



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA - PPGM

MÉRCIA MARIA BEZERRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA GÁSTRICA E INTESTINAL
EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Recife
2019

MÉRCIA MARIA BEZERRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA GÁSTRICA E INTESTINAL
EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lisiane dos Santos Oliveira

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Barbosa, Mércia Maria Bezerra

Avaliação histomorfométrica da mucosa gástrica e intestinal em ratos *Wistar* submetidos ao desmame precoce / Mércia Maria Bezerra Barbosa- 2019

45 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Juliana Pinto de Medeiros

Coorientadora: Lisiane dos Santos Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Morfofotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo

1. Desmame precoce 2. Estômago 3. Ratos I. Medeiros, Juliana Pinto (orient.) II. Oliveira, Lisiane dos Santos (coorient.) III. Título

573.679

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-193

MÉRCIA MARIA BEZERRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA GÁSTRICA E INTESTINAL
EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Carolina Peixoto Magalhães (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico à minha estimada Mãe, Maria de Lourdes; aos meus queridos irmãos, Márcia e Felipe e ao meu amado esposo, Hugo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Jeová Deus, que é digno de receber toda honra e glória. Sou extremamente grata pela dádiva da vida e por suprir minhas necessidades, embora não seja merecedora. E que me ajudou na realização de cada etapa desta pesquisa me dando saúde, força de vontade, paciência e persistência.

À minha estimada mãe, Maria de Lourdes, que mesmo diante tantas dificuldades com o trágico falecimento do meu querido pai logo bem cedo, me deu a melhor educação, amor e carinho e tudo o que precisava nos momentos certos. Me ajudando nas horas mais difíceis e me incentivando a dar o meu melhor a cada dia.

Ao meu amado esposo, Hugo, que está sempre comigo, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, cuidando muito bem de mim, me dando encorajamento suficiente para continuar na caminhada da vida e por acreditar no meu potencial.

À minha cara irmã, Márcia, que estava sempre pronta para me auxiliar no que fosse preciso, e estar ao lado nos momentos de choro e de alegria, uma ajudando a outra como verdadeiras irmãs.

Ao meu querido irmão, Felipe, que demonstrou seu amor, cuidado e proteção por mim de um jeito único de ser.

A todos os meus familiares que torceram por meu sucesso e que me estimularam a alcançar meus objetivos pessoais e profissionais, minha avó, meus tios e tias e queridos primos.

Aos meus prezados amigos que contribuíram para minha alegria pessoal e me deram forças necessárias para diminuir o peso das ansiedades com maravilhosa companhia e altas risadas.

À Emerson Xavier, que me ajudou a não desistir da vida acadêmica, que sempre me incentivou a continuar mesmo quando eu não conseguia. Foi por meio dele que tive a oportunidade de realizar essa pesquisa no mestrado. Além disso, me incentivou a não desistir do meu sonho de ser professora de Anatomia.

À Raphael Danillo por todo apoio e orientação para finalização deste trabalho.

À professora Juliana Pinto, minha orientadora, pela oportunidade e confiança para realização dessa pesquisa, compreensão e paciência durante todo o mestrado. Pela ética e postura profissional.

À professora Lisiane Oliveira, minha co-orientadora, por sua valiosa contribuição e auxílio no esclarecimento de dúvidas e questões do estudo, pela atenção e dedicação quando tanto precisava.

Ao professor Francisco Amanajás, que aceitou prontamente de grande coração ser um colaborador da pesquisa. Agradeço imensamente pelas orientações prestadas, e contribuições dadas na qualificação. Sua ajuda foi fundamental para realização prática e finalização deste trabalho. Admiro sua ética profissional e acima de tudo sua disposição em ajudar quando precisa. Sou extremamente grata ao senhor.

Aos professores que aceitaram o convite para participarem com examinadores da banca de qualificação e de defesa, por terem tirado de seu precioso tempo algumas horas para contribuir nessa pesquisa. Muito obrigada professores, Luíz Lucio, Francisco Amanajás, Sônia Leite, Luciana Maria, Ivone Antônia, Carol Peixoto.

À Gislainy Lemos, minha co-orientanda de TCC, que participou efetivamente na realização da pesquisa.

Aos colegas de classe do mestrado, que sempre prestavam ajuda um ao outro durante as disciplinas cursadas, aos momentos de alegria e diversão fazendo com que a jornada se tornasse menos cansativa.

Aos meus queridos companheiros de trabalho do CAV-UFPE. Aos técnicos do laboratório e amigos André Puckey, Ewerton e Zane, por todo auxílio prestado para realização deste trabalho. As professoras Ana Elisa, Carolina Peixoto, Lisiane Oliveira e Rosana Xavier, por serem compreensivas e incentivadoras, ajudando quando sempre precisávamos.

À professora Carolina Peixoto, que me incutiu o desejo de ser professora universitária, que me incentiva e auxilia a ser uma melhor profissional a cada dia, acreditando no meu potencial e por quem tenho tamanha admiração.

Às minhas amigas Priscila Virgíneo, Adriene Soares e Amanda Borges por suas contribuições valiosas na confecção da tese de dissertação, pelo incentivo e por me ajudar a acreditar que vai dar tudo certo.

A todos que contribuíram de alguma maneira para realização e finalização desse trabalho meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

RESUMO

O leite materno é o principal alimento para o desenvolvimento dos mamíferos no período neonatal. O desmame acontece com a redução do consumo de leite materno de forma gradativa e aumento do consumo de alimentos sólidos assumindo um padrão adulto de consumo alimentar. É considerado precoce quando ocorre a interrupção antecipada do acesso ao leite materno, impondo o mamífero á mudança no consumo alimentar, assumindo um padrão adulto precocemente. Pode desencadear alterações em vários sistemas orgânicos que podem ser imediatas ou duradouras. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tardios do desmame precoce através da histomorfometria do estômago e do intestino delgado de ratos Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Desmame Precoce (n=8) e Grupo Controle (n=8). O Grupo Desmame Precoce foi desmamado no 15º dia de vida por separação materna, enquanto o Grupo Controle no 30º dia de vida. Na idade adulta os animais foram eutanasiados e os órgãos passaram por processamento histológico e análises dos tecidos. Os resultados obtidos demonstraram que os animais do Grupo Desmame Precoce apresentaram proliferação celular no epitélio gástrico, com aumento na área das glândulas gástricas e da camada mucosa. Já no intestino delgado o desmame precoce provocou atrofia das criptas intestinais. Assim sendo, o desmame precoce é capaz de promover alterações tecido gástrico e intestinal que podem permanecer na vida adulta do animal.

PALAVRAS-CHAVE: Desmame Precoce. Estômago. Intestino Delgado. Ratos.

ABSTRACT

Breast milk is the main source of nutrients, proteins, lipids and growth factors for the development of the neonate. Early weaning is the termination of breastfeeding before the usual time which causes a number of consequences in different systems. In addition, early weaning contributes to the reduction of absolute brain mass, increased heart rate, systolic and diastolic blood pressure, obesity, and hypothyroidism. This present study approaches the evaluation of the late effects of early weaning on the histomorphometry of the stomach and small intestine of *Wistar* rats. The animals were divided into two different groups: Early Weaning Group (n = 8) and Control Group (n = 8). The Early Weaning Group was weaned on the 15th day of life due to maternal separation, while the Control Group was weaned only on the 30th day after birth. As the animals reached adulthood-at 100 days of life-they were euthanized and their organs submitted to histological processing and tissue analysis. The results showed that the animals of the Early Weaning Group presented cell proliferation in the gastric epithelium with an increase in the gastric and mucosal layers. Regarding the small intestine, the early weaning has led to intestinal crypts' atrophy. Hence, early weaning can promote lifelong changes related to the development and maturation in the gastric and intestinal tissue that may remain in the individuals life during adulthood.

KEY WORDS: Early Weaning. Stomach. Small Intestine. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Morfologia do estômago de ratos <i>Wistar</i> -----	19
Figura 2 –	Análise histomorfométrica do estômago e intestino delgado de ratos <i>Wistar</i> -----	28
Figura 3 –	Diferença morfológica do estômago e duodeno entre os grupos estudados-----	30
Tabela 1 –	Histomorfometria da porção antropilórica do estômago e do duodeno de ratos <i>Wistar</i> -----	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
CEUA	Comissão Ética ao Uso de Animais
ECL	Enterochromaffin-like
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
<i>et al.</i>	E outros
g	Gramas
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GC	Grupo Controle
GD	Grupo Desmame
HB-EGF	Fator de Crescimento Epidermal ligado à Heparina
HCL	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina & Heosina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IP	Administração Via Intraperitôneal
JPEG	Joint Photographics Experts Group
Kg	Quilograma
LDL	Low Density Lipoproteins “mau colesterol”
LGR5	Receptor acoplado à proteína G rico em Leucina5
LGR5 ^(+ve)	Receptor acoplado à proteína G rico em Leucina5 ligado células-tronco ^(+ve)
mg/Kg	Miligramas por Quilogramas
mL	Mililitro
n	Número de Ratos
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Graus Celsius
ODC	Enzima Ornitina Descarboxilase
p	Nível de Significância
PF	Parafina histológica purificada
pH	Potencial hidrogeniônico

