

**GIZELA MARIA AGOSTINI ZONTA**

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

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Gama

Versão Original

São Paulo

2017

## Resumo

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

A dieta pode regular a proliferação e diferenciação no epitélio gástrico de ratos durante o período pós-natal. Avaliamos o efeito tardio do desmame precoce na massa corpórea, proliferação (imunomarcagem para Ki-67) e diferenciação celular (*immunoblot* de Mist 1 e pepsinogênio C) aos 15, 18, 30 e 60 dias. Ratos Wistar foram divididos nos grupos: desmame precoce (DP) aos 15 dias e desmamados aos 21 dias (A). Os resultados mostraram: massa corpórea aos 18 ( $p<0,01$ ) e 21 ( $p<0,05$ ) dias no grupo DP menor do que no A. Aos 60 dias, os valores se equiparam, porém há diferença entre machos e fêmeas. O índice de proliferação, a espessura da mucosa e profundidade da glândula foram superiores aos 18 dias no grupo DP ( $p<0,05$ ), havendo resultado oposto aos 30 dias e nenhuma resposta aos 60 dias; houve variação no conteúdo de Mist 1 ( $p<0,05$ ) e pepsinogênio C ( $p<0,01$ ) nos animais DP aos 18 dias. Assim, O DP alterou o ganho de peso corporal e crescimento do estômago logo após o início da ingestão de ração, e tal resposta foi compensada na idade adulta.

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

## Abstract

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

Diet can regulate proliferation and differentiation in gastric epithelium of rats during the postnatal period. We evaluated the late effects of early weaning on body mass, cell proliferation (Ki-67 immunolabeling) and differentiation (Mist 1 and pepsinogen C by immunoblot) at 15, 18, 30 and 60 days. Wistar rats were divided into groups: early-weaned (EW) at 15 days, and suckling and weaned at 21 days (S). The results showed that: at 18 ( $p<0,01$ ) and 21 ( $p<0,05$ ) days, body mass was lower in EW than in S. At 60 days, values were similar between S and EW, however we registered a difference between males and females. The proliferation index, mucosal thickness and gland depth were higher in EW (vs. S) at 18 days ( $p<0,05$ ), being reversed at 30 days, whereas no change detected at 60 days. We found a variation in Mist 1 ( $p<0,05$ ) and pepsinogen C ( $p<0,01$ ) at 18 days. Thus, EW altered body weight gain and stomach growth soon after its onset, and part of responses were compensated in adulthood.

**Keywords:** Stomach. Early weaning. Proliferation. Differentiation.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aleitamento e seus benefícios

Amamentar é o ato de nutrir e de estabelecer vínculo afetivo entre a mãe e o neonato, proporcionando repercussões favoráveis à saúde materna, assim como benefícios nutricionais, físicos, imunológicos, cognitivos e emocionais à criança, que podem perpetuar até a vida adulta<sup>1-3</sup>.

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

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

Entre 5 dias a duas semanas do pós-parto, o colostro passa a ser incrementado com maiores concentrações de lactose, e, depois de quatro a seis semanas, o leite humano é considerado maduro<sup>13</sup> contendo 3% a 5% de lipídios, 0,8% a 0,9% de proteínas, 6,9% a 7,2% de carboidratos, 0,2% de

minerais, além de vitaminas (exceto a vitamina K)<sup>16</sup>, macrófagos, imunoglobulinas, hormônios, citocinas e fatores de crescimento<sup>13,17,18</sup>.

Em consonância, a literatura também relata mudanças na constituição do leite de ratos na transição de colostro para leite maduro. O leite materno de ratos, em relação ao colostro, continua com níveis de lipídios elevados, como ácido palmítico, aracdônico, linoleico e oleico, dentre outros, seguido de proteínas e baixa concentração de carboidratos, havendo diminuição da concentração de minerais como magnésio, zinco, cálcio, manganês ao longo do período de lactação<sup>15</sup>, sendo constatada a presença de hormônios como corticosterona<sup>19</sup>, GnRH<sup>20</sup>, TSH<sup>21</sup>, IGF-1 e IGF-2<sup>22</sup>, somatostatina e LHRH<sup>23</sup>, GH e prolactina<sup>24</sup>, leptina<sup>25</sup>, citocinas e fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF)<sup>26,27</sup>.

Em paralelo, podemos destacar o papel do leite materno na adaptação da criança ao ambiente extrauterino, por meio das variações de seus componentes<sup>11</sup>. Puddington e Matson<sup>28</sup> (2008) demonstraram que a exposição de ratas lactantes à ovalbumina por via nasal, proporcionou em sua prole, com 6 a 8 semanas de idade, diminuição de resposta inflamatória eosinofílica nas vias aéreas, bem como a produção de anticorpos específicos de ovalbumina e de citocinas.

Em virtude dos benefícios do aleitamento, a Organização Mundial da Saúde recomenda aleitamento exclusivo (somente leite materno) ao longo dos 6 meses de vida da criança e introdução de alimentos sólidos, bem como outros líquidos, juntamente ao leite materno, até os dois anos de idade<sup>29</sup>. Todavia, as estimativas revelam que, no Brasil, a prevalência de aleitamento exclusivo até os seis meses de vida do neonato é 9,3% inferior ao verificado no

30º dia de vida do recém-nascido, sendo que a prevalência de amamentação no primeiro ano é 50% menor quando comparada aos 30 dias de vida do neonato<sup>30</sup>. E, globalmente, cerca de metade dos neonatos com menos de 1 mês, e 3 em cada 10 crianças entre 1 e 5 meses de vida são amamentadas exclusivamente, o que resulta em uma prevalência de morte (11,6%) de crianças com menos de 5 meses, (informações de 2011)<sup>31</sup>.

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

Desta forma, repensar as práticas profissionais de saúde buscando a promoção de um olhar atento aos aspectos psicossociais, físicos, econômicos, culturais e religiosos, que envolvem a família e o binômio mãe/bebê, possibilita não apenas suporte técnico à lactação, mas a orientação e o aconselhamento necessários para tornar a mulher protagonista do seu processo de amamentar e esclarecida quanto aos benefícios desta ação<sup>2</sup>, que não se restringe ao período perinatal, mas se estende para a infância, adolescência e vida adulta.

Estudos discutem que a mudança no padrão nutricional ocorrida nos primeiros anos de vida pode resultar em alterações epigenéticas, que podem se manifestar em longo prazo. Este evento pode ser denominado programação ou mesmo plasticidade do desenvolvimento, que consiste em “[...] um processo no qual um estímulo aplicado em um período crítico ou sensível do desenvolvimento, resulta em um efeito de longo prazo ou permanente na

estrutura ou função do organismo [...]”<sup>34</sup>, o que pode repercutir em doenças como obesidade, diabetes e hipertensão<sup>35,36</sup>. Diversos estudos realizados em humanos e animais têm confirmado tais evidências, apontando a relação entre o aleitamento e o desenvolvimento de determinadas patologias na vida adulta.

