

Aspectos morfológicos do estômago de ratos submetidos ao desmame precoce

Morphological aspects of the stomach of rats submitted to early weaning

DOI:10.34119/bjhrv3n5-200

Recebimento dos originais: 08/09/2020

Aceitação para publicação: 05/10/2020

Mércia Maria Bezerra Barbosa

Mestre em Morfotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/N - Alto José Leal, Vitória de Santo Antão – PE

E-mail: merciambarbosa@hotmail.com

Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Doutorado em Estomatopatologia pela Universidade Estadual de Campinas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/N - Alto José Leal, Vitória de Santo Antão – PE

E-mail: famanajas@yahoo.com.br

Carina Scanoni Maia

Doutorado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Da Engenharia, S/N - Cidade Universitária, Recife -PE

E-mail: carina.scanoni@gmail.com

Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório

Doutorado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco Instituição:

Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Da Engenharia, S/N - Cidade Universitária, Recife -PE

E-mail: fcas14@hotmail.com

Lisiane dos Santos Oliveira

Doutorado em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/N - Alto José Leal, Vitória de Santo Antão – PE

E-mail: lisianenutricao@yahoo.com.br

Juliana Pinto de Medeiros

Doutorado em Ciência Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Da Engenharia, S/N - Cidade Universitária, Recife -PE

E-mail:jupinto2@gmail.com

RESUMO

Objetivo: o objetivo desse trabalho foi de identificar se o desmame precoce é capaz de ocasionar alterações morfológicas no tecido gástrico de ratos wistar. **Método:** Foram divididos os filhotes de ratos em dois grupos, Grupo Desmame (n=6) e Grupo Controle (n=6). O Grupo Desmame foi desmamado no 15º dia de vida por separação materna, enquanto o Grupo Controle permaneceu com suas mães amamentando. Com 90 dias, os grupos foram submetidos a eutanásia e em seguida a retirada do estômago para o processamento histológico. As lâminas foram fotomicrografadas e analisadas. **Resultado:** Os dados mostraram que o desmame precoce aumenta a área da mucosa, aumentando assim a área das glândulas e da muscular da mucosa, com isso aumenta também a acidez estomacal. Também observamos que o desmame diminuiu a área da muscular longitudinal e submucosa, fazendo com que o organismo sofra adaptações para o funcionamento. Mostrando assim os riscos que o desmame precoce pode ocasionar a saúde.

Palavras chaves: Estômago, Desmame precoce, Aleitamento, Histologia, Ratos.

ABSTRACT

Objective: the objective of this study was to identify whether early weaning is capable of causing morphological changes in the gastric tissue of wistar rats. **Method:** We divided the puppies of rats into two groups, Weaning Group (n = 6) and Control Group (n = 6). The Weaning Group was weaned on the 15th day of life by maternal separation, while the Control Group remained with their mothers breastfeeding. After 90 days, the groups were euthanized and then removed from the stomach for histological processing. The slides were photomicrographed and analyzed. **Result:** The data showed that early weaning increases the area of the mucosa, thus increasing the area of the glands and the muscle of the mucosa, thereby increasing stomach acidity. We also observed that weaning reduced the area of the longitudinal and submucosa muscle, causing the body to undergo adaptations for its functioning. Thus showing the risks that early weaning can cause health.

Key words: Stomach, Early weaning, Lactation, Histology, Rats.

1 INTRODUÇÃO

O desmame precoce é a substituição repentina do aleitamento materno pelo alimento sólido. Já o desmame natural é a substituição gradativa entre esses. O aleitamento materno é responsável pela nutrição do filhote após o nascimento. Indiscutivelmente é considerado alimento completo, pois é a principal fonte de nutrientes, carboidratos, lipídeos e proteínas que acompanha as necessidades do organismo durante o desenvolvimento, (Azara, Maia *et al.*, 2008) tão completo que também é fonte de água, e fatores de proteção contra infecções, estando isento de contaminação (Ministério da Saúde, 2002). Além disso, é durante a lactação que ocorre o desenvolvimento neurocomportamental onde há uma forte interação mãe-filho nesse processo (Liu *et al.*, 2000). Sendo o período da amamentação considerado um período crítico no desenvolvimento do organismo (Plaut e Davis, 1972).

