biologicamente ativos (BARAM; KOCH; HAZUM; FRIDKIN, 1977; DVORAK; WILLIAMS; MCWILLIAM; SHINOHARA *et al.*, 2000; KOLDOVSKÝ; ILLNEROVÁ; MACHO; STRBÁK *et al.*, 1995;

WADA; LÖNNERDAL, 2014). Dentre os nutrientes providos pelo leite temos a presença de proteínas, carboidratos e lipídeos os quais têm suas concentrações alteradas de acordo com as necessidades do infante (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; BALLARD; MORROW, 2013) .

Os lipídios são a maior fonte de energia presente no leite, a maior parte dos lipídeos secretados são triglicerídeos, porém ácidos graxos também compõem cerca de 17% dos lipídios totais. No leite materno são encontrados cerca de 400 diferentes tipos de proteínas, que podem ser divididas em três classes: caseínas, *whey* (soro) e mucinas. As imunoglobulinas secretadas no leite materno são especialmente importantes para a proteção do infante já que o sistema imunológico ainda é imaturo. As concentrações de imunoglobulinas são especialmente elevadas no início da lactação e imunoglobulina A secretória (SIgA) é a que está em maior concentração (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; BALLARD; MORROW, 2013).

Os carboidratos estão presentes em uma grande variedade no leite materno, a concentração de lactose é maior no leite humano do que encontrado em outras espécies. Os oligossacarídeos são uma fração importante de carboidratos no leite, porém não são digeridos, exercendo seu papel, principalmente, na modulação da microbiota do recém-nascido (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Deve-se mencionar também, que durante a amamentação, elementos tais como o alto pH gástrico, a ausência de pepsina luminal, e a presença de proteínas acessórias no leite desfavorecem a digestão proteica e, desta forma, permitem a absorção intacta das moléculas no intestino delgado (HENNING, 1981). 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.

A Organização Mundial da Saúde e a UNICEF recomendam o aleitamento exclusivo até os seis meses de vida e após esse período complementação com alimentos sólidos seguindo a amamentação até pelo menos os dois anos de vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Porém, somente 44% dos infantes de 0 a 5 meses de vida no mundo são exclusivamente alimentados com leite materno. O leite materno traz benefícios não somente para os bebês como também para a mãe. Crianças que são alimentadas exclusivamente com leite materno possuem menores taxas de morbidade infecciosa, por exemplo a infecção por COVID-19(VASQUES DA COSTA; PURCELL GOES; GAMA, 2021), e mortalidade infantil (VICTORA; BAHL; BARROS; FRANÇA *et al.*, 2016). Além disso, a ingestão de leite materno pode gerar uma proteção contra o desenvolvimento de asma e alergias (ODDY, 2017), outras evidências sugerem que o aleitamento exclusivo diminui as chances de desenvolvimento de diabetes e

obesidade na vida adulta (BYRNE; SCHWARTZ; SIMMONS; SHEEBER *et al.*, 2018). Em relação os benefícios para a mãe, o aleitamento pode reduzir os riscos de câncer de mama e ovário, além de menos riscos de desenvolvimento de diabetes (AUNE; NORAT; ROMUNDSTAD; VATTEN, 2014; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015).

Entretanto, o desmame precoce aos 4 meses de vida é uma prática social comum e dentre os motivos, o principal é o retorno da mãe para o mercado de trabalho (VICTORA; BAHL; BARROS; FRANÇA *et al.*, 2016).

Em roedores, da terceira para a quarta semana de vida pós-natal, o aleitamento é gradativamente substituído pela ingestão de alimento sólido, fase que caracteriza o desmame e ocorre naturalmente em ratos (HENNING, 1981). Entretanto, para fins experimentais, em biotérios, o desmame é normalmente realizado no 21º dia de vida pós-natal. Em contrapartida, o desmame precoce se caracteriza pela abrupta separação materna e retirada antecipada do leite e de todos os seus fatores antecipadamente.