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

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

Outros estudos discutiram a repercussão da variação dos componentes do leite materno sobre o desenvolvimento de patologias no animal adulto. Os autores notaram que o ganho de massa corpórea na idade adulta está relacionado ao tipo de nutriente fornecido às lactantes durante o período de aleitamento, sendo constatado que filhotes aleitados por mães, que receberam dieta com restrição energética obtiveram maior ganho de massa corpórea do que o controle<sup>41</sup>. Somado a isto, pesquisadores têm associado o aleitamento à menor probabilidade de desenvolvimento do diabetes do tipo 2<sup>36</sup>.

Estudos mostraram que o aumento da duração do aleitamento, reduziu os riscos de tolerância a glicose em crianças com 9,5 anos e diminuiu a resistência à insulina em crianças com 5 anos<sup>42</sup>. Além disso, as crianças amamentadas por pelo menos 4 meses tiveram menor risco de desenvolver diabetes aos 21 anos de vida<sup>43</sup> e, aquelas aleitadas por 6 meses ou mais, apresentaram redução dos valores de pressão arterial sistólica em crianças com 5 anos<sup>44</sup>. Outros efeitos benéficos do aleitamento foram descritos na literatura.

Kusunoki et al.<sup>45</sup> (2010) verificaram menor prevalência de bronquite asmática entre as crianças de 7 a 12 anos, que receberam amamentação completa e leite materno, associado ao leite artificial, em comparação com aquelas que foram aleitadas apenas com fórmula infantil. Outra pesquisa mostrou que a amamentação por 4 meses ou mais reduziu os riscos de rinite alérgica em crianças aos 3 anos<sup>46</sup>. Os neonatos que foram amamentados por mais de 6 meses se mostraram mais protegidos contra otite e eczema aos 2 anos e infecções de ouvido e garganta aos 6 anos<sup>47-49</sup>, as quais foram reduzidas em 31% a 53% no primeiro ano de vida em crianças amamentadas



por 9 meses ou mais, e de 63% a 87% quando amamentadas exclusivamente por 6 meses ou mais<sup>50</sup>.

Estudos utilizando camundongos também constataram que, eventos estressores ocorridos durante o período de lactação, como a substituição do leite materno por ração no 14º dia, pode antecipar o desenvolvimento estrutural de regiões da amígdala envolvidas na regulação do estado de ansiedade e, desta forma, induzir a um menor estado de repouso aos 17 e 19 dias de vida pós-natal e de ansiedade aos 21 e 35 dias, em relação ao grupo controle desmamado aos 21 dias<sup>51</sup>. Tais resultados também foram apontados por Kikusui et al.<sup>52</sup> (2005), os quais constataram que a prole submetida à privação materna aos 15 dias de vida pós-natal, apresentou comportamento ansioso na vida adulta.

Em consonância, a literatura destaca que o aumento da duração da amamentação melhora o desenvolvimento motor aos 10, 14 e 17 anos de vida da criança<sup>53</sup>, assim como a inteligência verbal<sup>54</sup>, capacidade de linguagem<sup>55</sup> e o quociente de inteligência<sup>56</sup> na infância. Autores questionaram em seus estudos se os fatores imunológicos presentes no leite materno atuam no desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso de camundongos. Esta pesquisa mostrou que a diminuição dos níveis de TNF-  $\alpha$  no leite levaram ao aumento da proliferação de células neurais no giro denteado do hipocampo em filhotes com 14 dias amamentados e, conseqüentemente, aumento da memória espacial e contextual, quando a prole, em idade adulta, foi submetida a ambientes adversos<sup>12</sup>.

Deve-se mencionar também, que durante a amamentação, elementos tais como o alto pH gástrico, a ausência de pepsina luminal, e a presença de

macroproteínas acessórias no leite desfavorecem a digestão proteica e, desta forma, permitem a absorção intacta das moléculas no intestino delgado<sup>57,58</sup>. Além disso, a frequência de amamentação determinada em intervalos em bebês, e constante em ninhadas de animais de laboratório, permite o contato permanente dos peptídeos do leite com a mucosa gástrica, mesmo que estes estejam em concentrações baixas.

Indubitavelmente, o leite por meio de suas moléculas tem papel modulador do crescimento, da renovação e proteção do organismo<sup>12</sup>. No estômago, Gama e Alvares<sup>59</sup> (1996) evidenciaram que hormônios presentes no leite de ratas como somatostatina e LHRH promovem regulação da proliferação celular no epitélio gástrico. Neste estudo, ratos de 18 e 22 dias foram submetidos a 20 h e 24 h de jejum, quando receberam os hormônios por gavagem. Os resultados mostraram que ratos de 18 dias apresentaram maior atividade proliferativa que os animais em jejum não tratados com hormônios.

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

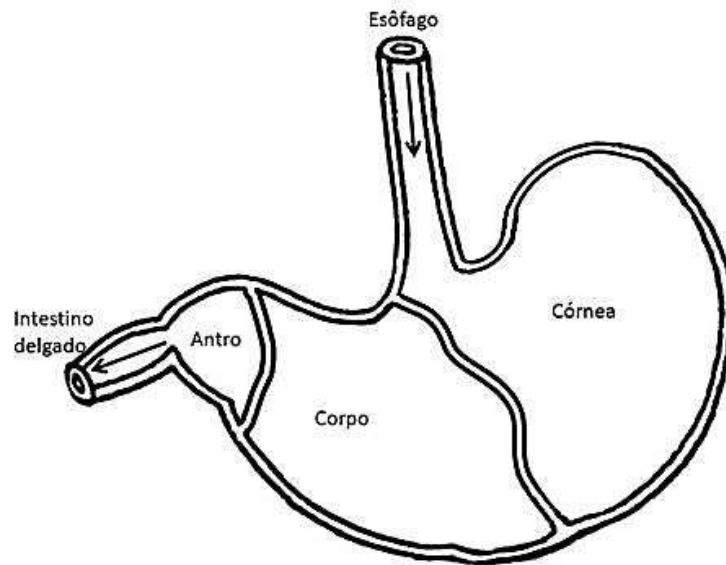
## **1.2 Estômago de roedores**

### *1.2.1 Função e estrutura do estômago*

O estômago é um órgão que apresenta basicamente três funções: 1) secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, água, eletrólitos, fator intrínseco e glicoproteínas; 2) síntese de hormônios, como gastrina, ghrelina (do original “Gh-relin”), somatostatina, colecistoquinina e outros; 3) mistura do alimento ao fluido estomacal<sup>63</sup>.