PTH	Hormônio produzido pelas paratireóides-Paratormônio
®	Registrado
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa
&	Conjunção aditiva “e”
SPSS	Statistical Package for Social Science
TGF α	Fator de Crescimento Transformante Alfa
TGF- β 3	Fator de Crescimento Transformante Beta 3
μ m	Micrômetro
μ m ²	Micrômetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	13
2	REVISÃO DE LITERATURA -----	15
2.1	ALEITAMENTO MATERNO -----	15
2.2	DESMAME PRECOCE -----	17
2.3	ESTÔMAGO -----	18
2.4	INTESTINO DELGADO -----	21
3	OBJETIVOS -----	24
3.1	OBJETIVOS GERAIS -----	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	24
4	MÉTODOS -----	25
4.1	ASPÉCTOS ÉTICOS-----	25
4.2	ANIMAIS -----	25
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS -----	25
4.4	EUTANÁSIA -----	26
4.5	HISTOLOGIA -----	26
4.6	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA-----	27
4.6.1	Análise do Estômago (porção antro pilórica) -----	27
4.6.2	Análise do Intestino Delgado -----	28
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	28
5	RESULTADOS -----	29
5.1	ESTÔMAGO -----	29
5.2	INTESTINO DELGADO -----	30
6	DISCUSSÃO -----	31
7	CONCLUSÕES -----	34
	REFERÊNCIAS -----	35
	ANEXO A – (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS) -----	45

1 INTRODUÇÃO

Durante o período que compreende a gestação e lactação, diversos eventos moleculares e celulares estão em trâmite (BOCKHORST *et al.*, 2008; SEMPLE *et al.*, 2013). Dentre estes eventos está a proliferação e diferenciação neural com diferentes etapas de crescimento do sistema nervoso, que são vulneráveis a estímulos ambientais, esse período é denominado período crítico de desenvolvimento (ver LANGLEY-EVANS, 2006; KIKUSUI *et al.*, 2019). Os neurônios em desenvolvimento são sensíveis a estímulos do meio, adaptando-se a eles e podendo gerar um fenótipo comportamental patológico na vida adulta (BELLUSCIO *et al.*, 2016; KODAMA *et al.*, 2007; MOGI *et al.*, 2016; SUMNER *et al.*, 2008). Além disso, nesse período também é marcado pela maturação do sistema imune (CACHO; LAWRENCE, 2017).

Nos primeiros dias de vida, a amamentação é uma prática muito importante para o neonato, pois através dela é que a mãe oferta ao recém-nascido os nutrientes necessários para seu desenvolvimento biológico (PRENTICE *et al.*, 2016), e é imprescindível para ocorrer o desenvolvimento neurocomportamental normal da prole por meio da interação mãe-filhote (MOURLON *et al.*, 2010; LONGO *et al.*, 2018). De acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde, a amamentação deve ser realizada até o segundo ano de vida, devendo ser ofertada exclusivamente até o sexto mês. Entretanto, devido a fatores socioculturais diversos o tempo médio de amamentação vem reduzindo paulatinamente ao longo dos anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). A ação promovida pelo desmame precoce na vida adulta já vem sendo bastante analisada por estudos epidemiológicos (AZEVEDO, 2010; MACHADO, 2014; VICTORA, 2016, BITTKER, 2018). Entretanto, os eventos celulares responsáveis por essas modificações ainda estão sendo motivo de constantes pesquisas.

Para verificar os efeitos sistêmicos do desmame precoce, um dos modelos animais utilizados é o desmame por separação materna em ratos ou camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2011; YOUNES-RAPOZO *et al.*, 2012; FRAGA *et al.*, 2014). Em condições normais, ratos mamam até por volta do trigésimo dia de vida (CRAMER; THIELS; ALBERTS, 1990). Entretanto, em condições de biotério esse desmame é realizado no vigésimo primeiro dia. Para realizar o desmame precoce a mãe é retirada da gaiola no décimo quinto dia de vida pós-natal, e o animal passa a receber ração triturada como fonte de alimentação (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011), configurando uma mudança abrupta do padrão alimentar.

O desmame precoce por separação materna pode ser considerado não apenas uma agressão nutricional, mas também como um evento de estresse perinatal. Agressões nutricionais são bem conhecidas por promoverem modificações morfológicas tardias tanto no nível macroscópico

como no nível molecular (KIKUSUI et al., 2019; MIGUEL; OLIVEIRA; SOUZA, 2015). Além disso, o estresse perinatal promovido exclusivamente pela separação materna também é capaz de promover alterações tardias em modelos experimentais (PESSANHA; 2015, CORSI-ZUELLI, 2018).

No período que o desmame precoce acontece, diversos sistemas ainda estão sendo maturados, dentre eles o sistema digestório (HERBST; SUNSHINE, 1969; KOBARU; KITAMURA, 1988). Entre a quarta e sétima semana de vida pós-natal, a área se secção transversal do estômago tal como a altura da camada mucosa está sofrendo um aumento de cerca de cem por cento (KOBARU; KITAMURA, 1988). Eventos semelhantes ocorrem no intestino, onde a altura das vilosidades e a profundidade das criptas estão sofrendo um gradativo aumento entre o vigésimo e quadragésimo dia pós-natal (HERBST; SUNSHINE, 1969).

Em ratos, verificou-se que o desmame precoce aumenta a proliferação e diferenciação nas células mucosas, considerada como marcadoras da maturação do epitélio gástrico (OSAKI, 2010). Além disso, com a rápida transição alimentar do desmame precoce e separação do cuidado parental, aumenta ainda a suscetibilidade de erosões gástricas, ocorrência de lesões ulcerativas profundas, causando disfunção e malformação da barreira intestinal (GLAVIN, PARE, 1985; SMITH et al., 2010). Desta forma, é provável que a mudança rápida do padrão alimentar associado com o estresse da separação materna promovida pelo desmame precoce possa acarretar alterações morfológicas a longo prazo no intestino e no estômago de ratos, sendo este o foco central deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aleitamento Materno

O leite materno é o alimento natural fundamental no desenvolvimento do neonato, sendo a principal fonte de nutrientes, carboidratos, lipídeos e proteínas que acompanha as necessidades do organismo, (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; AZARA *et al.*, 2008; ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015), tão completo que também é fonte de água, fatores de proteção contra infecções e isento de contaminação (BALLARD, 2013, SILBERSTEIN, 2019). Nele contém fatores bioativos essenciais para o crescimento e desenvolvimento infantil (BZIKOWSKA-JURA, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Nos primeiros dias pós-parto as glândulas mamárias produzem colostro, um fluido que antecede o leite (SONG, 2013; BALLARD *et al.*, 2013; ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Esse líquido de coloração branco-amarelada, contém uma quantidade elevada de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (PENTTILA, 2010; GURGEL, 2018). Além de componentes anti-inflamatórios, imunoglobulinas IgA secretória, lisozima e lactoferrina que ao entrar em contato com o trato gastrointestinal do neonato, favorece proteção contra microrganismos patogênicos (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006; BALLARD *et al.*, 2013; BERNABUCCI *et al.*, 2013; LEGRAND, 2016).

Aos poucos o colostro adquire características finais do leite materno (BALLARD *et al.*, 2013; ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Na segunda e terceira semana pós-parto, é introduzido maiores concentrações de lactose ao colostro, e ao final da sexta semana o leite humano é considerado maduro, com aproximadamente 4,5 % de lipídeos, 1,0% de proteínas, 7,0% de carboidratos, 0,2% de minerais, além de hormônios, macrófagos, vitaminas, fatores de crescimento e citocinas (BALLARD *et al.*, 2013; GRIDNEVA *et al.*, 2016; BOQUIEN, 2018). Em ratos a transição do colostro para o leite materno continua com alta concentração de lipídeos, ácido palmítico, linoleico e oleico, e baixa concentração de carboidratos, diminuindo níveis de alguns minerais como cálcio, zinco, magnésio, além de fornecer fatores de crescimento epidermal (EGF), hormônios como corticosterona, leptina, prolactina e GH (KACSÓH, 1992, DVORÁK & KOLDOVSKÝ, 1994).

De acordo com Organização Mundial de Saúde é preconizado que o aleitamento materno exclusivo para crianças se estenda até os seis meses de vida, antes desse período o organismo do lactente não alcançou o desenvolvimento necessário para receber alimentos

semisólidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION,2003). Após o sexto mês ocorre o desenvolvimento de reflexos fundamentais para a deglutição, a erupção dos dentes, facilitando a mastigação, o desenvolvimento neuromuscular para a sustentação da cabeça, assim como o paladar esta ainda mais desenvolvido (BIRCH, 1997, OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Ainda nesse período ocorre a maturação da função gastrointestinal e a absorção de nutrientes atinge um nível satisfatório, e por sua vez, ocorre uma adaptação física e fisiológica para uma alimentação variada quanto às consistências e texturas. (HENDRICKS & BADRUDDIN, 1992; PIRES *et al.*, 1993;). Portanto, a partir do sexto mês de vida da criança pode-se complementar ao aleitamento materno, alimentos líquidos e de consistência pastosa como sucos, chás, papinhas de frutas entre outros. E aos poucos a introdução de alimentos sólidos, porém não se deve abandonar o aleitamento materno até os dois anos de vida da criança (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Durante os dois anos de vida, o leite materno permanece rico em nutrientes e continua protegendo a criança contra doenças infecciosas (ARDIÇ, 2018; DUIJTS, 2010). Calcula-se que em 500ml de leite materno no segundo ano de vida proporciona 95% das necessidades de vitamina C, 45% das necessidades de vitamina A, 38% das de proteína e 31% do total de energias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O aleitamento materno no tempo recomendado traz inúmeros benefícios à saúde (BOQUIEN, 2018; KORVEL-HANQUIST *et al.*, 2017; SHUMETIE *et al.*, 2018). JONES *et al.* (2003) relatou que o aleitamento materno poderia evitar 13% das mortes de crianças menores de 5 anos em todo o mundo. Além de diminuir os riscos de diversas doenças, como a diarreia (HORTA, 2013), previne otites (ARDIÇ, 2018, BITTKER; BELL,2018), diminui riscos de alergias, dermatite atópica (VAN ODIJK *et al.*, 2003; GUNGOR *et al.*, 2019). Reduz o risco de doenças cardiovasculares, de hipertensão (UMER, 2018). Pesquisas revelam que neonatos amamentados possuíam pressões sistólicas mais baixas, menores níveis de colesterol total e risco 37% menor de adquirir diabetes tipo 2. As mães também são beneficiadas, a cada ano de amamentação há uma redução de 15% na incidência de diabetes tipo 2 (STUEBE *et al.*, 2005; HORTA, 2007, WONG *et al.*, 2018). Além disso, o aleitamento materno minimiza a intensidade dos episódios de infecções respiratórias nas crianças (LI *et al.*, 2019, ZIVICH *et al.*, 2018).