No estômago de ratos, o desmame precoce: induz a atividade da enzima ornitina descarboxilase e acúmulo de poliaminas, necessárias para o rápido crescimento celular(LIN; LYONS; SEELBACH; TOLIA *et al.*, 2001) ; aumenta a atividade proliferativa no epitélio gástrico(GAMA; ALVARES, 2000; GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS *et al.*, 2014; MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021; OSAKI; FIGUEIREDO; ALVARES; GAMA, 2011); desencadeia a diferenciação de células mucosas do colo(OSAKI; CURI; ALVARES; GAMA, 2010; TELES SILVA; MESQUITA DA SILVA; CAMPOS RATTES; MARIA AGOSTINI ZONTA *et al.*, 2020; ZULIAN; HOSOYA; FIGUEIREDO; OGIAS *et al.*, 2017); modifica a resposta ao estresse(GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS *et al.*, 2014; ZULIAN; HOSOYA; FIGUEIREDO; OGIAS *et al.*, 2017), e os níveis de ghrelina(BITTAR; ZULIAN; OGIAS; GAMA, 2016), que em conjunto podem reprogramar o processo de maturação da mucosa gástrica. Além disso, em filhotes de ratos, o desmame precoce aumenta a expressão mRNA e proteínas de Mist1 e pepsinogênio C, altera o número de células mucosas do colo e células zimogênicas tanto em filhotes quanto de ratos adultos e aumenta a expressão de mRNA e níveis proteicos da subunidade da bomba ATPase H⁺/K⁺ em ratos de 18 dias (TELES SILVA; MESQUITA DA SILVA; CAMPOS RATTES; MARIA AGOSTINI ZONTA *et al.*, 2020; ZULIAN; HOSOYA; FIGUEIREDO; OGIAS *et al.*, 2017).

Resultados de nosso laboratório mostram que o desmame precoce altera diversos marcadores moleculares relacionados às células-tronco, dinâmica de ciclo celular, e fatores de crescimento (MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021). Dentre estes genes, estão a família de TGFβ, o FGF10 e seu receptor, e o EGFR, que como mencionado

anteriormente, tem grande importância em eventos regulatórios da proliferação, diferenciação e migração celular, e assim podem estar envolvidos na dinâmica das células-tronco gástricas (MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021; OSAKI; FIGUEIREDO; ALVARES; GAMA, 2011).

Outros estudos de nosso laboratório já mostraram que as células proliferativas possuem perfis de distribuição distintos, quando comparadas a grupos em amamentação e desmame precoce, em ratos em desenvolvimento. Animais que foram amamentados até o desmame regular, apresentam células em divisão por toda a glândula, enquanto animais submetidos ao desmame precoce, estas células estão mais restritas a interface istmo-colo, característica semelhante à vista em animais adultos (GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS *et al.*, 2014; MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021). Quando animais adultos são avaliados após amamentação ou desmame precoce, as células proliferativas se encontram na interface istmo-colo (MESQUITA DA SILVA; RATTES; PEREIRA; GAMA, 2021). Osaki et al (2011) mostraram que o controle da proliferação em filhotes submetidos ao desmame precoce é regulado por EGFR por meio da ativação das vias MAPK e Src- kinase (OSAKI; FIGUEIREDO; ALVARES; GAMA, 2011; OSAKI; GAMA, 2013a; b). O uso de antagonista de EGFR (AG1478) diminui os níveis de proliferação nos animais desmamados precocemente quando comparados aos controles. Além disso, a corticosterona participa desde processo (GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS *et al.*, 2014). Quando administrado RU486 (antagonista do receptor de glicocorticoide) nos animais DP aos 18 dias, têm-se a reversão do perfil de distribuição das células proliferativas, essas voltam a ser encontradas pela glândula semelhante ao animal amamentado. (GHIZONI; FIGUEIREDO; MOISAN; OGIAS *et al.*, 2014)

2. CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados, constatamos que:

- Em relação ao perfil de distribuição de células proliferativas na mucosa gástrica em ratos durante o desenvolvimento pós-natal e adultos:
 - O DP alterou distribuição de células proliferativas Ki-67+ antecipando nos filhotes características observadas somente nos adultos amamentados normalmente;
 - O DP induziu uma capacidade proliferativa maior no nicho proliferativo da base em comparação ao grupo A aos 60 dias;
 - O rastreamento de linhagem por análogo de timina no grupo DP, sugere que o DP inicialmente induziu a entrada *de novo* de células em ciclo celular, e direcionou células proliferativas para as regiões da base e do istmo;