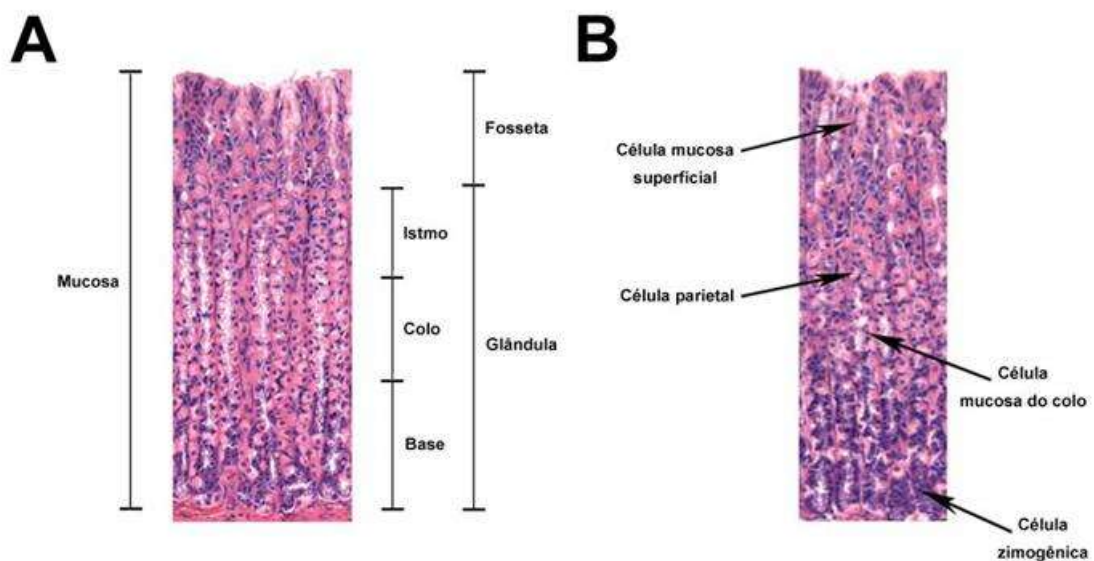
Anatomicamente, o estômago de roedores possui duas porções distintas: a córnea, que apresenta revestimento fino, pálido e transparente; o corpo e antro, com revestimento externo espesso, pigmentado e vascularizado, sendo o revestimento interno, do corpo, formado por uma camada espessa, enrugada, bastante vascularizada e pigmentada, e, do antro, por uma camada mais fina e menos vascularizada<sup>64</sup>.

A análise histológica mostra que a mucosa gástrica de roedores pode ser dividida em três regiões: córnea, corpo e antro (Figura 1). Subjacente ao esôfago, temos a região da córnea, constituída por epitélio estratificado queratinizado. Seguido do corpo gástrico, formado por profundas glândulas oxínticas e fossetas menos extensas. A partir do corpo há uma área de transição, com glândulas tubulares, as quais são seguidas por uma porção antral, que secreta muco e hormônios, apresentando glândulas tubulares menos profundas e uma fosseta mais longa<sup>64-66</sup>.



**Figura 1** – Organização anatômica e histológica do estômago de ratos. O bolo alimentar, a partir do esôfago, segue para o estômago e intestino delgado, conforme indicado pelas setas. Fonte: Fiore<sup>67</sup> (2013).

A porção glandular da mucosa gástrica é composta por uma monocamada de células epiteliais que adentram em direção à lâmina própria, formando uma estrutura tubular simples ou ramificada, dispostas em três segmentos: istmo, colo e base<sup>64</sup> que se abre para o lúmen pela fosseta<sup>65</sup>, conforme mostrado na Figura 2A.



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

### 1.2.2 Células epiteliais que compõe o corpo gástrico

No corpo gástrico, encontram-se diferentes populações de células epiteliais como mucosas superficiais e do colo, células parietais, células zimogênicas, células enteroendócrinas e células com estrutura indiferenciada, podendo tornar-se uma célula-tronco multipotente<sup>64-66,68,69</sup> (Figura 2B), sendo esta região responsável pela maioria das funções gástricas<sup>70</sup>. Logo, utilizamos essa porção do epitélio gástrico, como objeto de estudo.

Karam et al.<sup>71</sup> (1993) propuseram que as células epiteliais gástricas originam-se a partir de células-tronco localizadas na interface istmo-colo da glândula na região do corpo em animais adultos, sendo constatado por Matsuo et al.<sup>72</sup> (2017), por meio de marcadores de células-tronco, que estas estão presentes na porção do istmo, bem como em células zimogênicas da base da glândula. Em adultos, considera-se que na unidade fosseta e glândula, as células derivem de células-tronco. Acredita-se que esta célula entre em ciclo lentamente e mantenha uma população pequena através de divisões assimétricas, a partir da qual as células-filhas saem deste nicho e originam diferentes tipos celulares<sup>69,73,74</sup>.

Stange et al.<sup>75</sup> (2013) constataram um reservatório de células zimogênicas positivas para *Troy* (marcador de células-tronco) na base da glândula gástrica. Assim, embora as células-tronco do epitélio gástrico estejam localizadas e proliferando na interface istmo-colo, a pequena população zimogênica *Troy+*, que está protegida na base da glândula, pode ser requerida

para se diferenciar e dar origem aos diferentes tipos celulares do epitélio gástrico quando injúrias atingirem as regiões superficiais da mucosa<sup>75,76</sup>.

Em filhotes, a disposição das células em proliferação ocorre ao longo de toda a glândula gástrica, não havendo uma região onde essas células estão mais concentradas. Assim, o compartimento proliferativo, como presente na mucosa de ratos adultos<sup>77</sup>, pode ser identificado somente a partir de 21 dias, quando as regiões da glândula são definidas e as células em divisão ficam concentradas na interface entre o istmo e o colo<sup>78</sup>.

Nos adultos, as células-tronco, localizadas na porção istmo-colo, se diferenciam e, concomitantemente, migram para cima e para baixo. Estas células dão origem a outras iguais a elas e também a: células pré-mucosas, que migram em direção à fosseta e à superfície luminal, se diferenciando em células mucosas superficiais; células pré-parietais, que têm migração bidirecional, formando as células parietais; células pré-enteroendócrinas, que também migram em direção ao lúmen e à base, originando as células enteroendócrinas; e células pré-mucosas do colo, que migram em direção à região do colo, onde se diferenciam em células mucosas do colo; algumas destas células continuam migrando em direção à base da glândula, passam por um estágio de transição para originar células zimogênicas<sup>69,71,79</sup>.