Em Pelotas (RS) registrou que crianças que não foram amamentadas nos três primeiros meses de vida apresentavam um risco de 61 vezes maior de serem internadas com pneumonia comparada a crianças que receberam aleitamento materno exclusivo. E crianças que foram amamentadas por menos de um mês apresentavam risco de sete vezes maior de serem internadas por bronquiolite (CESAR *et al.*, 1999; ALBERNAZ *et al.*, 2003).

2.2 Desmame Precoce

O desmame precoce é a substituição repentina do aleitamento materno pelo alimento sólido. Já o desmame natural ou espontâneo é a substituição gradativa do consumo do leite materno por alimentos de consistências variáveis. Em crianças o desmame espontâneo deve se iniciar após os seis meses de vida com a complementação de outros alimentos à dieta, e o aleitamento deve ser mantido até os dois anos, quando ocorre o desmame natural por completo. Em ratos o desmame espontâneo inicia no 21º dia de vida e cessa completamente no 30º dia de vida. Entretanto, para fins experimentais em animais mantidos em biotérios o desmame natural ou espontâneo normalmente ocorre no 21º dia de vida. Embora, a partir do 14º dia de vida o animal consiga sobreviver sem os cuidados parentais da mãe e ao serem desmamados nesse período é caracterizado por desmame precoce (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; OLIVERIA *et al.*, 2011).

Modelos experimentais em ratos vem sendo utilizados para investigação das consequências que o desmame precoce provoca ao organismo. É utilizado pelo menos três técnicas para realização do desmame precoce: a primeira, é realização do desmame por separação materna, o filhote é separado ao 14º dia de vida pós-natal, privando-o tanto do aleitamento materno quanto dos cuidados parentais (OLIVERIA *et al.*, 2011). A segunda técnica priva o filhote apenas do aleitamento materno, ao corpo da mãe é aplicado bandagens que impede o acesso do filhote ao mamilo (LIMA *et al.*, 2013). E a terceira técnica é a utilização de fármacos aplicados à mãe para bloquear a produção de leite, como o uso da bromocriptina. (BONOMO *et al.*, 2008; DE MOURA *et al.*, 2009; YOUNES-RAPOZO *et al.*, 2012).

Estudos relatam as consequências que o desmame precoce traz a diferentes sistemas. Kikusui *et al.*, (2004) relatou alterações comportamentais em ratos desmamados precocemente submetidos ao teste do labirinto de cruz para avaliar os níveis de ansiedade, os ratos desmamados apresentavam mais estressados e agressivos. Ito *et al.*, (2006) analisou um aumento às respostas autonômicas, como hipertermia e taquicardia induzidas por estresse em ratos submetidos a desmame precoce. Neuroquimicamente manifesta mielinização precoce da amígdala, redução dos níveis de proteína do fator neutrófico no hipocampo e no córtex pré-frontal, e diminuição da imunorreatividade à bromodeoxiridina no giro dentado (KIKUSUI & MORI, 2009).

O encurtamento do período do aleitamento materno acarreta redução de densidade óssea em recém-nascidos, associado à menor adipogênese e alterações na ação da vitamina D e no paratormônio (PTH) (DE ALBUQUERQUE MAIA *et al.*, 2013); redução da massa encefálica absoluta, diminuição na síntese de bainha de mielina, afetando os mecanismos de aprendizado e

memória (LIU *et al.*, 2000; HUOT *et al.*, 2002; PESSANHA *et al.*, 2015). No sistema cardiovascular o desmame precoce provoca aumento da frequência cardíaca, e aumento das pressões sistólicas e diastólicas (KIKUSUI *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2013). Além disso, o desmame precoce promove o aumento das taxas de triglicerídeos, LDL-colesterol, obesidade, resistência a leptina e insulina e hiperleptinemia e hiperfagia (LIMA *et al.*, 2011; OLIVERIA *et al.*, 2011).

2.3 Estômago

O estômago é uma dilatação do tubo digestório, localizado no quadrante superior esquerdo do abdome, é um órgão infra-diafragmático e encontra-se entre o esôfago e o intestino delgado. Tem um papel importante na digestão mecânica e química dos alimentos para posterior absorção dos nutrientes. Dentre as principais funções do órgão estão: realização de movimentos peristálticos que agitam e decompõe o bolo alimentar mecanicamente; a síntese de hormônios como a gastrina, grelina, somatostatina e colecistocinina importantes para desencadeamento da digestão e secreção de elementos como ácido clorídrico, pepsinogênio, glicoproteína, fator intrínseco e muco. (BJORKQVIST *et al.*, 2002)

Em ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* o estômago é um órgão curto em relação ao segmento intestinal, ele tem forma de C, com concavidade cranial (CARVALHO *et al.*, 2011; BERTASSOLI *et al.*, 2013) Macroscopicamente o estômago é dividido em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e pilórica (FIORE, 2013). A cárdia é uma banda circular na transição entre o esôfago e o estômago. O fundo fica acima do nível de uma linha horizontal imaginária que tangencia o óstio cárdico, tem formato de uma cúpula localizado à esquerda e em contato direto com o diafragma. O corpo é a porção central grande e localiza-se abaixo dessa linha horizontal imaginária. A região pilórica, porção em forma de funil que termina no piloro, o esfíncter que controla a saída do conteúdo estomacal para o intestino delgado. O estômago dos ratos *Wistar* histologicamente é dividido em duas diferentes regiões: a porção aglandular e a porção glandular.(BERTASSOLI *et al.*, 2013) A porção aglandular apresenta epitélio estratificado queratinizado também chamada de porção córnea, e a porção glandular possui um epitélio com presença de glândulas tubulares na mucosa correspondente a região do corpo e antro (ALVES, 2009; MILLS, 2011) (Fig. 1A). 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, FIORE, 2013).

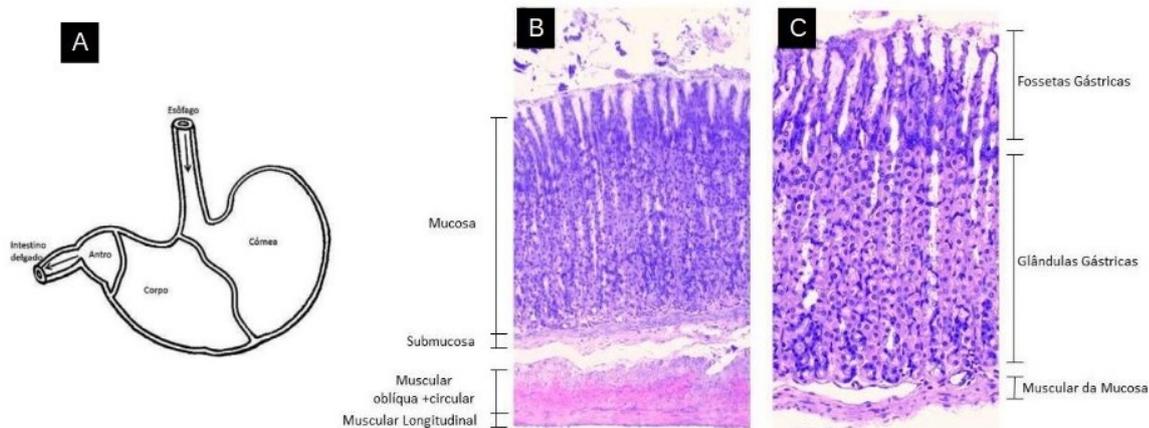


Figura 1: Morfologia do estômago de ratos *Wistar*. (A) Organização anatômica do estômago de acordo com sua estrutura histológica e função: porção córnea (aglandular), e porções do corpo e antro (glandular). As setas indicam o trajeto do alimento. Fonte: Adaptado de Fiore, 2013. (B) e (C) Fotomicrografia do tecido gástrico de ratos, corado com Hematoxilina e Eosina. (B) Fotomicrografia do estômago de rato, evidenciando a mucosa gástrica na porção voltada para o lúmen do estômago, em seguida a submucosa, e Muscular com suas subdivisões, oblíqua, circular e longitudinal (aumento de 100x). (C) Fotomicrografia da mucosa, mostrando as fossetas gástricas, as glândulas gástricas e a muscular da mucosa (aumento de 400x) Adaptado de Zonta, 2017.

Na porção glandular encontra-se quatro camadas que compõe a parede do estômago: mucosa, submucosa, muscular (muscular oblíqua, circular e longitudinal) e serosa (Fig. 1B) (ZONTA, 2017). A mucosa gástrica é revestida por um tecido epitelial cúbico simples que sofre invaginações formando as fossetas gástricas ou foveólas. Nelas desembocam secreções das glândulas gástricas ramificadas. Além disso, entre a mucosa e a submucosa possui uma camada chamada de muscular da mucosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013) (Fig. 1C).