- Em relação ao perfil de expressão gênica de genes relacionados aos nichos de célula-tronco em ratos de 18, 60 e 120 dias de vida pós-natal:
 - O DP ocasionou efeitos distintos na expressão gênica de moléculas regulatórias dos nichos proliferativos em relação a idade do rato. Sendo os genes *Notch1* e *Notch2* mais afetados pelo DP aos 60 dias.
 - A análise *in silico* indicou a presença de componentes, como receptores e ligantes, das vias Notch, BMP, Wnt e SHH diferentemente expressos nas células zimogênicas e parietais;

- Em relação a investigação a distribuição do marcador Troy:
 - A distribuição do marcador Troy durante a ontogênese da mucosa gástrica indicou que o número de células Troy+ até 15º dia é estável com aumento a partir do 18º dia de vida pós-natal em ratos amamentados;
 - O DP alterou diferencialmente os níveis da proteína Troy (marcador de célula-tronco) e distribuição dessas células nas idades de 18 e 60 dias em relação ao grupo A;

Desta forma, a partir da hipótese de que o desmame precoce acarretaria mudanças que se estenderia até a vida adulta, demonstramos que a alteração do padrão alimentar na infância afetou a proliferação e a cinética celular no epitélio gástrico, fatores esses que modificaram o crescimento, e mudaram a expressão de moléculas de vias de regulação dos nichos proliferativos. Embora um marcador de célula-tronco não tenha sido estabelecido, contribuimos

para a identificação de elementos regulatórios durante o crescimento da mucosa. Assim, concluímos que o desmame precoce promove efeitos duradouros sobre o crescimento e renovação do epitélio gástrico.

3. REFERÊNCIAS

- AHERNE, W. A.; CAMPLEJOHN, R. S.; AL-WISWASY, M.; FORD, D. *et al.* Assessment of inherent fluctuations of mitotic and labelling indices of human tumours. **Br J Cancer**, 36, n. 5, p. 577-582, Nov 1977.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Hum Dev**, 91, n. 11, p. 629-635, Nov 2015.
- ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, 25, n. 1, p. 49-51, 2012 Jan-Mar 2012.
- ARNOLD, K.; SARKAR, A.; YRAM, M. A.; POLO, J. M. *et al.* Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. **Cell Stem Cell**, 9, n. 4, p. 317-329, Oct 2011.
- AUNE, D.; NORAT, T.; ROMUNDSTAD, P.; VATTEN, L. J. Breastfeeding and the maternal risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 24, n. 2, p. 107-115, Feb 2014.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am**, 60, n. 1, p. 49-74, Feb 2013.
- BARAM, T.; KOCH, Y.; HAZUM, E.; FRIDKIN, M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. **Science**, 198, n. 4314, p. 300-302, Oct 1977.
- BARKER, N.; VAN ES, J. H.; KUIPERS, J.; KUJALA, P. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, 449, n. 7165, p. 1003-1007, Oct 25 2007.
- BAULIES, A.; ANGELIS, N.; LI, V. S. W. Hallmarks of intestinal stem cells. **Development**, 147, n. 15, Aug 2020.
- BITTAR, N. M.; ZULIAN, J. G.; OGIAS, D.; GAMA, P. Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? **Nutrition**, 32, n. 1, p. 101-107, Jan 2016.
- BJERKNES, M.; CHENG, H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 283, n. 3, p. G767-777, Sep 2002.
- BOCKERSTETT, K. A.; LEWIS, S. A.; WOLF, K. J.; NOTO, C. N. *et al.* Single-cell transcriptional analyses of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia arising from acute drug injury and chronic inflammation in the stomach. **Gut**, 69, n. 6, p. 1027-1038, Jun 2020.

BORDI, C.; D'ADDA, T.; BAGGI, M. T.; PILATO, F. P. Structure and function of endocrine cells in the oxyntic (acid-secreting) mucosa of human stomach. **Scand J Gastroenterol Suppl**, 166, p. 115-121; discussion 138-117, 1989.

BREDEMEYER, A. J.; GEHLEN, J. H.; WEIS, V. G.; HUH, W. J. *et al.* The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. **Dev Biol**, 325, n. 1, p. 211-224, Jan 2009.