O epitélio da mucosa está em contato com o lúmen e é composto de células mucosas superficiais, as quais formam a fosseta, estando também presente no istmo<sup>80,81</sup>. Ao longo do processo de migração, essas células tornam-se especializadas em sintetizar e secretar mucina e fator Trefoil 1<sup>81,82</sup>. Em todas as porções da unidade, fosseta e glândula, mas em sua maioria no istmo e colo da porção glandular, as células parietais estão presentes e se

renovam a cada 54 dias<sup>80,83,84</sup>. Este tipo celular secreta de íons<sup>80,83</sup>, o que reduz o pH do lúmen gástrico. Os hormônios também são secretados na cavidade gástrica por meio das células enteroendócrinas, as quais estão dispostas na fosseta e nos três compartimentos da glândula, mas em maior concentração na base da mesma<sup>85</sup>.

Na região do colo, encontramos as células mucosas do colo, que apresentam *turnover* de 16 dias, formato triangular, com a porção basal direcionada para a lâmina própria e a apical para o lúmen, local em que secretam mucina 6 e o fator Trefoil 2<sup>69,74,80,86,87</sup>. As células zimogênicas maduras têm sua localização restrita à porção da base da glândula, havendo maior concentração de células nas partes média e baixa da base, apresentando um *turnover* de 138 dias<sup>74,80,87</sup>. A completa diferenciação em célula zimogênica caracteriza-se pela presença de grânulos secretórios homogêneos subjacentes a membrana apical, núcleo e retículo endoplasmático rugoso na porção basal, bem como, vesículas secretórias na face trans do Aparelho de Golgi<sup>79,87,88</sup>. Diversos fatores de transcrição atuam nos processos de especialização celular<sup>89</sup>, como o fator de transcrição Mist 1.

### 1.2.3 Fator de transcrição Mist 1

O fator de transcrição Mist 1 pertence à família do fator de transcrição *helix-loop-helix basic*<sup>89</sup> e está presente em células secretórias serosas e mucoserosas de diferentes tecidos como: as células da glândula parótida e da glândula lacrimal; as células acinosas do pâncreas; célula da próstata; do intestino delgado como as células de Paneth e as células zimogênicas, no estômago<sup>90</sup> A expressão gênica de Mist 1 é induzida pelo fator de transcrição XBP 1 (*x-box binding protein 1*)<sup>91</sup>. Essa proteína ativa a transcrição de genes-

alvos que estão envolvidos na organização estrutural do aparato secretor da célula, de forma que na ausência de Mist 1, a célula adquire formato cubóide, com citoplasma apical atrofiado, vesículas menores e menos abundantes<sup>79,92,93</sup>. De acordo com Tian et al.<sup>94</sup> (2010) foram identificados 16 genes, que podem ser alvos do fator Mist 1, como Rab3D e Rab26, tais proteínas estão envolvidas na formação de grânulos secretores em células gástricas. A Mist 1 também regula a expressão gênica de Mb1, a qual promove organização do aparato secretor das células zimogênicas<sup>95</sup>.

Esse papel de Mist 1 foi evidenciado em outros órgãos como o pâncreas e fígado. A Mist 1 foi descrita como fundamental para a exocitose de enzimas, visto que o grupo *knockout* para Mist 1 não respondeu a estímulos indutores de secreção, assim como foi alterada a disposição dos grânulos zimogênicos na porção apical das células acinosas e do retículo endoplasmático e núcleo na porção basal, o que resultou em células acinosas nos animais adultos do grupo *knockout* semelhantes às células embrionárias<sup>96</sup>. Chikada et al.<sup>97</sup> (2015) também evidenciaram a participação de Mist 1 na diferenciação de hepatoblastos em hepatócitos maduro.

Em outras pesquisas verificou-se que a proteína Mist 1 induz a transcrição de genes que modificam o aparato secretor das células mucosas do colo em célula zimogênica, por promover alterações na organização estrutural e diferenciação terminal deste tipo celular, sendo a Mist 1 considerada um marcador de maturidade desta célula<sup>79,91,98,99</sup>. No rato, os grânulos contidos neste tipo celular consistem de fator intrínseco e pepsinogênio<sup>100,101</sup>, além disso, nesta célula há expressão de moesina, uma proteína que promove a



ligação do citoesqueleto de actina à membrana apical da célula<sup>102</sup> e pode estar envolvida na secreção de pepsinogênio<sup>101</sup>.

#### *1.2.4 Pepsinogênio C*

As células zimogênicas sintetizam e secretam pepsinogênio, na forma pré-proenzima inativa, ou seja, uma porção pré, que se refere a uma sequência sinal, e a proenzima, um peptídeo ativado e a região da enzima ativa<sup>103</sup>. Esse peptídeo consiste em zimogênios inativos que podem ser convertidos em pepsina<sup>104</sup>. A literatura descreve 7 tipos de isozimogenos de pepsinogênio, sendo os isozimogenos 1 a 5, agrupados como pepsinogênio A e isozimogeno 6 e 7, denominado pepsinogênio C, ambos presentes em ratos<sup>105-107</sup>. Estudos mostram que essas proenzimas são codificadas por genes de cromossomos distintos, bem como apresentam composições distintas<sup>105,108,109</sup>.

Com a síntese do peptídeo e formação dos grânulos secretores, estímulos provenientes de secretagogos podem liberar o conteúdo dos grânulos por exocitose para o lúmen<sup>110</sup>. A proenzima lançada em meio ácido (pH<4) sofre uma mudança em sua conformação, que consiste na redução da interação eletrostática com a porção carboxil da enzima ativa e, conseqüentemente, clivagem da porção N-terminal do peptídeo ativado, sendo formada a pepsina<sup>103</sup>.

A secreção de pepsinogênio é estimulada por secretagogos que podem ser hormônios peptídicos como prostaglandina, peptídeo intestinal vasoativo, colescistocinina e carbacol<sup>110-112</sup>. Esses fatores induzem o aumento de AMP cíclico e cálcio intracelular<sup>113</sup>. As alterações desses mensageiros intracelulares conduzem a modulação de proteínas kinases que promovem a ativação da cascata de sinalização e, com isto, a secreção de pepsinogênio<sup>114,115</sup>.

Ge et al.<sup>116</sup> (1998) detectaram células marcadas para pepsinogênio na mucosa gástrica de ratos com 18,5 dias de vida intraútero, havendo um aumento dessa população no 21º dia de vida pós-natal. Este aumento da concentração de pepsinogênio com o decorrer da maturação do órgão deve-se a atividade de hormônios, como o glicocorticoide que tem sido relacionado ao desenvolvimento de órgãos e estruturas em embriões e após o nascimento. Em roedores, os níveis séricos de glicocorticoide aumentam no final da gestação e se elevam durante o período de transição do aleitamento para o desmame<sup>57</sup>. E, no estômago, induzem o aumento da atividade de pepsinogênio, bem como estimulam a diferenciação de células zimogênicas, dessa forma, a literatura tem descrito o pepsinogênio C como um marcador de diferenciação da mucosa gástrica<sup>117</sup>.