As fossetas gástricas são revestidas por uma camada de células mucosas da superfície que produzem muco protetor. O muco possui uma alta concentração de bicarbonato de sódio e de potássio e quando aderido a superfície protege o epitélio contra o conteúdo ácido do suco gástrico. Além disso, as prostaglandinas auxiliam estimulando a produção de bicarbonatos e assim aumentam a camada de muco protetor por meio da vasodilatação da lâmina própria. As glândulas gástricas apresentam-se de forma diferente na região do corpo e antro. No corpo são caracterizadas por glândulas tubulares longas, três a sete glândulas se abrem em pequenas fossetas ou foveólas, levando o conteúdo para a luz do órgão. Cada elemento glandular possui três regiões distintas: istmo, colo e base com diferentes grupos celulares em cada uma das regiões (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ROSS & PAWLINA, 2012). O istmo é segmento curto localizado entre a fosseta gástrica e a glândula, possui células mucosas em diferenciação, células-tronco e células parietais (oxínticas). As células-tronco se replicam e se diferenciam para formar as células mucosas da superfície que seguem para cima na região das fossetas e também se diferenciam e migram em

direção basal para formação das células da glândula. As células parietais secretam íons para formação do ácido clorídrico (HCL) no lúmen estomacal que funciona como bacteriostático, destruindo as bactérias advindas com o alimento ingerido. Além disso, produzem fator intrínseco, uma glicoproteína que é fundamental para a absorção da vitamina B12 no íleo, como também $TGF\alpha$, HB-EGF, anfiregulina e outros fatores de crescimento (SCHUBERT, 2009). O colo das glândulas gástricas é um segmento longo situado imediatamente abaixo da região do istmo, contém células-tronco, células parietais oxínticas, células enteroendócrinas e células mucosas do colo, as quais são diferentes das células mucosas da superfície. O tipo de mucina secretada nas células mucosas do colo é diferente da mucina secretada pelas células mucosas da superfície, pois as células mucosas do colo produzem um muco solúvel e menos alcalino e também possui propriedades antibióticas. Subsequente ao colo está a região da base da glândula, a qual se apresenta de forma mais curta e mais larga. Nesta região a glândula normalmente se ramifica e se torna levemente espiralados próximo a muscular da mucosa. A base das glândulas possui células parietais, células zimogênicas ou principais e células enteroendócrinas. As células enteroendócrinas secretam hormônios como gastrina (produzidas pelas células G); e histamina (pelas células enterochromaffin-like -ECL), potentes estimuladores na produção de ácido clorídrico pelas células parietais. Também secretam somatostatina (pelas células D), inibidores da liberação de outros hormônios, inclusive de gastrina.; e a ghrelina (pelas células X) que estimula a liberação do hormônio de crescimento. Por outro lado, as células principais ou zimogênicas liberam secretam o pepsinogênio, uma enzima inativa, que ao ser ativada entra em contato com o suco gástrico ácido e é convertida em pepsina, uma enzima proteolítica. E finalmente as células principais produzem a lipase, enzima que atua nos lipídeos (CHEN *et al.*, 2006)

As glândulas da região do antro do estômago são diferentes das glândulas da região do corpo. No antro pilórico as glândulas são tubulares curtas e ramificadas que se abrem em fossetas ou foveolas gástricas muito profundas que ocupam cerca da metade da mucosa. Cada elemento glandular contém predominantemente células enteroendócrinas (células G) secretoras de gastrina, alternadas com células mucosas da glândula e células-tronco (WILLET, 2016).

A origem embriológica de todo tecido gástrico se dá por diferentes folhetos embrionários. O epitélio gástrico que envolve o lúmen do estômago é derivado do folheto embrionário endodérmico, os músculos lisos, as células de defesa e células endoteliais derivam do mesoderma, e os nervos entéricos do ectoderma. A partir da quarta semana de desenvolvimento o estômago primitivo se origina de uma dilatação do intestino anterior, ele se alarga ventrodorsalmente e a medida que aumenta, o estômago gira 90° no sentido horário em seu eixo longitudinal e assume sua posição final na cavidade abdominal (KHURANA & MILLS, 2010;

MOORE, 2016; WILLET, 2016). Devido essa diversidade de origens embrionárias até que a mucosa gástrica fique funcionalmente ativa ela passa por intensas modificações durante o período pré e pós-natal. Sendo o desenvolvimento da mucosa gástrica 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 (OSAKI, 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 (GLAVIN & PARE, 1985).

2.4 Intestino Delgado

O intestino delgado é porção do tubo digestório localizado na cavidade abdominal entre o estômago e intestino grosso. É dividido em duodeno, jejuno e íleo, sendo o local onde ocorre a absorção dos nutrientes (TORTORA; DERRICKSON, 2016). O duodeno representa uma importante porção do intestino delgado, apresentando partes anatômicas distintas, sendo estas, parte superior descendente, horizontal e ascendente, formando um “C”, onde o arco duodenal fica ao redor da cabeça do pâncreas. Na parte descendente encontramos uma papila, onde desemboca uma ampola denominada ampola hepatopancreática proveniente do ducto colédoco (da vesícula biliar) e ducto pancreático principal (do pâncreas). O duodeno é vascularizado pelos ramos do tronco celíaco e artéria mesentérica superior (DRAKE *et al.*, 2015).

Em 2014, Bredo e Odo descreveram a anatomia do sistema digestório de ratos *Wistar* e dividiu o duodeno nas seguintes partes: parte cranial, flexura duodenal cranial, duodeno descendente, flexura duodenal caudal, duodeno ascendente, flexura duodenojejunal. É órgão oco e formado por musculatura lisa, possuindo quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Parte do duodeno é revestida por uma camada adventícia. Internamente, a parede voltada para o lúmen do órgão é pregueada, essas pregas são chamadas de pregas circulares, além de projeções digitiformes, denominadas de vilosidades ou vilos intestinais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). O epitélio de revestimento intestinal é composto por vários tipos celulares onde podemos dividi-los em epitélio de revestimento presente nas vilosidades e epitélio de revestimento das criptas de Lieberkuhn (GARTNER & HIATT, 2007).

O epitélio que reveste os vilos é um epitélio cilíndrico simples, composto em sua maioria pelos enterócitos, ou células absorptivas, as quais apresentam as microvilosidades, que ampliam a área de absorção dos metabólitos, e glicocálix, que impede a autofagia. Tanto os

microvilos quanto o glicocálix compõem borda em escova. As células absorptivas possuem núcleos alongados, localizados na sua porção basal. Entre as mesmas, encontramos as células caliciformes que possuem grânulos de mucina em seu citoplasma, que na forma hidratada se torna o mucinogênio, sendo um muco protetor da mucosa intestinal. Além de enterócitos e células caliciformes, podemos encontrar no epitélio das vilosidades, células com núcleos esféricos e escuros, os linfócitos (ROSS & PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Os vilos seguem acompanhados por glândulas adjacentes, em sua maioria retas e com base dilatada, chamadas criptas de Lieberkuhn, estas, por sua vez, são responsáveis pela secreção de muco e proliferação celular. São compostas por enterócitos, células caliciformes, célula de Paneth e células regenerativas (ROSS & PAWLINA, 2012). As células de Paneth se localizam na base das criptas e são participantes na imunidade inata através de mecanismos, como a secreção de agentes antimicrobianos e transporte de imunoglobulinas como a IgA e IgG (LEVINE & HAGGITT, 1989; WERSHIL & FURUTA, 2008). Já as células regenerativas, são células-tronco que dão origem às demais células intestinais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A mucosa intestinal possui uma lâmina própria, formada por tecido conjuntivo frouxo, onde há glândulas mucosas, células-tronco em diferenciação e capilares sanguíneos fenestrados, onde para cada vilosidade, há um capilar linfático central, com fundo cego, sendo o local de entrada para os nutrientes absorvidos. A linfa é impulsionada do capilar linfático para uma rede linfática na submucosa, através de células musculares lisas da muscular da mucosa, que se trata de uma camada que separa mucosa de submucosa. Essas células penetram nas vilosidades acompanhando o capilar linfático. Ainda na lâmina própria, pode-se encontrar células de defesa as quais podem formar nódulos linfáticos. (CORMACK, 2003; GARTNER & HIATT, 2007; ROSS & PAWLINA, 2012).

A submucosa duodenal, é uma camada delgada e composta por tecido conjuntivo fibroelástico, apresentando um plexo submucoso (ou de Meissner). Nela encontramos as glândulas duodenais, também chamadas de glândulas de Brünner. Essas glândulas são tubulares ramificadas mucosas e ultrapassam a muscular da mucosa e a lâmina própria, por fim seus ductos se abrem na base das criptas ou entre os vilos (GARTNER & HIATT, 2007). Produzem um muco alcalino (pH = 8,0-9,5), que possui por função neutralizar o quimo ácido que chega ao duodeno. O PH alto, também mantém as condições favoráveis para o funcionamento das enzimas do suco pancreático (KRAUSE, 2000). As glândulas duodenais também são responsáveis pela produção da urogastrona, chamada de fator de crescimento epidérmico humano, atuante na inibição da liberação de ácido clorídrico pelo estômago (ROSS & PAWLINA, 2012). Esse fator de crescimento, também pode induzir a formação de estruturas similares a capilares fenestrados na matriz de fibrina, o que pode promover uma neovascularização local (HODDE, *et al* 1996).

Sobre camada muscular do intestino delgado, observamos que é constituída por duas subcamadas de musculatura lisa, as quais denominamos: camada circular interna e longitudinal externa. Também é constituída por um o plexo nervoso mioentérico (plexo de Auerbach), localizado entre as subcamadas e responsável pelos movimentos peristálticos (CORMACK, 2003).

Quanto ao desenvolvimento embrionário do intestino delgado, inicialmente é originado um intestino primitivo, quando as pregas cefálica, caudal e laterais envolvem a região dorsal do saco vitelínico ao corpo do embrião. A camada responsável pela origem de maior parte do epitélio e glândulas do trato digestivo é a endoderma do intestino primitivo. Dessa maneira, com finalidade de descrição, o intestino primitivo é dividido em anterior, médio e posterior, e sua diferenciação se dá pelos genes *homeobox*, localizados no endoderma e mesoderma circundante. Falando especificamente do desenvolvimento embrionário do duodeno, o mesmo possui como origem a porção caudal do intestino anterior, porção cefálica do intestino médio e do mesênquima esplâncnico em associação aos endodermas dessas regiões. Essas regiões se desenvolvem e originam uma alça projetada ventralmente em forma de “C”, em seguida a luz duodenal se estreita e pode se apresentar temporariamente obliterada por células epiteliais (MOORE & PERSAUD, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tardios do desmame precoce na histomorfometria do estômago e intestinos de ratos *Wistar*.