Por isso o desmame precoce é considerado um problema de saúde pública, pois está incluso em um dos precursores no aumento da taxa de mortalidade e morbidade neonatal e infantil (Ministério da Saúde, 2009). Pesquisas apontam que se o aleitamento materno fosse aplicado em escala global, estima-se que a cada ano diminuiria cerca de 823.000 mortes em crianças menores de 5 anos de idade (Victora, 2016).

As crianças que são desmamadas precocemente podem correr o risco de adquirir diversas doenças, como infecções respiratórias, alterações cardiovasculares, má desenvolvimento neuronal, diarreias recorrentes, obesidade/sobrepeso (Horta, 2013; Wong, 2018; Kikusui, Kiyokawa *et al.*, 2007; Horta 2015).

Diante essas características a Organização Mundial da Saúde (OMS), aconselha o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida, após esse período recomenda o aleitamento materno associado a outros componentes alimentares até no mínimo dois anos de idade (World Health Organization, 2003).

Embora a população tenha o conhecimento básico acerca dos benefícios do leite materno para o filho, ainda encontram-se resistentes ao aleitamento. Observa-se que uma parcela de mulheres não seguem essas orientações por motivos distintos, sejam psicossociais ou sociodemográficos. Algumas mulheres trabalham para ajudar ou sustentar a renda da casa, e precisam retornar ao emprego. Porém, de acordo com o Ministério do Trabalho a licença maternidade concedida a empresas privadas são de apenas 120 dias, fazendo com que a mãe volte ao trabalho no 4º mês, dificultando o aleitamento materno exclusivo nos outros dois meses (Azevedo, 2010).

Além disso, estudos apontam outros motivos para o abandono do aleitamento como depressão pós-parto, níveis baixos de educação materna, falta de apoio e assistência por parte de familiares nos cuidados infantis e insuficiente orientação acerca da amamentação no pós-parto (Machado, 2014).

Desta feita, observa-se a necessidade na ampliação da conscientização do aleitamento materno e ampliação do conhecimento em relação aos riscos que o desmame precoce pode ocasionar. Alguns riscos ainda são desconhecidos, não se sabe ao certo quais efeitos que o desmame precoce pode ocasionar em diferentes Sistemas na vida adulta. Como por exemplo, no Sistema Digestório, sobre quais as modificações e alterações que desmame precoce poderia acarretar no estômago, um dos principais órgãos da digestão.

Para investigação de pesquisas como essas, faz-se a importância da utilização de ratos wistar como modelos experimentais devido à semelhança entre a fisiologia humana. Nos roedores o processo de transição até o desmame inicia-se após a segunda semana de vida, onde a partir do 14º dia de vida dá se o consumo de alimentos sólidos, porém o aleitamento ainda é a preferência alimentar dos ratos até a terceira semana de vida. No final da terceira semana de vida o desmame espontâneo acontece e o consumo de leite cessa por volta do 30º dia de vida (Hahn e Koldovsky, 1966; Krecek e Kreckova, 1957; Henning, 1981).

Quanto à morfologia, o estômago de ratos Wistar (*Rattus navegiiçus*) é uma dilatação do tubo digestório, localizado na porção esquerda da cavidade abdominal entre o esôfago e intestino, encontra-se caudal ao fígado, em forma de C. Histologicamente o estômago está estruturado em duas regiões: córnea, antropilórica. Na porção córnea que é continua ao esôfago apresenta epitélio estratificado e queratinizado, na porção antropilórica possui um epitélio com presença de glândulas tubulares na mucosa (Bertassoliet al.2013; Lee *et al*, 1982). Essas porções são delimitadas internamente por uma prega evidenciada na superfície da mucosa de ambas as faces do estômago, que é chamada de “prega limitante”, fazendo a divisão do estômago aglandular e estômago glandular (Oliveira, 2000). Na porção glandular encontramos quatro camadas que compõe a parede do estômago: Mucosa, Submucosa, Muscular (Muscular oblíqua, muscular circular e muscular longitudinal) e Serosa. A Mucosa Gástrica é revestida por um tecido epitelial cúbico simples que sofre invaginações formando as fossetas gástricas. Nelas desembocam secreções das glândulas gástricas ramificadas. Além disso, entre a mucosa e a submucosa encontramos uma camada da muscular da mucosa (Junqueira, Carneiro, 2008).