### **1.3 Desenvolvimento do epitélio gástrico**

Os aspectos morfológicos da mucosa gástrica são modificados durante o período gestacional e pós-natal. Aos 12,5 dias de gestação, observou-se um epitélio simples constituído por células epiteliais indiferenciadas, que se mostrou pseudoestratificado, com formação inicial do lúmen glandular no 14º dia, bem como aumento da extensão do lúmen glandular no 15º dia e separação das unidades glandulares pelo tecido conjuntivo aos 16 dias. Além disso, esse estudo apontou que horas após o nascimento, todo epitélio era composto por células em divisão, sendo constatadas células mucosas superficiais, células parietais e zimogênicas, todas ainda imaturas. Do 14º para o 21º dia, foram verificadas células mucosas do colo, bem como aumento no número de células parietais, e, somado a isto, diferenciação dos tipos celulares e migração dos mesmos para porções distintas da glândula<sup>118</sup>.

Os processos de maturação da mucosa gástrica permanecem até o desmame, que corresponde à fase da terceira para a quarta semana de vida pós-natal do rato, quando o aleitamento é gradativamente substituído pela ingestão de alimento sólido<sup>57</sup>. Nesse período, é observado espessamento da mucosa gástrica, devido à formação das glândulas e constituição de todos os tipos celulares<sup>118</sup>. E, em toda a extensão da glândula estão presentes células em divisão<sup>78</sup> e em diferenciação, superando as taxas de morte celular, resultando em crescimento e desenvolvimento do órgão<sup>119</sup>, de forma que em animais com 21 dias de idade é possível identificar o istmo, colo e a base da glândula<sup>118</sup>. De maneira distinta, no epitélio glandular do animal adulto, as populações celulares em proliferação estão localizadas na região istmo- colo<sup>78</sup>, sendo direcionadas para promover o processo de renovação epitelial<sup>120</sup>, bem como reparação de danos.

#### **1.4 Desmame precoce**

Os mecanismos que coordenam o crescimento e desenvolvimento órgãos podem ser influenciados por fatores genéticos, hormonais e de dietas<sup>121</sup>. Diferentes estudos mostraram que a expressão, síntese e secreção das mucinas no trato gastrointestinal são processos regulados pelo padrão de alimentação durante o desenvolvimento pós-natal<sup>122,123</sup>. Em adição, a privação alimentar por meio do jejum induziu o aumento da proliferação celular em filhotes, contrariamente, em adultos, este modelo reduziu os processos de divisão celular<sup>77,78</sup>.

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

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

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

pode estar envolvida na atividade proliferativa das células epiteliais do estômago<sup>128</sup>.

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

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

### **1.5 Justificativa**

Em vista dos efeitos do desmame precoce aos 15 dias sobre a mucosa gástrica em filhotes, questionamos se essas modificações poderiam ser mantidas na vida adulta. Todavia, as buscas na literatura não trouxeram

nenhum dado a respeito das consequências da abrupta mudança de leite materno para ração sobre a cinética celular e os processos de diferenciação no epitélio gástrico de ratos adultos.

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

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

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

Consideramos que este estudo poderá trazer informações importantes para outros projetos destinados à pesquisa básica (ciência e conhecimento), e

aplicada (clínica), ao estabelecer experimentalmente como e quais parâmetros se modificam nas funções gástricas em indivíduos que passam por distúrbios alimentares durante o crescimento. A importância da amamentação já é ressaltada anualmente em campanhas no país, e os resultados dessa proposta poderão corroborar e ampliar o conjunto de informações para divulgação e conscientização da população (impacto social).

## 6 CONCLUSÃO

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



## REFERÊNCIAS\*

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

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

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

26. Dvorák B, Koldovský O. The presence of transforming growth factor-alpha in the suckling rat small intestine and pancreas and the absence in rat milk. *Pediatr Res.* 1994;35(3):348-53.
27. Penttila IA, van Spriël AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression. In postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res.* 1998;44(4):524-31.
28. Puddington L, Matson A. Breathing easier with breast milk. *Nat Med.* 2008;14(2):116-8.
29. World Health Organization [internet]. Geneva; c2008 [acesso em 13 abr 2017]. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/world\\_breastfeeding\\_week\\_20090731/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/world_breastfeeding_week_20090731/en/).
30. Departamento de Informação do Sistema Único de Saúde [internet]. Brasília; c2012 [acesso em 13 abr 2017]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>.
31. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet.* 2013;382(9890):427-51.32.
32. de Araújo OD, da Cunha AL, Lustosa LR, Nery IS, Mendonça RCM, Campelo SMA. Aleitamento materno: fatores que levam ao desmame precoce. *Rev. bras. Enferm.* 2008;61(4):488-492.
33. de Oliveira CS, Iocca FA, Carrijo MLR, Garcia RATM. Amamentação e as intercorrências que contribuem para o desmame precoce. *Rev. Gaúcha Enferm.* 2015;36(spe):16-23.
34. Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses. Geneva: World Health Organization; 2007.
35. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell.* 2010;6(1):25-36.
36. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):14-9.
37. Shields L, O'Callaghan M, Williams GM, Najman JM, Bor W. Breastfeeding and obesity at 14 years: a cohort study. *J Paediatr Child Health.* 2006;42(5):289-96.
38. Rebhan B, Kohlhuber M, Schwegler U, Fromme H, Abou-Dakn M, Koletzko BV. Breastfeeding duration and exclusivity associated with infants' health and growth: data from a prospective cohort study in Bavaria, Germany. *Acta Paediatr.* 2009;98(6):974-80.

39. Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.* 2013;45(1):22-30.
40. Peixoto-Silva N, Moura EG, Carvalho JC, Nobre JL, Quitete FT, Pinheiro CR, et al. Bromocriptine treatment at the end of lactation prevents hyperphagia, higher visceral fat and liver triglycerides in early-weaned rats at adulthood. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(4):488-499.
41. de Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem.* 2007;18(2):134-9.
42. Veena SR, Krishnaveni GV, Wills AK, Hill JC, Karat SC, Fall CH. Glucose tolerance and insulin resistance in Indian children: relationship to infant feeding pattern. *Diabetologia.* 2011;54(10):2533-7.
43. Al Mamun A, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM, Callaway L, McIntyre HD. Breastfeeding is protective to diabetes risk in young adults: a longitudinal study. *Acta Diabetol.* 2015;52(5):837-44.
44. Nobre LN, Lessa AD. Influence of breastfeeding in the first months of life on blood pressure levels of preschool children. *J Pediatr (Rio J).* 2016;92(6):588-94.
45. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Mukaida K, et al. Breastfeeding and the prevalence of allergic diseases in schoolchildren: Does reverse causation matter? *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(1 Pt 1):60-6.
46. Codispoti CD, Levin L, LeMasters GK, Ryan P, Reponen T, Villareal M, et al. Breast-feeding, aeroallergen sensitization, and environmental exposures during infancy are determinants of childhood allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1054-60.e1.
47. Bowatte G, Tham R, Allen KJ, Tan DJ, Lau M, Dai X, et al. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):85-95.
48. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):38-53.
49. Pukander J, Luotonen J, Timonen M, Karma P. Risk factors affecting the occurrence of acute otitis media among 2-3-year-old urban children. *Acta Otolaryngol.* 1985;100(3-4):260-5.
50. Li R, Dee D, Li CM, Hoffman HJ, Grummer-Strawn LM. Breastfeeding and risk of infections at 6 years. *Pediatrics.* 2014;134 Suppl 1:S13-20.
51. Ono M, Kikusui T, Sasaki N, Ichikawa M, Mori Y, Murakami-Murofushi K. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of

the basolateral amygdala of male Balb/c mice. *Neuroscience*. 2008;156(4):1103-10.

52. Kikusui T, Isaka Y, Mori Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. *Behav Brain Res*. 2005;162(2):200-6.

53. Grace T, Oddy W, Bulsara M, Hands B. Breastfeeding and motor development: A longitudinal cohort study. *Hum Mov Sci*. 2017;51:9-16.

54. Oddy WH, Kendall GE, Blair E, De Klerk NH, Stanley FJ, Landau LI, et al. Breast feeding and cognitive development in childhood: a prospective birth cohort study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2003;17(1):81-90.

55. Whitehouse AJ, Robinson M, Li J, Oddy WH. Duration of breast feeding and language ability in middle childhood. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2011;25(1):44-52.

56. Fonseca AL, Albernaz EP, Kaufmann CC, Neves IH, Figueiredo VL. Impact of breastfeeding on the intelligence quotient of eight-year-old children. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(4):346-53.

57. Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol*. 1981;241(3):G199-214.

58. Shanks N, Lightman SL. The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J Clin Invest*. 2001;108(11):1567-73.

59. Gama P, Alvares EP. LHRH and somatostatin effects on the cell proliferation of the gastric epithelium of suckling and weaning rats. *Regul Pept*. 1996;63(2-3):73-8.

60. Oguas D, de Andrade Sá ER, Alvares EP, Gama P. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weaning rats. 2010;26(2):224-9.

61. Glavin GB, Pare WP. Early weaning predisposes rats to exacerbated activity-stress ulcer formation. *Physiol Behav*. 1985;34(6):907-9.

62. Greenberg D, Ackerman SH. Reduced fat stores after early weaning: a correlate of vulnerability of stress ulcers. *Physiol Behav*. 1986;38(3):375-9.

63. Bjorkqvist M, Dornonville de la Cour C, Zhao CM, Gagnemo-Persson R, Hakanson R, Norlen P. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. *Regul Pept*. 2002;108(2-3):73-82.

64. Lee ER, Trasler J, Dwivedi S, Leblond CP. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. *Am J Anat*. 1982;164(3):187-207.

65. Karam SM. Cell lineage relationship in the stomach of normal and genetically manipulated mice. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(2):271-9.
66. Willet SG, Mills JC. Stomach Organ and Cell Lineage Differentiation: From Embryogenesis to Adult Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;2(5):546-559.
67. Fiore APZP. Regulação de p27<sup>kip1</sup> pelo fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) na mucosa gástrica de ratos lactentes. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.
68. Choi E, Roland JT, Barlow BJ, O'Neal R, Rich AE, Nam KT, et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. *Gut.* 2014;63(11):1711-20.
69. MRuchaudills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology.* 2011;140(2):412-24.
70. Kim TH, Shivdasani RA. Stomach development, stem cells and disease. *Development.* 2016;143(4):554-65.
71. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec.* 1993;236(2):259-79.
72. Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, Kohu K, Voon DC, Hiai H, Unno M, So JB, Zhu F, Srivastava S, Teh M, Yeoh KG, Osato M, Ito Y. Identification of stem cells in the epithelium of the stomach corpus and antrum of mice. *Gastroenterology.* 2017;152(1):218-231.
73. McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deheragoda M, Leedham SJ, et al. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology.* 2008;134(2):500-10.
74. Hoffmann W. TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol.* 2015;47(3):806-16.
75. Stange DE, Koo BK, Huch M, Sibbel G, Basak O, Lyubimova A, et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell.* 2013;155(2):357-68.
76. Mills JC, Sansom OJ. Reserve stem cells: Reprogramming of differentiated cells fuels repair, metaplasia, and neoplasia in the adult gastrointestinal tract. *Sci Signal.* 2015;8(385):re8.
77. Alvares EP. The effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day-old suckling rat. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(6):641-9.

78. Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(8):869-73.
79. Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development.* 2007;134(1):211-22.
80. Stevens CE, Leblond CP. Renewal of the mucous cells in the gastric mucosa of the rat. *Anat Rec.* 1953;115(2):231-45.
81. Keeley TM, Samuelson LC. Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(6):G1241-51.
82. Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(15):1946-54.
83. Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat Rec.* 1993;236(2):314-32.
84. Li H, Helander HF. Parietal cell kinetics after administration of omeprazole and ranitidine in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 1995;30(3):205-9.
85. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat Rec.* 1993;236(2):333-40.
86. Kang W, Rathinavelu S, Samuelson LC, Merchant JL. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy. *Lab Invest.* 2005;85(5):702-15.
87. Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec.* 1993;236(2):297-313.
88. Karam SM, Leblond CP. Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. *Anat Rec.* 1992;232(2):231-46.
89. Lemerrier C, To RQ, Swanson BJ, Lyons GE, Konieczny SF. Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Dev Biol.* 1997;182(1):101-13.
90. Pin CL, Bonvissuto AC, Konieczny SF. Mist1 expression is a common link among serous exocrine cells exhibiting regulated exocytosis. *Anat Rec.* 2000;259(2):157-67.