3.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a área das camadas mucosa, submucosa e muscular do estômago;
- Analisar a área das fossetas, glândulas e muscular da mucosa gástrica;
- Determinar a espessura das vilosidades intestinais, das criptas, da submucosa e da espessura total da parede do duodeno no intestino delgado;

4 MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE com número de processo: 23076.015456/2017-42 (Anexo A).

4.2 Animais

Foram utilizadas 12 ratas da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar com 90 dias de idade e peso corpóreo entre 200 a 250g. Esses animais foram provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição- Universidade Federal de Pernambuco.

As fêmeas foram acasaladas com ratos adultos, na proporção de duas fêmeas para um macho. Para diagnosticar a prenhez foi realizado o esfregaço vaginal na manhã seguinte do acasalamento, associada à observação da presença de espermatozoide agregado ao ganho de peso corpóreo da fêmea (DAMASCENO *et al.*; 2002). As ratas prenhas foram isoladas e mantidas no Biotério de experimentação dentro de gaiolas individuais de polipropileno, 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 ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($45\% \pm 5\%$) e sistema de exaustão com renovação de ar. No período da gestação e lactação as ratas foram alimentadas com água e ração padrão do biotério (Labina, Presence®, *ad libitum*). Um dia após o nascimento, todos os filhotes nascidos no mesmo dia foram randomizados e separados em ninhadas de 8 filhotes por mãe.

4.3 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram delineados de acordo com o dia do desmame. Onde os animais do Grupo Desmame, 15 GD (n=8 filhotes) foram separados da mãe no 15° dia de vida pós-natal, sendo assim desmamados precocemente. A partir desse dia foi substituído o aleitamento materno para alimentação padrão de biotério. Já os animais do Grupo Controle, 30 GC (n=8 filhotes) foram separados da mãe no período normal do desmame, no 30° dia de vida pós-natal. E em seguida passaram a receber a alimentação padrão de biotério. Após o período experimental os animais foram isolados e mantidos em gaiolas individuais até o 100° dia de vida pós-natal.

4.4 Eutanásia

Ao final do experimento, tanto os animais do Grupo Controle quanto do Grupo Desmame foram deixados em jejum por 24 horas antes de serem eutanasiados. Foram submetidos à anestesia dissociativa a base de cloridrato de Cetamina (C) e xilazina (X) na dose de 60-95mg/Kg (C) + 5-10 mg/Kg (X) IP para anestesia cirúrgica. Em seguida foi realizada a abertura da cavidade torácica por meio de uma incisão longitudinal no tórax, permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo do coração e introdução da cânula de perfusão. Por meio da cânula foi infundido 150mL de solução salina (NaCl) numa concentração de 0.9%. Com esse volume de solução entrando nos vasos o sangue do animal era gradativamente removido, prevenindo formações de coágulos e facilitando a penetração do fixador aos tecidos. Em seguida foi feita a preparação para infusão da solução fixadora com 4% de paraformaldeído em 4% de boráx, pH7,4, em 4°C. Após a infusão foi feita uma incisão longitudinal no ventre do animal para abertura na cavidade abdominal e coleta do estômago e do intestino delgado. Visto que os animais permaneceram em jejum 24 horas antes do sacrifício os órgãos não se encontravam com restos alimentares. Os órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas seguindo o protocolo de Silva *et al.* (2016).

4.5 Histologia

Os órgãos coletado passaram pelo processamento histológico. No estômago foi retirado o fragmento inicial da região da antropilórica, no intestino delgado, o fragmento do duodeno. 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 de MAYER, e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C durante 24 horas, para secagem e colagem, e em seguida as lâminas histológicas foram coradas por Hematoxilina e Eosina de acordo com o protocolo de Behmer *et al.*, 2003.

4.6 Análise Histomorfométrica

As lâminas histológicas foram analisadas em Microscópio de Luz e os cortes, fotomicrografados por meio de uma câmera de captura digital (Moticam 2300) de 3,0 megapixels, acoplada a um Microscópio Biológico Trinocular (Nikon 50E) e computador com software de imagem, o Motic Images Plus Versão 2.0. Foram capturadas imagens de cortes histológicos do estômago no aumento de 100x e 400x, do intestino delgado no aumento de 40x. As imagens capturadas pelo software, seguiram o mesmo padrão de resolução e foram salvas em formato JPEG. Para a análise quantitativa a partir das imagens capturadas foi utilizado o software ImageJ versão 1.43.

4.6.1 Análise do Estômago (porção antropilórica)

Para análise das áreas das camadas do estômago da região antropilórica do órgão foram retiradas 20 fotomicrografias aleatórias de cada lâmina no aumento de 100x. Essas fotos tinham 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 micrometros quadrado (μm^2). A área da camada mucosa foi demarcada desde sua porção apical até o início da submucosa. A área da submucosa demonstrava-se menor que vai desde a porção basal da mucosa até a porção apical da muscular do estômago (Fig. 2A).

Na mucosa gástrica foi avaliado separadamente suas porções: área das fossetas gástricas, das glândulas gástricas e da muscular da mucosa. Foram capturadas 20 fotomicrografias aleatórias de cada lâmina no aumento de 400x (Fig. 2B). Para estas fotos no programa ImageJ foi utilizada a escala de Distance in Pixels foi de 403, Know Distance de 150, Pixel Aspect Ratio de 1.0. Os dados resultados das análises foram passados para uma planilha no Excel para posterior análise estatística.

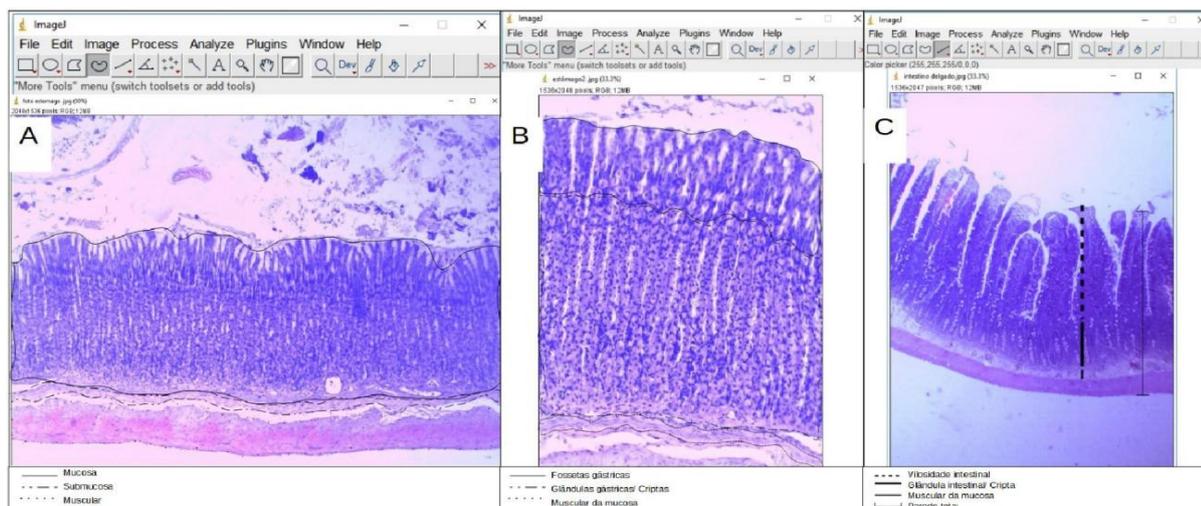


Figura 2: Análise histomorfométrica do estômago e intestino delgado de ratos *Wistar*. (A) Demarcação das áreas das camadas mucosa, submucosa e muscular do estômago. Aumento 100x. (B) Demarcação da área das porções da mucosa, fossetas gástricas, glândulas gástricas e muscular da mucosa. Aumento 400x. (C) Fotomicrografia do intestino delgado de rato *Wistar* na porção do duodeno. Demarcação da espessura das vilosidades, profundidade das criptas, espessura da submucosa e espessura total da parede do duodeno. Aumento 40x. As amostras foram coradas com H&E.

4.6.2 Análise do Intestino Delgado

No intestino delgado a porção investigada foi o duodeno. Foram analisadas a altura da vilosidade, comprimento da cripta, espessura da submucosa e espessura total presentes nos 20 campos fotografados. As vilosidades foram medidas desde o seu ápice até a sua base na junção com as glândulas intestinais. A medida da profundidade das criptas/glândulas intestinais foi feita desde sua abertura no lúmen, na junção com as vilosidades, até a sua base. Para a submucosa foi feito um segmento linear desde a muscular da mucosa até a camada muscular do órgão. Também foi avaliada a espessura total da parede do órgão desde a serosa até a porção apical da vilosidade (Fig. 2C). Para cada camada foi realizada uma repetição de 20 segmentos lineares em locais diferentes da camada. As fotos do órgão foram capturadas no aumento de 40x e no programa ImageJ foi utilizado a escala de Distance in pixels de 678, Know distance de 600 e pixel aspect ratio de 1.0 usando como unidade medida micrômetros (μm).