BURCLAFF, J.; WILLET, S. G.; SÁENZ, J. B.; MILLS, J. C. Proliferation and Differentiation of Gastric Mucous Neck and Chief Cells During Homeostasis and Injury-induced Metaplasia. **Gastroenterology**, 158, n. 3, p. 598-609.e595, 02 2020.

BYRNE, M. L.; SCHWARTZ, O. S.; SIMMONS, J. G.; SHEEBER, L. *et al.* Duration of Breastfeeding and Subsequent Adolescent Obesity: Effects of Maternal Behavior and Socioeconomic Status. **J Adolesc Health**, 62, n. 4, p. 471-479, 04 2018.

CALDWELL, B.; MEYER, A. R.; WEIS, J. A.; ENGEVIK, A. C. *et al.* Chief cell plasticity is the origin of metaplasia following acute injury in the stomach mucosa. **Gut**, 71, n. 6, p. 1068-1077, Jun 2022.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C. M.; HÅKANSON, R. *et al.* Differentiation of the gastric mucosa. I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 291, n. 4, p. G539-544, Oct 2006.

CHOI, E.; LANTZ, T. L.; VLACICH, G.; KEELEY, T. M. *et al.* Lrig1+ gastric isthmal progenitor cells restore normal gastric lineage cells during damage recovery in adult mouse stomach. **Gut**, Aug 2017.

CHOI, E.; ROLAND, J. T.; BARLOW, B. J.; O'NEAL, R. *et al.* Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**, 63, n. 11, p. 1711-1720, Nov 2014.

DE ANDRADE SÁ, E. R.; BITENCOURT, B.; ALVARES, E. P.; GAMA, P. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. **Regul Pept**, 146, n. 1-3, p. 293-302, Feb 2008.

DE ANDRADE SÁ, E. R.; JORDÃO, L. R.; TAKAHASHI, C. A.; ALVARES, E. P. *et al.* Ontogenic expression of TGFbeta 1, 2, and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. **Dev Dyn**, 227, n. 3, p. 450-457, Jul 2003.

DEMITRACK, E. S.; GIFFORD, G. B.; KEELEY, T. M.; CARULLI, A. J. *et al.* Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function. **EMBO J**, 34, n. 20, p. 2522-2536, Oct 14 2015.

DEMITRACK, E. S.; GIFFORD, G. B.; KEELEY, T. M.; HORITA, N. *et al.* NOTCH1 and NOTCH2 regulate epithelial cell proliferation in mouse and human gastric corpus. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 312, n. 2, p. G133-G144, Feb 2017.

DEMITRACK, E. S.; SAMUELSON, L. C. Notch as a Driver of Gastric Epithelial Cell Proliferation. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 3, n. 3, p. 323-330, May 2017.

DVORAK, B.; WILLIAMS, C. S.; MCWILLIAM, D. L.; SHINOHARA, H. *et al.* Milk-borne epidermal growth factor modulates intestinal transforming growth factor- α levels in neonatal rats. **Pediatr Res**, 47, n. 2, p. 194-200, Feb 2000.

ENGEVIK, A. C.; KAJI, I.; GOLDENRING, J. R. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. **Physiol Rev**, 100, n. 2, p. 573-602, Apr 01 2020.

FAFILEK, B.; KRAUSOVA, M.; VOJTECHOVA, M.; POSPICHALOVA, V. *et al.* Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with *Igr5* to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. **Gastroenterology**, 144, n. 2, p. 381-391, Feb 2013.

FIORE, A. P.; OSAKI, L. H.; GAMA, P. Transforming growth factor β 1 increases p27 levels via synthesis and degradation mechanisms in the hyperproliferative gastric epithelium in rats. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e101965, 2014.

FISCHER, A. S.; SIGAL, M. The Role of Wnt and R-spondin in the Stomach During Health and Disease. **Biomedicines**, 7, n. 2, Jun 19 2019.

FLANAGAN, D. J.; AUSTIN, C. R.; VINCAN, E.; PHESSÉ, T. J. Wnt Signalling in Gastrointestinal Epithelial Stem Cells. **Genes (Basel)**, 9, n. 4, Mar 23 2018.

FLANAGAN, D. J.; BARKER, N.; NOWELL, C.; CLEVERS, H. *et al.* Loss of the Wnt receptor frizzled 7 in the mouse gastric epithelium is deleterious and triggers rapid repopulation. **Dis Model Mech**, 10, n. 8, p. 971-980, Aug 01 2017.