O desenvolvimento dessa mucosa gástrica é controlado por hormônios, fatores de crescimento e também pelo comportamento alimentar. Pesquisas mostraram que o desmame

precoce aumenta a proliferação e diferenciação nas células mucosas, considerada como marcadoras da maturação do epitélio gástrico de ratos (Ozaki, 2010). Além disso, com a rápida transição alimentar do desmame precoce e separação do cuidado parental aumenta a suscetibilidade a erosões gástricas, assim como também são mais susceptíveis a ocorrência de lesões ulcerativas profundas (Ackerman, 1978; Glavin, Pare, 1985). Mas gostaríamos de investigar se a mucosa gástrica é alterada em ratos que foram desmamados precocemente e se essas alterações podem ou não persistir na vida adulta, trazendo assim modificações nas funções gástricas dos indivíduos. Nosso objetivo foi identificar se o desmame precoce é capaz de ocasionar alterações morfológicas no tecido gástrico de ratos wistar.

Acreditamos que nossa pesquisa possa auxiliar na ampliação do conhecimento científico sobre os efeitos do desmame precoce favorecendo uma maior fonte bibliográfica para estudos futuros. Além do mais poderá fornecer mais dados para a conscientização da importância do aleitamento materno para sociedade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE com número de processo: 23076.015456/2017-42

Foram utilizadas 12 ratas da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar com 90 dias de idade com peso entre 280 e 300g que foram obtidos do biotério do Departamento de Nutrição- Universidade Federal de Pernambuco.

As ratas permaneceram mantidas no Biotério de experimentação dentro de gaiolas de polipropileno (com dimensões de 40cmx50cmx20cm) armazenadas em salas sob condições padronizadas de laboratório luminosidade de 60 lux e ciclo circadiano de 12 horas em período claro e 12 horas em período escuro), temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($45\% \pm 5\%$), sistema de exaustão com renovação de ar. Durante 15 dias para adaptação os animais foram alimentados com a ração padrão do biotério, Presence da Purina do Brasil e água *ad libitum*.

Ao término dos 15 dias de adaptação, as fêmeas foram acasaladas com ratos adultos, na proporção de um macho para duas fêmeas. Para diagnosticar que fêmea ficou grávida foi realizado o esfregaço vaginal na manhã seguinte do acasalamento, associada à observação da presença de espermatozoide agregado ao ganho de peso corpóreo. Ao ser observado a presença do espermatozoide, a fêmea considerada que estava prenhe sendo este dia considerado o 1º dia de

prenhez (Lankas, Minsker, Robertson, 1989). Em seguida elas foram isoladas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes. Um dia após o nascimento, todos os filhotes nascidos no mesmo dia foram randomizados e separados para cada mãe.

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com a idade do desmame: Grupo I- Ratos Controle: os filhotes foram desmamados por separação materna no 30° dia de vida (n=6); Grupo II- Ratos Desmame Precoce: os filhotes foram desmamados por separação materna no 15° dia de vida (n=6). Todos os experimentos seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Ao final do experimento, aos 90 dias de vida dos ratos, tanto os animais do grupo controle quanto o grupo desmame foram submetidos à anestesia dissociativa a base de cloridrato de Cetamina (C)+ xilazina (X) na dose de 60-95mg/Kg(C) +5-10 mg/Kg (X) IP para anestesia cirúrgica. Em seguida foi feita a preparação para perfusão com 4% de paraformaldeído em 4% de boráx, pH7,4, em 4°C. Após a perfusão foi feita um abertura na cavidade abdominal para a coleta do estômago e armazenamento em formol tamponado a 10% por 24 horas. Foi retirado fragmentos do estômago a altura do piloro.

Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em soluções de álcool etílico com concentrações crescentes de 70, 80, 90 e 100%, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59 °C e incluídos em parafina histológica purificada (PF 56-58°C). Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo, ajustado para 5 micrômetros (µm). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina, e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C durante 24 horas, para secagem e colagem, e em seguida corados pela Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram analisadas em Microscópio de Luz e os cortes, fotografados em Microscópio Biológico Trinocular Nikon 50E com videomicroscopia VT 480 com objetiva de 4x, e objetiva de 10x. As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ para análise quantitativa dos dados.

Nas fotomicrografias no aumento de 40x foi demarcada a área da mucosa gástrica, da submucosa, da muscular, sendo a Camada muscular divididas em área da Muscular oblíqua e circular e a área da muscular longitudinal por questões de visualização (Figura1A). Essas fotos tinha uma escala padrão associada ao programa ImageJ onde a Distance in Pixels foi de 625, Know Distance de 0.6, Pixel Aspect Ratio 1.0 e a unidade de medida em milímetros (mm). Já as fotomicrografias no aumento de 100x foram demarcadas a área das Fossetas gástricas, das

Glândulas gástricas e da Muscular da mucosa (Figura 1B). Utilizando também escala padrão para cada foto, sendo a Distance in Pixels foi de 403, Know Distance de 150, Pixel Aspect Ratio 1.0 e a unidade de medida em micrometros (μm).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estatísticos são descritos como mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism para análise de normalidade e significância estatística. Após o teste de normalidade de X foi escolhido o teste não paramétrico de Mann Whiteny para comparação entre amostras. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são descritos em função dos achados observados ao final do experimento, onde observamos que na avaliação morfológica do estômago a área da mucosa gástrica no Grupo Desmame foi 1,108mm, apresentando-se maior em relação à do Grupo Controle, 1,019mm. Sendo estatisticamente significativo, com o $p=0,0043$ como mostrado no Gráfico 1a.

Já a respeito da área da submucosa observou-se que no Grupo Desmame foi 0,066mm, sendo menor que a área no Grupo Controle, 0,0765mm. Também sendo estatisticamente significativo com $p=0,0014$ (Gráfico 1b).

Quanto à área muscular, mais especificamente a junção das áreas muscular oblíqua e muscular circular não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Sendo o Grupo Desmame com 0,257mm e o Grupo controle com 0,249mm e $p=0,4596$ (Gráfico 1c). Enquanto a área da Muscular Longitudinal apresentou um aumento no Grupo Controle com 0,05mm, em relação à do Grupo Desmame com 0,064mm, sendo esse aumento altamente significativo com $p=0,0002$ como representado no Gráfico 1d.

No que se refere à área das Fossetas Gástricas, não houve diferença significativa entre os grupos, com p valor maior que 0,05. O Grupo Desmame apresentou área de 57414 μm e o grupo Controle com área de 57588 μm (Gráfico 2a).

Com relação à área das glândulas gástricas o Grupo Desmame apresentou um aumento em relação ao Controle. Sendo a área de 224025 μm no Grupo Desmame e 190902 μm no Grupo Controle. Considerando um resultado altamente significativo com valor de $p=0,0004$ (Gráfico 2b).

No que concerne à área da Muscular da Mucosa, o Grupo Desmame também mostrou-se significativamente maior em relação ao Grupo Controle. Com 19880 μ m na área muscular da mucosa no Grupo Desmame e 17768 μ m no Grupo Controle. O p valor foi de 0,0009 sendo altamente significativo (Gráfico2c).