4.7 Análise Estatística

Para comparação entre os dois grupos, foi aplicado o teste *t* ou teste de Mann Whitney para distribuição paramétrica e não-paramétrica. A análise de dados foi realizada com o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 15.0. Foi adotado o $p \leq 0,05$ como nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Estômago

A análise das camadas do estômago revelou que o desmame precoce promove uma proliferação celular na mucosa gástrica aumentando sua área em relação ao grupo controle (GC: $1,0016\mu\text{m}^2 \pm 0,31840$; GD $1,1311\mu\text{m}^2 \pm 0,29039$, $p = 0,005$). Também ocorreu uma diminuição na área da submucosa (GC: $0,0854\mu\text{m}^2 \pm 0,07160$; GD: $0,0694\mu\text{m}^2 \pm 0,01848$, $p = 0,001$) e diminuição na área da camada muscular longitudinal (GC: $0,0709\mu\text{m}^2 \pm 0,04109$; GD: $0,0487\mu\text{m}^2 \pm 0,01537$, $p = 0,001$) no grupo desmame comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Variáveis	Grupos		
	Grupo Controle (GC) (Média \pm Desvio Padrão)	Grupo Desmame (GD) (Média \pm Desvio Padrão)	
Estômago (Porção antropilórica)	Área da mucosa (μm^2)	$1,0016 \pm 0,31840^b$	$1,1311 \pm 0,29039^b$
	Área da submucosa (μm^2)	$0,0854 \pm 0,07160^a$	$0,0694 \pm 0,01848^a$
	Área da muscular/ Oblíqua + circular (μm^2)	$0,2928 \pm 0,15035$	$0,2782 \pm 0,07480$
	Área da muscular/Longitudinal (μm^2)	$0,0709 \pm 0,04109^a$	$0,0487 \pm 0,01537^a$
	Área das fossetas (μm^2)	$58811,8277 \pm 15094,96544$	$58033,0540 \pm 16950,10879$
	Área das glândulas (μm^2)	$192570,6380 \pm 96362,22487^a$	$219374,2661 \pm 64394,49016^a$
	Área da muscular da mucosa (μm^2)	$20528,0172 \pm 21915,77200^a$	$20358,3479 \pm 5122,81002^a$
Intestino delgado (Duodeno)	Profundidade das criptas/glândulas (μm)	$140,2140 \pm 24,73109^a$	$113,7702 \pm 30,49400^a$
	Altura das vilosidades (μm)	$573,4369 \pm 77,47704$	$589,5836 \pm 110,83457$
	Espessura da submucosa (μm)	$31,1394 \pm 8,57964$	$31,5865 \pm 17,53470$
	Espessura da parede total (μm)	$893,0581 \pm 113,19287$	$905,3934 \pm 187,70068$

Tabela 1. Histomorfometria da porção antropilórica do estômago e do duodeno de ratos *Wistar*. Valores representados por ^a correspondem a nível significância semelhantes ($p < 0,001$). Valores representados por ^b correspondem a nível de significância de ($p < 0,005$). Comparações realizadas entre o grupo controle (GC) e grupo desmame (GD).

As análises das porções ou camadas da mucosa gástrica demonstraram um aumento na área das glândulas no grupo desmame (Figura 3A e 3B) (GC: $192570,6380\mu\text{m}^2 \pm 96362,22487$; GD: $219374,2661\mu\text{m}^2 \pm 64394,49016$, $p = 0,001$), porém na camada muscular da mucosa ocorreu uma diminuição da área no grupo desmame comparado ao grupo controle (GC: $20528,0172\mu\text{m}^2 \pm 21915,77200$; GD: $20358,3479\mu\text{m}^2 \pm 5122,81002$ $p = 0,001$) observado na Tabela 1.

5.2 Intestino Delgado

No intestino delgado constatou-se que ocorreu uma diminuição na espessura das criptas ou glândulas intestinais no grupo desmame quando comparado ao grupo controle como demonstrado na Tabela 1 e na Figura 3C e 3D (GC: $140,214 \mu\text{m} \pm 24,73109$; GD: $113,7702\mu\text{m} \pm 30,49400$, $p = 0,001$).

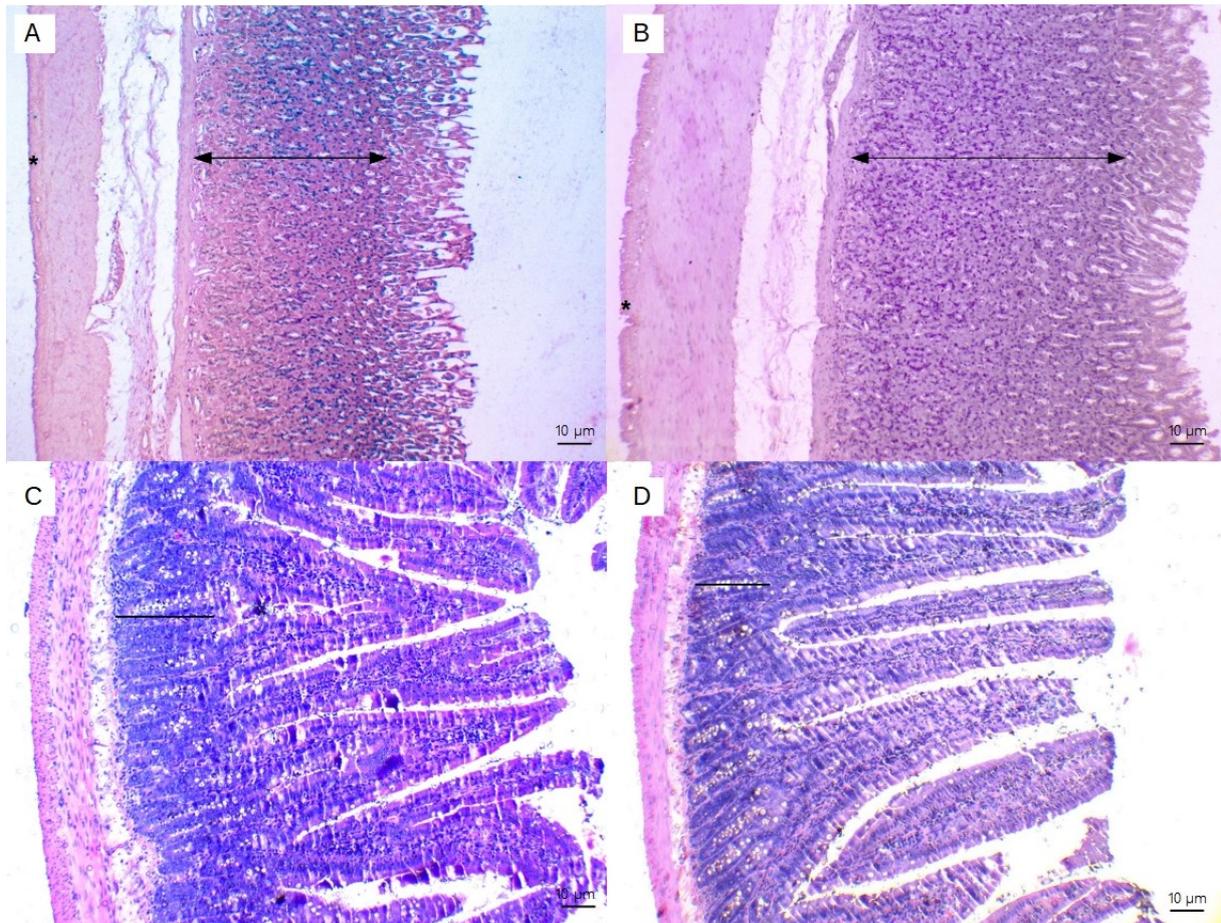


Figura 3. Diferença morfológica do estômago e duodeno entre os grupos estudados. (A) Estômago GC, (B) Estômago GD, (C) Duodeno GC e (D) Duodeno GD. Estruturas indicadas por asterisco (*) é a camada muscular longitudinal, seta dupla (⇓) é glândula gástrica e linha (|) é a fosseta gástrica intestinal. As amostras foram coradas com H&E (Aumento de 100X)

6 DISCUSSÃO

Durante a substituição do aleitamento materno para o desmame precoce, a mudança no padrão alimentar e comportamental provocam alterações nos processos metabólicos que afetam na maturação do trato gastrointestinal (SMITH et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Verificamos que o desmame precoce proporcionou mudanças na mucosa gástrica e intestinal em ratos wistar na vida adulta. No estômago o desmame precoce aumentou a área da mucosa gástrica, mais especificamente esse aumento ocorreu na área das glândulas gástricas, entretanto houve uma diminuição na área da submucosa e na muscular da mucosa. Já no duodeno, o desmame precoce promoveu uma diminuição na profundidade das criptas intestinais.

O aumento da área da mucosa no estômago, pode ser explicado pelos estudos anteriores que correlacionaram o papel dos fatores de crescimento, de enzimas e de hormônios que atuam com o desenvolvimento da mucosa gástrica (LIN, 2001; OSAKI, 2010; BITTAR, 2016). No estudo realizado por Lin e colaboradores (2001) eles observaram que a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) teve um aumento expressivo em ratos desmamados precocemente e que esta enzima (ODC) atuava como marcador inicial para o crescimento da mucosa gástrica. Outro fator relacionado com aumento da área da mucosa gástrica é que o hormônio Grelina secretado no estômago atua como uma molécula proliferativa no tecido gástrico e é estimulado pelo desmame precoce conforme Bittar e colaboradores (2016). Também Osaki e colaboradores (2010) avaliaram o papel do TGF α (Fator de Crescimento Transformante) secretado no estômago, e concluíram que ratos desmamados precocemente obtiveram um aumento nas células mucosas do colo, e um aumento nos níveis de mRNA de mucina 6, responsável por secretar muco para proteção da superfície mucosa. Esses estudos acima citados corroboram com achados do presente estudo, onde o desmame precoce promoveu o aumento na área da mucosa, conseqüentemente levando a um aumento na produção e liberação de muco para proteção da mucosa.