FURUTACHI, S.; MATSUMOTO, A.; NAKAYAMA, K. I.; GOTOH, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. **EMBO J**, 32, n. 7, p. 970-981, Apr 03 2013.

GAMA, P.; ALVARES, E. P. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. **J Nutr**, 130, n. 10, p. 2594-2598, Oct 2000.

GAMA, P.; GOLDFEDER, E. M.; DE MORAES, J. C.; ALVARES, E. P. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. **Anat Rec**, 260, n. 3, p. 213-221, Nov 2000.

GHIZONI, H.; FIGUEIREDO, P. M.; MOISAN, M. P.; OGIAS, D. *et al.* Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. **Nutrition**, 30, n. 3, p. 343-349, Mar 2014.

GIFFORD, G. B.; DEMITRACK, E. S.; KEELEY, T. M.; TAM, A. *et al.* Notch1 and Notch2 receptors regulate mouse and human gastric antral epithelial cell homeostasis. **Gut**, 66, n. 6, p. 1001-1011, Jun 2017.

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**, 317, n. 19, p. 2759-2764, Nov 2011.

GOODLAD, R. A.; WILSON, T. J.; LENTON, W.; GREGORY, H. *et al.* Proliferative effects of urogastrone-EGF on the intestinal epithelium. **Gut**, 28 Suppl, p. 37-43, 1987.

HAN, S.; FINK, J.; JÖRG, D. J.; LEE, E. *et al.* Defining the Identity and Dynamics of Adult Gastric Isthmus Stem Cells. **Cell Stem Cell**, 25, n. 3, p. 342-356.e347, 09 2019.

HARRIS, L.; ZALUCKI, O.; PIPER, M. BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations. **J Mol Histol**, 49, n. 3, p. 229-234, Jun 2018.

HAYAKAWA, Y.; ARIYAMA, H.; STANCIKOVA, J.; SAKITANI, K. *et al.* Mist1 Expressing Gastric Stem Cells Maintain the Normal and Neoplastic Gastric Epithelium and Are Supported by a Perivascular Stem Cell Niche. **Cancer Cell**, 28, n. 6, p. 800-814, Dec 2015.

HEIJMANS, J.; VAN DEN BRINK, G. R. Morphogens and the parietal cell: shaping up acid secretion. **Gastroenterology**, 139, n. 6, p. 1830-1833, Dec 2010.

HENNING, S. J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am J Physiol**, 241, n. 3, p. G199-214, Sep 1981.

HIBDON, E. S.; RAZUMILAVA, N.; KEELEY, T. M.; WONG, G. *et al.* Notch and mTOR Signaling Pathways Promote Human Gastric Cancer Cell Proliferation. **Neoplasia**, 21, n. 7, p. 702-712, Jul 2019.

HISAOKA, T.; MORIKAWA, Y.; KITAMURA, T.; SENBA, E. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. **Brain Res Dev Brain Res**, 143, n. 1, p. 105-109, Jun 2003.

HORITA, N.; KEELEY, T. M.; HIBDON, E. S.; DELGADO, E. *et al.* Delta-like 1-Expressing Cells at the Gland Base Promote Proliferation of Gastric Antral Stem Cells in Mouse. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 1, p. 275-287, 2022.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, 104, n. 467, p. 30-37, Dec 2015.

HUEBNER, A. J.; GORELOV, R. A.; DEVIATIIAROV, R.; DEMHARTER, S. *et al.* Dissection of gastric homeostasis in vivo facilitates permanent capture of isthmus-like stem cells in vitro. **Nat Cell Biol**, 25, n. 3, p. 390-403, Mar 2023.

JENG, K. S.; CHANG, C. F.; LIN, S. S. Sonic Hedgehog Signaling in Organogenesis, Tumors, and Tumor Microenvironments. **Int J Mol Sci**, 21, n. 3, Jan 23 2020.

JENSEN, J.; PEDERSEN, E. E.; GALANTE, P.; HALD, J. *et al.* Control of endodermal endocrine development by Hes-1. **Nat Genet**, 24, n. 1, p. 36-44, Jan 2000.