Gráfico 1: Área em mm da (a)Mucosa, (b)Submucosa, (c) Muscular oblíqua e circular, (d)Muscular longitudinal do estômago de ratos.

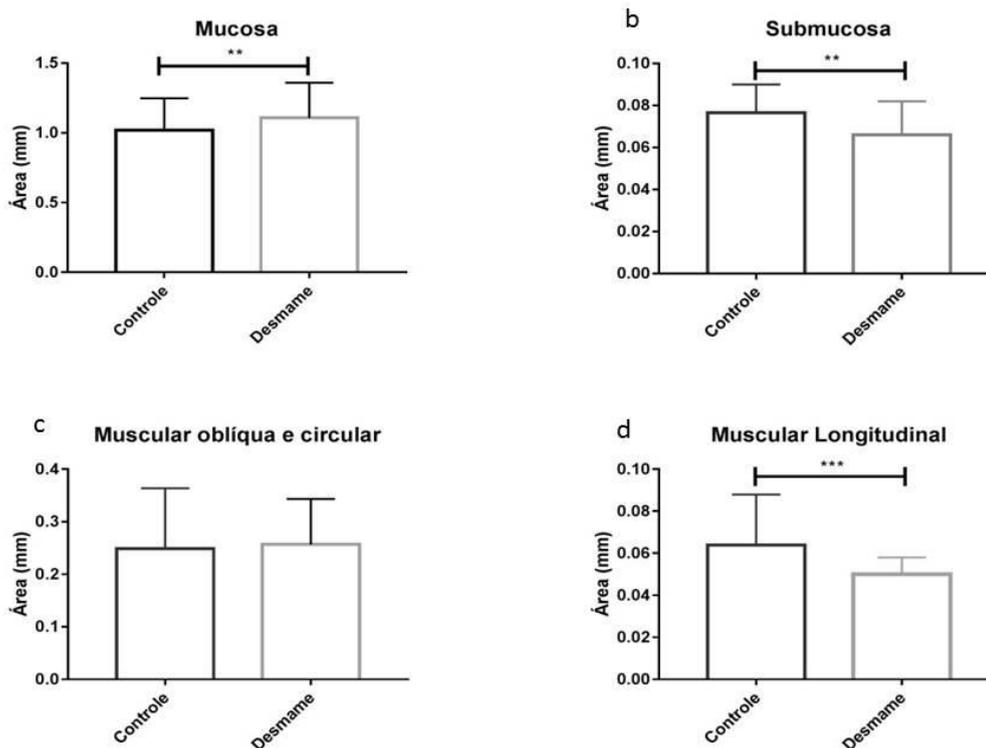
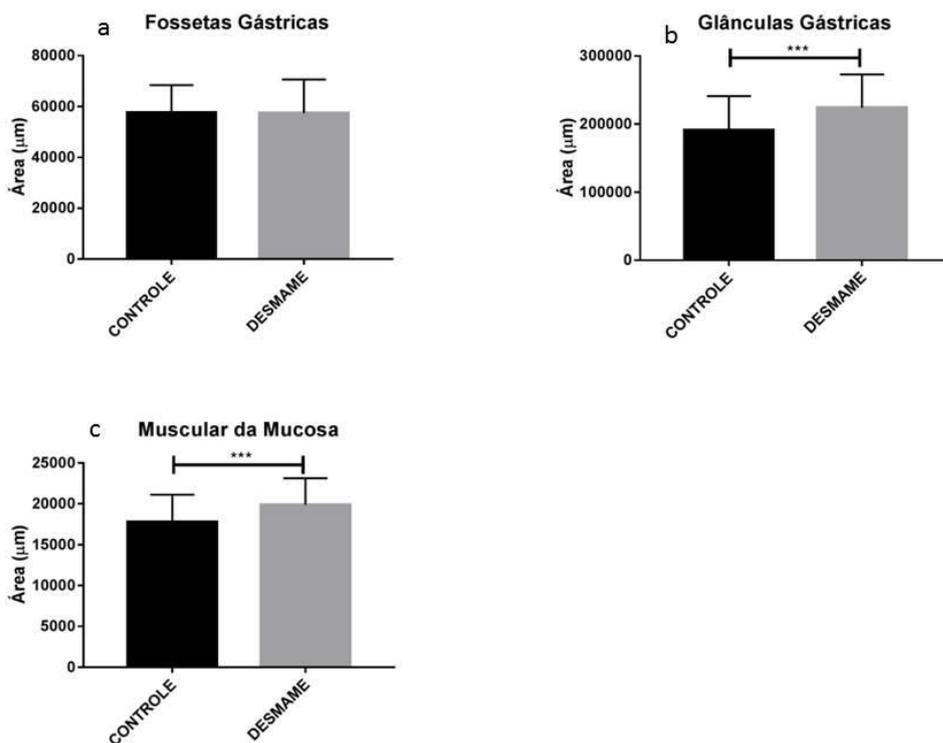