91. Huh WJ, Esen E, Geahlen JH, Bredemeyer AJ, Lee AH, Shi G, et al. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. *Gastroenterology*. 2010;139(6):2038-49.
92. Judd LM, Gleeson PA, Toh BH, van Driel IR. Autoimmune gastritis results in disruption of gastric epithelial cell development. *Am J Physiol*. 1999;277(1 Pt 1):G209-18.
93. Mills JC, Taghert PH. Scaling factors: transcription factors regulating subcellular domains. *Bioessays*. 2012;34(1):10-6.
94. Tian X, Jin RU, Bredemeyer AJ, Oates EJ, Błazewska KM, McKenna CE, et al. RAB26 and RAB3D are direct transcriptional targets of MIST1 that regulate exocrine granule maturation. *Mol Cell Biol*. 2010;30(5):1269-84.
95. Capoccia BJ, Jin RU, Kong YY, Peek RM Jr, Fassan M, Rugge M, Mills JC. The ubiquitin ligase Mindbomb 1 coordinates gastrointestinal secretory cell maturation. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1475-91.
96. Drenzo D, Hess DA, Damsz B, Hallett JE, Marshall B, Goswami C, et al. Induced Mist1 expression promotes remodeling of mouse pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2012;143(2):469-80.
97. Chikada H, Ito K, Yanagida A, Nakauchi H, Kamiya A. The basic helix-loop-helix transcription factor, Mist1, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts. *Sci Rep*. 2015;5:14989.
98. Bredemeyer AJ, Geahlen JH, Weis VG, Huh WJ, Zinselmeyer BH, Srivatsan S, et al. The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. *Dev Biol*. 2009;325(1):211-24.
99. Nozaki K, Weis V, Wang TC, Falus A, Goldenring JR. Altered gastric chief cell lineage differentiation in histamine-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(6):G1211-20.
100. Schepp W, Ruoff HJ, Miederer SE. Cellular origin and release of intrinsic factor from isolated rat gastric mucosal cells. *Biochim Biophys Acta*. 1983;763(4):426-33.
101. Zhu L, Hatakeyama J, Zhang B, Makdisi J, Ender C, Forte JG. Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G185-95.
102. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*. 2000;101(3):259-70.
103. Richter C, Tanaka T, Yada RY. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J*. 1998;335 ( Pt 3):481-90.



104. Sanny CG, Hartsuck JA, Tang J. Conversion of pepsinogen to pepsin. Further evidence for intramolecular and pepsin-catalyzed activation. *J Biol Chem.* 1975;250(7):2635-9.
105. Furihata C, Saito D, Fujiki H, Kanai Y, Matsushima T, Sugimura T. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *Eur J Biochem.* 1980;105(1):43-50.
106. Taggart RT, Mohandas TK, Shows TB, Bell GI. Variable numbers of pepsinogen genes are located in the centromeric region of human chromosome 11 and determine the high-frequency electrophoretic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(18):6240-4.
107. Hersey SJ. Gastric Secretion of Pepsins. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3. ed. New York: Raven Press; 1994. v. 2, p. 1227-1238.
108. Nakai H, Byers MG, Shows TB, Taggart RT. Assignment of the pepsinogen gene complex (PGA) to human chromosome region 11q13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):215-7.
109. Pals G, Azuma T, Mohandas TK, Bell GI, Bacon J, Samloff IM, et al. Human pepsinogen C (progastricsin) polymorphism: evidence for a single locus located at 6p21.1-pter. *Genomics.* 1989;4(2):137-48.
110. Chew CS. Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine, and forskolin increase  $[Ca^{2+}]_i$  in gastric glands. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 1):G814-23.
111. Berger S, Raufman JP. Prostaglandin-induced pepsinogen secretion from dispersed gastric glands from guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 1985;249(5 Pt 1):G592-8.
112. Gespach C, Bataille D, Dupont C, Rosselin G, Wunsch E, Jaeger E. Evidence for a cyclic AMP system highly sensitive to secretin in gastric glands isolated from the rat fundus and antrum. *Biochim Biophys Acta.* 1980;630(3):433-41.
113. Defize J, Hunt RH. Control of pepsinogen synthesis and secretion in primary monolayer cultures of canine gastric chief cells. *Dig Dis Sci.* 1988;33(12):1583-91.
114. Raufman JP, Malhotra R, Xie Q, Raffaniello RD. Expression and phosphorylation of a MARCKS-like protein in gastric chief cells: further evidence for modulation of pepsinogen secretion by interaction of  $Ca^{2+}$ /calmodulin with protein kinase C. *J Cell Biochem.* 1997;64(3):514-23.
115. Xie G, Raufman JP. Association of protein kinase A with AKAP150 facilitates pepsinogen secretion from gastric chief cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(4):G1051-8.
116. Ge YB, Ohmori J, Tsuyama S, Yang DH, Kato K, Miyauchi M, et al. Immunocytochemistry and in situ hybridization studies of pepsinogen C-

producing cells in developing rat fundic glands. *Cell Tissue Res.* 1998;293(1):121-31.

117. Kumegawa M, Takuma T, Hosoda S, Kunii S, Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Biochim Biophys Acta.* 1978;543(2):243-50.

118. Kataoka K, Sakano Y, Miura J. Histogenesis of the mouse gastric mucosa, with special reference to type and distribution of proliferative cells. *Arch Histol Jpn.* 1984;47(5):459-74.

119. Gama P, Alvares EP. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. *J Nutr.* 2000;130(10):2594-8.

120. Xiao ZQ, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligiel SE, Majumdar AP. Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(15):1849-64.

121. Lee PC, Lebenthal E. Early weaning and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. *Pediatr Res.* 1983;17(8):645-50.

122. Osaki LH, Curi MA, Alvares EP, Gama P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGF $\alpha$ /EGFR. *Differentiation.* 2010;79(1):48-56.

123. Biol-N'garagba MC, Louisot P. Regulation of the intestinal glycoprotein glycosylation during postnatal development: role of hormonal and nutritional factors. *Biochimie.* 2003;85(3-4):331-52.

124. Ghizoni H, Figueiredo PM, Moisan MP, Ogias D, Osaki LH, Gama P. Regulation of corticosterone function during early weaning and effects on gastric cell proliferation. *Nutrition.* 2014;30(3):343-9.

125. Lin CH, Lyons H, Seelbach MS, Tolia V, Vijesurier R. Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. *Digestion.* 2001;63(4):214-9.

126. Osaki LH, Figueiredo PM, Alvares EP, Gama P. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. *Cell Prolif.* 2011;44(2):174-82.

127. Osaki LH, Gama P. MAPK signaling pathway regulates p27 phosphorylation at threonine 187 as part of the mechanism triggered by early-weaning to induce cell proliferation in rat gastric mucosa. *PLoS One.* 2013;8(6):e66651.

128. Bittar NM, Zulian JG, Ogias D, Gama P. Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? *Nutrition.* 2016;32(1):101-7.