JOHNSON, L. R. Functional development of the stomach. **Annu Rev Physiol**, 47, p. 199-215, 1985.

JONES, M. K.; ITANI, R. M.; WANG, H.; TOMIKAWA, M. *et al.* Activation of VEGF and Ras genes in gastric mucosa during angiogenic response to ethanol injury. **Am J Physiol**, 276, n. 6, p. G1345-1355, Jun 1999.

JURÍKOVÁ, M.; DANIHEL, Ľ.; POLÁK, Š.; VARGA, I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. **Acta Histochem**, 118, n. 5, p. 544-552, Jun 2016.

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**, 236, n. 2, p. 314-332, Jun 1993.

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**, 236, n. 2, p. 259-279, Jun 1993a.

KARAM, S. M.; LEBLOND, C. P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. **Anat Rec**, 236, n. 2, p. 280-296, Jun 1993b.

KARAM, S. M.; LEBLOND, C. P. 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**, 236, n. 2, p. 297-313, Jun 1993c.

KAWAKUBO, M.; ITO, Y.; OKIMURA, Y.; KOBAYASHI, M. *et al.* Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. **Science**, 305, n. 5686, p. 1003-1006, Aug 13 2004.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **J Neuroendocrinol**, 21, n. 4, p. 427-431, Mar 2009.

KIM, T. H.; SHIVDASANI, R. A. Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis. **J Exp Med**, 208, n. 4, p. 677-688, Apr 2011.

KIM, T. H.; SHIVDASANI, R. A. Stomach development, stem cells and disease. **Development**, 143, n. 4, p. 554-565, Feb 15 2016.

KOJIMA, T.; MORIKAWA, Y.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J. *et al.* TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. **J Biol Chem**, 275, n. 27, p. 20742-20747, Jul 2000.

KOLDOVSKÝ, O.; ILLNEROVÁ, H.; MACHO, L.; STRBÁK, V. *et al.* Milk-borne hormones: possible tools of communication between mother and suckling. **Physiol Res**, 44, n. 6, p. 349-351, 1995.

KUROKAWA, K.; HAYAKAWA, Y.; KOIKE, K. Plasticity of Intestinal Epithelium: Stem Cell Niches and Regulatory Signals. **Int J Mol Sci**, 22, n. 1, Dec 31 2020.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, 135, n. 1, p. 41-60, Jul 2008.

LEE, D. H.; LEE, S. Y.; OH, S. C. Hedgehog signaling pathway as a potential target in the treatment of advanced gastric cancer. **Tumour Biol**, 39, n. 6, p. 1010428317692266, Jun 2017.

LEE, E. R.; TRASLER, J.; DWIVEDI, S.; LEBLOND, C. P. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. **Am J Anat**, 164, n. 3, p. 187-207, Jul 1982.

LEE, J. H.; KIM, S.; HAN, S.; MIN, J. *et al.* p57. **Cell Stem Cell**, 29, n. 5, p. 826-839.e829, May 05 2022.

LEUSHACKE, M.; TAN, S. H.; WONG, A.; SWATHI, Y. *et al.* Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. **Nat Cell Biol**, 19, n. 7, p. 774-786, Jul 2017.

LI, Q.; KARAM, S. M.; GORDON, J. I. Diphtheria toxin-mediated ablation of parietal cells in the stomach of transgenic mice. **J Biol Chem**, 271, n. 7, p. 3671-3676, Feb 1996.

LIN, C. H.; LYONS, H.; SEELBACH, M. S.; TOLIA, V. *et al.* Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. **Digestion**, 63, n. 4, p. 214-219, 2001.

MALOUM, F.; ALLAIRE, J. M.; GAGNÉ-SANSFAÇON, J.; ROY, E. *et al.* Epithelial BMP signaling is required for proper specification of epithelial cell lineages and gastric endocrine cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 300, n. 6, p. G1065-1079, Jun 2011.

MATSUMOTO, A.; TAKEISHI, S.; KANIE, T.; SUSAKI, E. *et al.* p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, 9, n. 3, p. 262-271, Sep 02 2011.

MATSUO, J.; KIMURA, S.; YAMAMURA, A.; KOH, C. P. *et al.* Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. **Gastroenterology**, 152, n. 1, p. 218-231.e214, Jan 2017.