Gráfico 2: Área em micrômetros das (a) fossetas gástricas, (b) glândulas gástricas e (c) Muscular da Mucosa de ratos.



4 DISCUSSÃO

Os animais do grupo experimental que foram desmamados precocemente por separação materna ao 15º dia de vida apresentaram uma maior área da mucosa comparada a do grupo Controle. Como mostrado nos resultados esse aumento da mucosa esta de acordo com o aumento de suas camadas, área das glândulas gástricas e área da muscular da mucosa.

Alguns achados bibliográficos comentam que o desmame precoce tem um forte impacto no crescimento e maturação das células mucosas. Osaki, 2009, ao avaliar o possível papel de TGF α (Fator de Crescimento Transformante) secretado no estômago, que se liga ao receptor EGFR (Fator de Crescimento Epidérmico), pode controlar tanto a proliferação, diferenciação e crescimento epidérmico. Ele viu que ao 17º dia houve um aumento pronunciado em células mucosas do colo no grupo que foi desmamado precocemente em relação ao grupo controle. Encontrou também a confirmação através de RT-PCR para mucina6. Os resultados mostraram que os níveis de mRNA de mucina 6 foram maiores para o Grupo Desmame confrontados ao grupo controle. Estas células mucosas encontradas na glândula gástrica tem por função secretar muco que será levado até a superfície. Porém o tipo de mucina secretada por tais é diferente das células mucosas superficiais, uma vez que essa mucina também tem propriedades antibióticas (Junqueira, Carneiro, 2008).

Outro estudo com relação ao crescimento da mucosa gástrica em ratos desmamados precocemente foi evidenciado por Lin *et al*, em 2001, ele associou o crescimento da mucosa com a indução da atividade da enzima Ornitina Descarboxilase Gástrica (ODC). Observando que a atividade da ODC teve um aumento considerável nos dias 1, 3 e 6 logo em seguida ao desmame. Sendo três vezes maior que o primeiro dia quando comparado aos controles. Mostrando assim que o desmame precoce induz a atividade da ODC, que pode atuar como marcador inicial no crescimento da mucosa gástrica quando submetidos ao desmame precoce.

Foi observado também que o desmame precoce atua na proliferação de certos tipos celulares na mucosa gástrica. Conforme Jacobs et al., 1984, mostra que o desmame precoce atua aumentando a proliferação de células parietais e células zimogênicas. Se ocorre um aumento dessas células ocorrerá também um aumento de suas respectivas secreções. As células parietais secretam ácido clorídrico no lúmen do estômago, já as células zimogênicas secretam a enzima inativa pepsinogênio, que ao ser secretada no meio ácido é convertida na enzima proteolítica pepsina. (Junqueira, Carneiro, 2008).

Alguns dessas pesquisas foram realizadas para avaliação dos efeitos do desmame precoce logo em seguida ao experimento, com o rato ainda jovem, mas vale salientar que esses efeitos podem perdurar para a vida adulta. Conforme Zulian (2017), ao submeter os ratos ao desmame precoce observou que ocorreu uma alteração na atividade do hormônio corticosterona nos ratos, persistindo na vida adulta, mudando a maturação e reprogramando as funções celulares.