129. Zulian JG, Hosoya LY, Figueiredo PM, Ogias D, Osaki LH, Gama P. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. *Sci Rep.* 2017;(7):45867.
130. Jacobs DM, Ackerman SH. Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. *Am J Physiol.* 1984;247(6 Pt 1):G645-50.
131. Chen C, Zhu WD, Zhang XH, Zhu YH, Huang JA. Value of Ki-67 and computed tomography in the assessment of peripheral lung adenocarcinoma. *Br J Biomed Sci.* 2016;73(1):32-7.
132. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
133. Gonzalez-Sistal A, Baltasar-Sánchez A, Menéndez P, Arias JI, Ruibal Á. Breastfeeding and Immunohistochemical Expression of ki-67, p53 and BCL2 in Infiltrating Lobular Breast Carcinoma. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151093.
134. Shiraishi T. Cell kinetic analysis of brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67: in vitro and in situ study. *Acta Med Okayama.* 1990;44(4):187-201.
135. Wierzbicka-Tutka I, Sokołowski G, Bałdys-Waligórska A, Adamek D, Radwańska E, Gołkowski F. PTTG and Ki-67 expression in pituitary adenomas. *Przegl Lek.* 2016;73(2):53-8.
136. Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;56(1):25-33.
137. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature.* 2016;535(7611):308-12.
138. Aherne WA, Camplejohn RS, Al-Wiswasy M, Ford D, Kellerer AM. Assessment of inherent fluctuations of mitotic and labelling indices of human tumours. *Br J Cancer.* 1977;36(5):577-82.
139. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
140. Gama P, Alvares EP. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation in the gastric epithelium of suckling rats *J Gastroenterol.* 1998;33(1):32-8.
141. Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med.* 2011;2(5):977-84.

142. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci.* 2004;7(5):493-4.
143. Boueri BFC, Pessanha CR, Costa LR, Ferreira MR, Melo HS, Abreu MDC, Pessoa LR, Silva PCA, Pereira AD, Ribeiro DC, Meneses JA, Costa CAS, Boaventura GT. Body composition in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. *J Dev Orig Health.* 2015;6(6):553-557.
144. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res.* 2000;20(11):1603-1612.
145. Jang M, Mistry A, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice. *J Nutr.* 2000;130(11):2813-20.
146. Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet.* 2006;70(4):295-301.
147. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, KiessW, Kratzsch, J. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. *Pediatric Research.* 2011;70(6):633-637.
148. Lima NS, De Moura EG, Passos MCF, Neto JFN, Reis AM, De Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin-resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2011;105(9):1405-13.
149. Szostaczuk N, Priego T, Palou M, Palou A, Picó C. Oral leptin supplementation throughout lactation in rats prevents later metabolic alterations caused by gestational calorie restriction. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(3):360-71.
150. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes.* 2001;50(2):227-32.
151. Lin CH, Correia L, Tolia K, Gesell MS, Tolia V, Lee PC, Luk GD. Early weaning induces jejunal ornithine decarboxylase and cell proliferation in neonatal rats. *J Nutr.* 1998;128:1636-42.
152. Hallam MC, Reimer RA. Impact of Diet Composition in Adult Offspring is Dependent on Maternal Diet during Pregnancy and Lactation in Rats. *Nutrients.* 2016;8(1).
153. Lee S, You YA, Kwon EJ, Jung SC, Jo I, Kim YJ. Maternal Food Restriction during Pregnancy and Lactation Adversely Affect Hepatic Growth

and Lipid Metabolism in Three-Week-Old Rat Offspring. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).

154. Velkoska E, Cole TJ, Dean RG, Burrell LM, Morris MJ. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *J Nutr.* 2008;138(9):1622-7.

155. Gayle DA, Desai M, Casillas E, Beloosesky R, Ross MG. Gender-specific orexigenic and anorexigenic mechanisms in rats. *Life Sci.* 2006;79(16):1531-1536.

156. Simões C. Proliferação, diferenciação, maturação e migração de populações celulares do epitélio gástrico do rato durante o primeiro mês de vida. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1992.

157. Ackerman SH. Early life events and peptic ulcer susceptibility: an experimental model. *Brain Res Bull.* 1980;5 Suppl 1:43-9.

158. Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Age at maternal separation and gastric erosion susceptibility in the rat. *Psychosom Med.* 1975;37(2):180-4.

159. Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Predisposition to gastric erosions in the rat: behavioral and nutritional effects of early maternal separation. *Gastroenterology.* 1978;75(4):649-54.

160. Tsukahara T, Inoue R, Yamada K, Yajima T. A mouse model study for the villous atrophy of the early weaning piglets. *J Vet Med Sci.* 2010;72(2):241-244.

161. Marion J, Petersen YM, Romé V, Thomas F, Sangild PT, Le Dividich J, Le Huërou-Luron I. Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(4):401-410.

162. Bullough WS. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1962;37:307-342.

163. Garofano A, Czernichow P, Bréant B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia.* 1998;41(9):1114-1120.

164. Godoy MA, Souza AS, Lobo MA, Sampaio OV, Moraes L, Baldanza MR, Magri TP, Wernerck de Castro JP, Tavares do Carmo Md, Soares-Mota M, Rocha MS, Mendez-Otero R, Santiago MF. Effects of protein restriction during gestation and lactation on cell proliferation in the hippocampus and subventricular zone: functional implications. Protein restriction alters hippocampal/SVZ cell proliferation. *Brain Res.* 2013;1496:10-27.

165. Pérez-García G, Guzmán-Quevedo O, Aragão RS, Bolaños-Jiménez F. Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Sci Rep.* 2016;17(6):21275.
166. Kasai A, Gama P, Alvares EP. Protein restriction inhibits gastric cell proliferation during rat postnatal growth in parallel to ghrelin changes. *Nutrition.* 2012;28(6):707-712.
167. Nakajima T, Konda Y, Izumi Y, Kanai M, Hayashi N, Chiba T, Takeuchi T. Gastrin stimulates the growth of gastric pit cell precursors by inducing its own receptors. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2002;282(2):G359-G366.
168. Liu L, Turner JR, Yu Y, Khan AJ, Jaszewski R, Fligel SE, Majumdar AP. Differential expression of EGFR during early reparative phase of the gastric mucosa between young and aged rats. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):G943-950.
169. Moore BD, Khurana SS, Huh WJ, Mills JC. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  is required for cell differentiation and homeostasis in the adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311(2):G267-75.
170. Tanaka T, Yasunami S, Ohtani K, Nakano J, Tani S. Regulation of gastric mucosal pepsinogen and intrinsic factor contents, and their m RNA levels during starvation and refeeding in rats. *Biol Pharm Bull.* 1999;22(12):1293-5.
171. Yokhana JS, Parkinson G, Frankel TL. Effect of insoluble fiber supplementation applied at different ages on digestive organ weight and digestive enzymes of layer-strain poultry. *Poultry Science.* 2015,00:1-10.