O aumento que encontramos especificamente na área das glândulas gástricas em ratos desmamados tem relação com estudos que evidenciaram que a separação materna e a privação do aleitamento materno atuam aumentando a proliferação de células parietais e zimogênicas (JACOBS, 1984; OGIAS, 2018). Esses tipos celulares mencionados anteriormente estão distribuídos pela glândula gástrica e estão relacionados com secreção de ácido clorídrico no lúmen do estômago e secreção da enzima inativa pepsinogênio, que ao ser secretada no meio ácido é convertida na enzima proteolítica pepsina, essencial para a digestão (HUH, 2010; JACOBS, 1984). As perturbações nesses grupos celulares da glândula gástrica pode alterar as funções da mucosa de forma permanente (OGIAS, 2018), podendo levar a patologias gástricas como úlceras gástricas

(GLAVIN, 1985). Zulian e colaboradores (2017) também pesquisaram os efeitos do desmame precoce na mucosa gástrica e concluíram que a atividade da corticosterona em ratos desmamados foi alterada, resultando na proliferação e diferenciação das células secretoras gástricas acordando também com os achados deste estudo.

Já em respeito às camadas musculares, as camadas oblíqua, circular e longitudinal unidas formam a espessa camada muscular que envolve o estômago, com a função de induzir a mistura mecânica auxiliando na quebra dos alimentos (CLEBIS et al., 2013; CHAUDHRY, 2019). Observamos diferenças entre os grupos estudados apenas na camada longitudinal, onde o desmame precoce provocou uma redução na área desta camada. A contração muscular do estômago é desencadeada por uma onda de despolarização lenta gerada por um conjunto de células intersticiais (CCI) que tem localização intramuscular e que são menos frequentes na camada longitudinal do antro (COUSINS et al., 2003; HIRST, 2006). Dessa forma, com diminuição na área da camada longitudinal provocaria uma redução nas contrações musculares dessa camada. Entretanto, vale salientar que naturalmente a camada longitudinal externa é a mais delgada entre elas (CLEBIS et al., 2013). A maior parte da contração muscular do estômago é realizada nas camadas oblíquas e primordialmente pela camada muscular circular (HIRST, 2006; DOMAE, 2008). Portanto, o organismo pode sofrer adaptações para suprir a redução da ação muscular longitudinal, utilizando mais intensamente a ação das outras camadas musculares.

Concernente ao duodeno, observamos que um dos impactos a longo prazo causado pelo desmame precoce foi a redução da profundidade das criptas no intestino delgado. As criptas intestinais são essenciais para a auto-renovação do intestino, pois abrigam um conjunto de células-tronco que se diferenciam em demais células da mucosa que podem se adaptar a alterações nas condições ambientais (TUCCI, 2001; BRUENS, 2017). Estudos anteriores observaram que o desmame precoce pode alterar a morfologia intestinal dependendo da fase temporal (ARAÚJO et al., 2006; OETTING et al., 2006; CRISPEL, 2019). Em relação aos efeitos imediatos pós-desmame verificaram um aumento a profundidade e proliferação celular da cripta intestinal nos animais desmamados precocemente, diferente do resultado que encontramos (TUCCI, 2001; MORÉS et al., 2001; ARAÚJO et al., 2006; OETTING et al., 2006). MORÉS et al., (2001) e ARAÚJO et al., (2006) ao estudarem a relação cripta/vilosidade em suínos, notaram que após 14 e 28 dias do desmame, ocorreu uma atrofia das vilosidades e uma hipertrofia das criptas, e relataram que esse efeito é muito mais forte no primeiro dia após o desmame. A redução na altura das vilosidades é causada pela perda de células epiteliais por consequência do início da alimentação sólida, do baixo consumo de ração, e da fixação de bactérias aos enterócitos. E o aumento da profundidade da cripta intestinal é uma resposta para garantir a renovação celular das células epiteliais da região apical das

vilosidades (OETTING et al., 2006, TUCCI, 2001). Consequentemente, a diminuição da altura da vilosidade reduz a digestão e absorção de nutrientes, resultando de imediato em desnutrição para o organismo. Oliveira et al (2011) relatou que um dia após o desmame precoce o peso corporal dos animais diminuíram, diminuindo assim a absorção de nutrientes. Além disso, a diminuição da relação cripta/vilosidade também foi observada em crianças desnutridas com diarreia persistente, PIRES et al., (1993), encontraram uma diminuição da altura dos enterócitos, do seu núcleo e da borda em escova diretamente proporcional ao grau de desnutrição e aumento da cripta.

Contudo, o presente estudo analisou os efeitos tardios desencadeados pelo desmame precoce, ou seja, na vida adulta do animal. E nossos achados foram coerentes aos resultados de Crispel et al., 2019, eles também relataram que os efeitos a longo prazo do desmame precoce resultava em criptas intestinais menos profundas (menores). Assim, a diminuição da espessura das criptas/glândulas intestinais no grupo desmame na vida adulta está relacionada com o fato do epitélio intestinal ser o tecido de mais rápida auto-renovação em mamíferos adultos. Barker et al., (2007); observou que ao marcar as células-tronco com o receptor LGR5, relatou que as células colunares na base das criptas intestinais geraram todas as linhagens epiteliais. Além disso, confirmou que a auto-renovação celular se dá a longo prazo, e ao continuar os experimentos com células-tronco marcadas com LGR5^(+ve), observou que durante 14 meses as células da base da cripta continuaram a gerar todas as linhagens epiteliais (BARKER, 2008). Uma vez que, a auto-renovação celular no intestino delgado é rápida, o organismo dos ratos desmamados precocemente sofre uma adaptação na vida adulta desenvolvendo uma resposta ao mecanismo compensatório. Assim sendo, a diminuição da cripta está relacionada com o aumento da vilosidade, aumentando assim a absorção de nutrientes e menores perdas energéticas com *turnover* celular (OETTING et al., 2006).

7 CONCLUSÕES

Essa pesquisa demonstrou que o desmame precoce promove alterações nas camadas do estômago, as quais tornam o animal suscetível às patologias gástricas como gastrites e úlceras, devido ao aumento das camadas produtoras de componentes do suco gástrico. Vale salientar que tais alterações foram encontradas muito tempo após o desmame precoce, prevalecendo na vida adulta. Entretanto, pouco se sabe sobre a relação do desmame precoce com doenças do trato gastrintestinal em humanos na vida adulta. Este estudo de base levanta um novo questionamento, propondo novas pesquisas para confirmar tal relação. Por outro lado os achados de redução na profundidade das criptas apontando um aumento da relação cripta/vilosidade no duodeno na vida adulta podem indicar uma adaptação compensatória no sentido de ter um melhor aproveitamento dos nutrientes com menores perdas energéticas. Essas adaptações podem resultar em longo prazo em maior tendência a hipernutrição, sendo um dos fatores responsáveis pelo aumento da incidência da obesidade na população.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, E. P.; MENEZES, A. M.; CESAR, J. A. Fatores de risco associados à hospitalização por bronquiolite aguda no período pós-natal. **Rev. Saúde Pública**, [S.l.], v. 37, p. 37, 2003.
- ALVES, M. S.; GOMES, F. K. S.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A.; MELLO, S. A.; BIANCHI, F. J.; OLIVEIRA-BIANCHI, L. R. Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos da curvatura gástrica menor do estômago glandular de ratos induzidos à carência proteica. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 13, n. 2, p. 139-145, maio/ago. 2009.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Hum Dev**. 91 (11): 629-35, 2015
- ARAÚJO, L. F.; JUNQUEIRA, O. M.; LOPES, E. L.; ARAÚJO, C. S. A.; ORTOLAN, J. H.; LAURENTIZ, A. C. Utilização de levedura desidrata (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1576-1581, 2006.
- ARDIÇE, C; YAVUZ, E. Effect of breastfeeding on common pediatric infections: a 5-year prospective cohort study. **Arch Argent Pediatr** 116(2):126-132, 2018
- AZARA, C. R.; MAIA, I. C.; *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, D. S.; REIS, A. C. S.; FREITAS, L. V.; COSTA, P. B.; PINHEIRO, P. N. C.; DAMASCENO, A. K. C.; Conhecimento de primíparas sobre os benefícios do aleitamento materno. **Rev RENE**, 11 (2): 53-62, 2010.
- BAKER, N.; van ES J. H.; JAKS, V.; KASPER, M.; SNIPPTER, H.; TOFTGARD, G.; CLEVERS, H. Verely long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles fro cycling Lgr5+ve stem cells. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol**,78: 351-356, 2008.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Hulman milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin Notrh Am**. 60(1):49-74. 2013.
- BARKER, N.; van ES J. H.; KUIPERS, J.; KUJALA, P.; van den BORN, M.; COZIJNSEN, M.; HAEGEBARTH, A; KORVING, J.; BEGTHEL, H.; PETERS, P. J.; BRUENS, L.; ELLENBROEK, S. I.; VAN RHEENEN, J.; AND SNIPPET, H. J. In vivo imaging reveals existence of crypt fission and fusion in adult mouse intestine. **Gastroenterology**153, 674–677, 2017.
- BELLUSCIO, L. M. et al. Altered gene expression in hippocampus and depressive-like behavior in young adult female mice by early protein malnutrition. **Genes, Brain and Behavior**, v. 15, n.8, p. 741-749, 2016.
- BERNABUCCI, U.; BASIRICÒ, L.; MORERA, P. Impact of hot environment on colostrum and milk composition. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 59(1):67-83, 2013.
- BERNT, K. M.; WALKER, W. A. Human milk as a carrier of biochemical messages. **Acta Paediatr.**, v. 88, n. 430, p. 27-41, 1999.

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 eletrônica de Veterinaria**. V. 14, N.4, 2013.

BIRCH, L. L. Conducta alimentar em los niños: perspectiva de su desarrollo. In: Organización Panamericana de La Salud (OPS). **Nutrición y alimentación del niño em las primeros años de vida**. Whashington, D C., p. 34-48, 1997.