MERCHANT, J. L. Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. **J Physiol**, 590, n. 3, p. 421-432, Feb 01 2012.

MESQUITA DA SILVA, K.; RATTES, I. C.; PEREIRA, G. M. A.; GAMA, P. Lifelong Adaptation of Gastric Cell Proliferation and Mucosa Structure to Early Weaning-Induced Effects. **Front Physiol**, 12, p. 721242, 2021.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology**, 140, n. 2, p. 412-424, Feb 2011.

MURAKAMI, K.; TERAKADO, Y.; SAITO, K.; JOMEN, Y. *et al.* A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 4, Jan 26 2021.

NOZAKI, K.; OGAWA, M.; WILLIAMS, J. A.; LAFLEUR, B. J. *et al.* A molecular signature of gastric metaplasia arising in response to acute parietal cell loss. **Gastroenterology**, 134, n. 2, p. 511-522, Feb 2008.

NYENG, P.; NORGAARD, G. A.; KOBBERUP, S.; JENSEN, J. FGF10 signaling controls stomach morphogenesis. **Dev Biol**, 303, n. 1, p. 295-310, Mar 2007.

ODDY, W. H. Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. **Ann Nutr Metab**, 70 Suppl 2, p. 26-36, 2017.

OSAKI, L. H.; CURI, M. A.; ALVARES, E. P.; GAMA, P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGF α /EGFR. **Differentiation**, 79, n. 1, p. 48-56, Jan 2010.

OSAKI, L. H.; FIGUEIREDO, P. M.; ALVARES, E. P.; 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**, 44, n. 2, p. 174-182, Apr 2011.

OSAKI, L. H.; GAMA, P. MAPK signaling pathway regulates p27 phosphorylation at threonin 187 as part of the mechanism triggered by early-weaning to induce cell proliferation in rat gastric mucosa. **PLoS One**, 8, n. 6, p. e66651, 2013a.

OSAKI, L. H.; GAMA, P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. **Int J Mol Sci**, 14, n. 5, p. 10143-10161, May 2013b.

RADYK, M. D.; BURCLAFF, J.; WILLET, S. G.; MILLS, J. C. Metaplastic Cells in the Stomach Arise, Independently of Stem Cells, via Dedifferentiation or Transdifferentiation of Chief Cells. **Gastroenterology**, 154, n. 4, p. 839-843.e832, 03 2018.

RAMSEY, V. G.; DOHERTY, J. M.; CHEN, C. C.; STAPPENBECK, T. S. *et al.* The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. **Development**, 134, n. 1, p. 211-222, Jan 2007.

REIS, C. A.; DAVID, L.; CARVALHO, F.; MANDEL, U. *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**, 48, n. 3, p. 377-388, Mar 2000.

RITSMA, L.; ELLENBROEK, S. I. J.; ZOMER, A.; SNIPPERT, H. J. *et al.* Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. **Nature**, 507, n. 7492, p. 362-365, Mar 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SHINOHARA, M.; MAO, M.; KEELEY, T. M.; EL-ZAATARI, M. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling regulates gastric epithelial cell development and proliferation in mice. **Gastroenterology**, 139, n. 6, p. 2050-2060.e2052, Dec 2010.

SIGAL, M.; LOGAN, C. Y.; KAPALCZYNSKA, M.; MOLLENKOPF, H. J. *et al.* Stromal R-spondin orchestrates gastric epithelial stem cells and gland homeostasis. **Nature**, 548, n. 7668, p. 451-455, 08 2017.

SILVA, K. M. D. **Efeitos do Desmame Precoce sobre marcadores relacionados ao crescimento e inflamação na mucosa gástrica de ratos.** Orientador: GAMA, P. 2020. (PhD) - Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade de São Paulo.

SIMÕES, C. **Proliferação, Diferenciação, Maturação e migração de populações celulares do epitélio gástrico do rato durante o primeiro mês de vida.** 1992. 132 f. (Doutorado) - Histologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPEER, A. L.; AL ALAM, D.; SALA, F. G.; FORD, H. R. *et al.* Fibroblast growth factor 10-fibroblast growth factor receptor 2b mediated signaling is not required for adult glandular stomach homeostasis. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e49127, 2012.