Quanto à área das fossetas gástricas, elas também pertencem à mucosa gástrica, porém ao analisá-la observamos que não houve aumento, como nas outras camadas. É importante salientar que as células das fossetas gástricas possuem uma renovação celular mais frequente. Essa renovação se dá por células-tronco que são encontradas na região do istmo das glândulas gástricas. Essas células indiferenciadas no istmo são fonte de todas as outras células da mucosa, tendo uma renovação celular bidirecional. Na direção basal da mucosa a renovação celular é mais lenta e renova até as células mais profundas das glândulas e podem durar semanas. Diferentemente da renovação celular em direção apical para as células superficiais presentes nas fossetas gástricas. Esta renovação é muito mais rápida, que pode variar entre 3 a 5 dias. Isso se dá devido o fato que as células das fossetas gástricas são desgastadas pelo ácido, enzimas e conteúdo luminal, tendo a necessidade de serem renovadas com maior frequência, de acordo com Junqueira, Carneiro, 2008; Corpron, 1966 e Mills, 2011. Portanto se ocorreu alguma alteração nas áreas das fossetas com os ratos ainda jovens essas alterações não persistem com o tempo devido sua rápida renovação celular.

Já com respeito às camadas musculares, observamos que as camadas oblíqua e circular, não apresentaram diferenças na área entre os grupos, exceto a camada muscular longitudinal, em que grupo desmame apresentou uma diminuição de sua área em relação ao do grupo controle. Mas como mostra a literatura essas camadas unidas formam a espessa camada muscular que envolve o estômago, com a função de induzir a mistura mecânica auxiliando na quebra dos alimentos. Vale salientar que naturalmente a camada longitudinal externa é a mais delgada entre elas (Clebis et al., 2004). Portanto o organismo pode sofrer adaptações para suprir a ação muscular desta, utilizando mais intensamente a ação das outras camadas musculares que inclusive são mais espessas.

Em um trabalho onde também se estudou o desmame precoce, foi possível observar que no décimo quinto dia de vida, o desmame precoce promoveu alterações morfológicas e morfométricas em órgãos importantes do sistema cardiovascular, tanto aumentando o número de cardiomiócitos como reduzindo a espessura vascular da artéria aorta (Xavier, 2020).

5 CONCLUSÃO

O desmame precoce promove alterações morfológicas no estômago de ratos, que pode aumentar a produção de componentes ácidos e enzimas que são secretadas para o interior do estômago, aumentando assim a acidez estomacal.

Salientamos que o aleitamento materno é grande importância para o desenvolvimento e maturação do estômago. Sendo assim, mais um dos fatores para o conhecimento e conscientização da população acerca dos riscos do desmame precoce para a saúde.

REFERÊNCIAS

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

Azara, C. R., I. C. Maia, *et al.* Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. *Biol Res*, v.41, n.3, p.317-30.2008.

Azevedo DS, Reis ACS, Freitas LV, Costa PB, Pinheiro PNC, Damasceno AKC. Conhecimento de primíparas sobre os benefícios do aleitamento materno. *Rev RENE*. 2010; 11 (2): 53-62.

Bertassoli, B.M.; Lessa, T.B; Santos, A.C.; Oliveira, D.M.; Feder, D.; Abrósio, C.E.; Neto, A.C.A. Análise morfológica do estômago de camundongos distróficos “*mdx*”. *REDVET- Revista electrónica de Veterinaria*. V. 14, N.4, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313.html>(2013)

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.

Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect Victora C.G., Bahl R., Barros A.J.D., Franca G.V.A., Horton S., Krasevec J., Murch S., (...), Richter L.(2016) *The Lancet*, 387 (10017) , pp. 475-490.

Clebis, N. K. et al. Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mientéricos da região aglandular do estômago de ratos com diabetes melitus induzido por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico. *Arq. Cien. Saúde, Umuarama*, p. 87-93, maio/ago. 2004.

Corpron RE. The ultrastructure of the gastric mucosa in normal and hypophysectomized rats *Am J Anat*. 1966 janeiro; 118 (1): 53-90.

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

Hahn, P.E.O. Koldovsky. Utilization of nutrients during postnatal development. Pergamon Press, Oxford. (1966)

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

Horta BL, Victora CG. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review of the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. Geneva: World Health Organization, 2013. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95585/1/9789241506120_eng.pdf?ua=1

Horta BL, de Mola CL, Victora CG. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure, and type-2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr Suppl*. 2015; 104: 30-37. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apa.13133/epdf>

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.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. Histologia Básica. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.291-300

.Kikusui, T.; Kiyokawa, Y.; Mori, Y. Deprivation of mother–pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **brain research**, v.1133, p.115–122, (2007).

Kreckek, J. E J. Kreckova. Development of control of water metabolism. III. Preference in water and milk selection by young rats. **CeskFysiol**, v.6, n.1, p.14-21. (1957)

LANKAS, G. R.; MINSKER, D. H.; ROBERTSON, R. T. Effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 27, p. 523-529, 1989.

Lee E.R.; 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. Jul;164(3):187-207. (1982)

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.

Liu, D.; Diorio, J.; Day, J.C.; Francis, D.D.; Meaney, M.J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Natural Neuroscience*, v.3, p. 799-806, 2000.

Machado, MCM, Assis, KF, Oliveira, F. de CC, Ribeiro, AQ, Araújo, RMA, Cury, AF; Franceschini, S. do CC (2014). Determinantes do abandono exclusivo da amamentação: fatores psicossociais. *Revista de Saúde Pública*, 48 (6), 985-994. <http://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005340>

Mills JC, Shivdasani RA. Gastric Epithelial Stem Cells. *Gastroenterology*. 2011; 140(2):412-424. doi:10.1053.

Ministério da Saude, 10 passos pra uma alimentação saudável. Guia alimentar para crianças brasileiras e Distrito Federal. Brasília-DF; 2002

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009.

Oliveira, L.R.; Molinari, S.L.; Pereira, M.A.S; Miranda-NETO, M.H.; Santana, D.M.G. Localização dos neurônios mientéricos no estômago aglandular e glândular de ratos (*Rattusnorvegicus*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 4 (3):215-220, 2000.

Osaki LH, MA Curi , EP Alvares , *et al.* Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: Possible role of TGF α /EGFR *Diferenciação* , 79 (2010) , pp. 48 - 56

Plaut, S. M.; Davis J.M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. *Physiological Behaviour*, v.8, n.1, p.43-51, 1972.

Victora C.G., Bahl R., Barros A.J.D., Franca G.V.A., Horton S., Krasevec J., Murch S., (...), Richter L. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect (2016) *The Lancet*, 387 (10017), pp. 475-490.

Wong, Peter D; Anderson, Laura N; Dai, David D W; Parkin, Patricia C; Maguire, Jonathan L; Birken, Catherine S.; TARGET Kids! Collaboration J Pediatr; The Association of Breastfeeding Duration and Early Childhood Cardiometabolic Risk. *192: 80-85.e1, 2018 Jan.* Article in English | MEDLINE | ID: mdl-29246362

World Health Organization; Global strategy for infant and young child feeding. Geneva 2003 (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42590/1/9241562218.pdf>).

Xavier, J. E; Miguel, R. D. S.; Santos, A. J. C. S. A; Lima, M. N. G; Silva, R. V. A. S; Santos, I. N. C.; Maia, C. S; Tenório, F. C. A. M; Júnior, F. C. A. A; Souza, S. L.; Oliveira, L. S; Medeiros, J. P. Estudos morfológico e morfométrico do coração e da artéria aorta em ratos adultos desmamados precocemente. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 10696-10711 jul./aug. 2020.

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 31 de março; 7: 45867. doi: 10.1038 / srep45867.