SPENCER-DENE, B.; SALA, F. G.; BELLUSCI, S.; GSCHMEISSNER, S. *et al.* Stomach development is dependent on fibroblast growth factor 10/fibroblast growth factor receptor 2b-mediated signaling. **Gastroenterology**, 130, n. 4, p. 1233-1244, Apr 2006.

STAMPONE, E.; CALDARELLI, I.; ZULLO, A.; BENCIVENGA, D. *et al.* Genetic and Epigenetic Control of CDKN1C Expression: Importance in Cell Commitment and Differentiation, Tissue Homeostasis and Human Diseases. **Int J Mol Sci**, 19, n. 4, Apr 02 2018.

STANGE, D. E.; KOO, B. K.; HUCH, M.; SIBBEL, G. *et al.* Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. **Cell**, 155, n. 2, p. 357-368, Oct 2013.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**, 127, n. 2, p. 175-186, Jun 2018.

SÁENZ, J. B.; MILLS, J. C. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 15, n. 5, p. 257-273, May 2018.

TELES SILVA, M.; MESQUITA DA SILVA, K.; CAMPOS RATTES, I.; MARIA AGOSTINI ZONTA, G. *et al.* Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. **Int J Mol Sci**, 21, n. 1, Dec 2020.

VAN DEN BRINK, G. R.; HARDWICK, J. C.; NIELSEN, C.; XU, C. *et al.* Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract. **Gut**, 51, n. 5, p. 628-633, Nov 2002.

VAN DEN BRINK, G. R.; HARDWICK, J. C.; TYTGAT, G. N.; BRINK, M. A. *et al.* Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. **Gastroenterology**, 121, n. 2, p. 317-328, Aug 2001.

VASQUES DA COSTA, A.; PURCELL GOES, C.; GAMA, P. Breastfeeding importance and its therapeutic potential against SARS-CoV-2. **Physiol Rep**, 9, n. 3, p. e14744, Feb 2021.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J.; FRANÇA, G. V. *et al.* Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, 387, n. 10017, p. 475-490, Jan 2016.

WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. **J Nutr Biochem**, 25, n. 5, p. 503-514, May 2014.

WEN, X. Z.; MIYAKE, S.; AKIYAMA, Y.; YUASA, Y. BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 316, n. 1, p. 100-106, Mar 26 2004.

WILLET, S. G.; MILLS, J. C. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: from Embryogenesis to Adult Homeostasis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 2, n. 5, p. 546-559, Sep 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **Infant and Young child feeding**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>.

WÖLFFLING, S.; DADDI, A. A.; IMAI-MATSUSHIMA, A.; FRITSCHKE, K. *et al.* EGF and BMPs Govern Differentiation and Patterning in Human Gastric Glands. **Gastroenterology**, 161, n. 2, p. 623-636.e616, Aug 2021.

XIAO, C.; OGLE, S. A.; SCHUMACHER, M. A.; ORR-ASMAN, M. A. *et al.* Loss of parietal cell expression of Sonic hedgehog induces hypergastrinemia and hyperproliferation of surface mucous cells. **Gastroenterology**, 138, n. 2, p. 550-561, 561.e551-558, Feb 2010.

YOSHIOKA, T.; FUKUDA, A.; ARAKI, O.; OGAWA, S. *et al.* Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice. **J Pathol**, 248, n. 2, p. 179-190, 06 2019.

ZAVROS, Y.; ORR, M. A.; XIAO, C.; MALINOWSKA, D. H. Sonic hedgehog is associated with H⁺-K⁺-ATPase-containing membranes in gastric parietal cells and secreted with histamine stimulation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 295, n. 1, p. G99-G111, Jul 2008.

ZAVROS, Y.; WAGHRAY, M.; TESSIER, A.; BAI, L. *et al.* Reduced pepsin A processing of sonic hedgehog in parietal cells precedes gastric atrophy and transformation. **J Biol Chem**, 282, n. 46, p. 33265-33274, Nov 16 2007.

ZHANG, Y.; QUE, J. BMP Signaling in Development, Stem Cells, and Diseases of the Gastrointestinal Tract. **Annu Rev Physiol**, 82, p. 251-273, Feb 10 2020.

ZULIAN, J. G.; HOSOYA, L. Y.; FIGUEIREDO, P. M.; OGIAS, D. *et al.* Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Sci Rep**, 7, p. 45867, Mar 2017.