BITTAR, N. M.; ZULIAN, J. G.; OGIAS, D.; GAMA, P. Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? **Nutrition**, 32(1):101-7, 2016.

BITTKER, S. S.; BELL, K. B. Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: an epidemiological study. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. 14 1399–1414, 2018.

BJORKQVIST, M.; DORNOVILLE DE LA COUR, C.; ZHAO, C. M.; 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**, 108(2-3):73-82, 2002.

BOCKHORST, K. H. et al. Early postnatal development of rat brain: In vivo diffusion tensor imaging. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 7, p. 1520–1528, 2008.

BONOMO, I. T.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C.; ALVES, S. B.; REIS, A. M.; DE MOURA, E. G. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. **J Endocrinol**, 198, 2, 331-337, 2008.

BOQUIEN, C. Y. Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. **Front Pediatr**, 16;6:295, 2018

BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Revista de Pediatria do departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.28 (2), p.117-127, 2006.

BREDO, R. M.; ODO, N. V. Divisões do aparelho digestório em ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*). **Vet. e Zootec**, v. 17, n. 3, p. 415-420, 2014.

BZIKOWSKA-JURA, A.; CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA, A.; OŁĘDZKA, G.; SZOSTAK-WĘGIEREK, D.; WEKER, H.; WESOŁOWSKA, A. Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. **Nutrients**, 10, 1379, 2018,

CACHO, N. T.; LAWRENCE, R. M. Innate immunity and breast milk. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.

CARVALHO, A. C.; FERNANDES, K. M.; *et al.* Aspectos macroscópicos e histológicos da mucosa gástrica de ratos *wistar* e sua utilização em modelo de úlceras gástricas. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 44-53, 2011.

CESAR, J. A. *et al.* Impact of breast feeding on admission for pneumonia during postneonatal period in Brazil: nested case-control study. **B.M.J.**, [S.l.], v. 318, p. 1316-20, 1999.

CHAUDHRY, S. R.; PETERSON, D. C. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach. [Updated 2019 Apr 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482334/> 2019

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C. M.; HAKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the gastric mucosa. I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 291(4):G539-44, 2006.

CLEBIS, N. K.; ZANONI, J. N.; STABILLE, S. R.; LISBOA, M. J. S.; OLIVEIRA, M. F. P. de; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H.; GAGLIARDO, K. M.; SOUZA, R. R. de. Efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos do estômago de ratos diabéticos. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 175-181, 2013.

CLEVERS, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, 449: 1003-1007, 2007.

CORMACK, D. **Fundamentos de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

CORSI-ZUELLI, F. et al. Prolonged Periods of Social Isolation From Weaning Reduce the Anti-inflammatory Cytokine IL-10 in Blood and Brain. **Front Neurosci**. v. 12:1011, p. 1-12, 2018

COUSINS, H. M.; EDWARDS, F. R.; HICKEY, H.; HILL, C. E.; & HIRST, G. D. S. Electrical coupling between the myenteric interstitial cells of Cajal and adjacent muscle layers in the guinea pig gastric antrum. **J Physiol** 550, 829–844, 2003.

CRAMER, C. P.; THIELS, E.; ALBERTS, J. R. Weaning in rat: I maternal behaviour. **Dev. Psychobiol**, v. 23, n. 6, p. 479–493, 1990.

CRISPEL, Y.; SHAOUL, R.; KHAMAISE, R.; SABO, E.; HOCHBERG, Z. The Effect of Weaning Age on the Small Intestine Mucosa of Rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, 2019 Jan 28. doi: 10.1139/apnm-2018-0454

DE ALBUQUERQUE MAIA, L.; LISBOA, P. C.; DE OLIVEIRA, E.; DA SILVA LIMA, N.; DA COSTA, C. A.; DE MOURA, E. G. Two models of early weaning decreases bone structure by different changes in hormonal regulation of bone metabolism in neonate rat. **Horm Metab Res**, 45(5):332-7, 2013.

DE MOURA, E. G.; BONOMO, I. T.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; DE OLIVEIRA, E.; TREVENZOLI, I. H.; REIS, A. M.; et al. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. **J Physiol**, 587, 20, 4919–4929, 2009.

DE SOUZA, S. L.; NOGUEIRA, et al. Diferencial effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiol Behav**, v.28, n. 2-3, Sep 15, p. 375-9, 2004

DEIRO, T. C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.37 n.10 Oct, p. 1503-9. 2004.

DOMAE, K.; HASHITANI, H.; & SUZUKI, H. Regional differences in the frequency of slow waves in smooth muscle of the guinea pig stomach. **J Smooth Muscle Res** 44, 231–248, 2008

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHEL, A. W. M. **Gray's anatomia clínica para estudantes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DUIJTS, L.; JADDOE, V. W.; HOFMAN, A.; MOLL, H. A. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. **Pediatrics**.126(1):e18–25, 2010.

DVORÁK, B.; KOLDOVSKÝ, O. The presence of transforming growth factor- α in the suckling rat small intestine and pancreas and the absence in rat milk. **Pediatr Res**. 35(3):348-53, 1994.

FIORE, A. P. Z. P. Regulação de p27^{klp1} pelo fator de crescimento transformante β 1 (TGF β 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.

FRAGA, M. C. et al. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male *Wistar* rats submitted to early weaning. **Physiology and Behavior**, v. 124, p. 100–106, 2014.

FRANCO, J. G.; LISBOA, P. C.; LIMA, N. S.; AMARAL, T. A.; PEIXOTO-SILVA, N.; et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. **The Journal of nutritional biochemistry**, 24, 6, 960-966, 2013.

FUENTES, I. M. *et al.* Neonatal maternal separation increases susceptibility to experimental colitis and acute stress exposure in male mice. **IBRO Rep**, 1, 10–18, 2016.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. 3 ed. Trad. Thaís Porto Amadeu. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Pag. 404-413.

GLAVIN, G. B.; PARE W. P. Early weaning predisposes rats to exacerbated activity-stress ulcer formation. **Physiol Behav**. 34(6):907-9, 1985

GRIDNEVA, Z.; KUGANANTHAN, S.; HEPWORTH, A. R.; TIE, W. J.; LAI, C. T.; WARD, L. C.; *et al.* Effect of human milk appetite hormones, macronutrients, and infant characteristics on gastric emptying and breastfeeding patterns os term fully breastfed infants. **Nutrients**; 9(1), 2016.

GUNGOR, D.; NADAUD, P.; LAPERGOLA, C. C., *et al.* Infant milk-feeding practices and food allergies, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma throughout the life span: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 109(Supplement_7), 772S–799S, 2019.

GURGEL, C. S. S.; et al. Vitamin A nutritional status in high-and low-income postpartum women and its effect on colostrum and the requirements of the term newborn. **J Pediatr**. 94 (2): 207-215, 2018.

HENDRICKS, K. M.; BADRUDDIN, S. H. Weaning recommendations: the scientific basis. **Nutrition**, v.50, p. 125-133, 1992

- HENNING, S. J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am J Physiol**, v.241, n.3, Sep, p.G199-214, 1981
- HERBST, J. J.; SUNSHINE, P. Postnatal Development of the Small Intestine of the Rat Changes in Mucosal Morphology at Weaning. **Pediat. Res.**, v. 3, p. 27–33, 1969.
- HIRST, G. D.; & EDWARDS, F. R. Electrical events underlying organized myogenic contractions of the guinea pig stomach. **J Physiol**, 576, 659–665, 2006.
- HODDE, J. P.; BADYLAK, S. F.; BRIGHTMAN, A. O.; VOYTIHARBIN, S. L. Glycosaminoglycan content of small intestine submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. **Tissue Eng.** v. 2, p.209-17, 1996.
- HORTA, B.L.; DE MOLA, C. L.; VICTORA, C. G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure, and type-2 diabetes: systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr Suppl**, 104: 30-37, 2015.
- HORTA, B. L. *et al.* Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. Geneva: **World Health Organization**, 2007.
- HORTA, B. L.; VICTORA, C. G. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review of the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. **World Health Organization**, iii, 49p, 2013.
- HUH, W. J.; ESEN, E.; GEAHLEN, J. H.; BREDEMEYER, A. J.; LEE, A. H.; SHI, G.; KONIECZNY, S. F.; GLIMCHER, L. H.; MILLS, J. C. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. **Gastroenterology**. 139:2038-2049, 2010.
- HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H.; MCNAMARA, R. K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Res**, 950, 1, 52–63, 2002.
- ITO, U.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. **Behav Brain Res**, 171(1):87-93, 2006.
- JACOBS, D. M.; ACKERMAN, S. H. Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. **Am J Physiol**, 247(6 Pt 1):G645-50, 1984.
- JONES, G. *et al.* How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, [S.l.], v. 362, p. 65-71, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Pag. 294-306.
- KACSÓH, B.; TÓTH, B. E.; GROSVENOR, C. E. Thyrotropin-releasing hormone mediates growth hormone release induced by milk and nursing in neonatal rats. **J Neuroendocrinol**. 4(6):663-72, 1992.

KHURANA, S.; MILLS, J. C. The gastric mucosa development and differentiation. **Prog Mol Transl Sci**, 96:93-115, 2010.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. **Scientific Reports**, n. February, p. 1–10, 2019.

KIKUSUI, T.; FACCIDOMO, S.; MICZEK, K. A. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. **Psychopharmacology**, 178, 2-3, 202–210, 2005.

KIKUSUI, T.; ICHIKAWA, S.; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 762–772, 2009.

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.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. **J Neuroendocrinol**. 21(4):427-31, 2009.

KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y. MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiol Behav**, 8(1):37-42, 2004.

KOBARU, Y.; KITAMURA, N. Postnatal Development of the Stomach in the Japanese Field Vole , *Microtus montebelli*. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 17, p. 138–148, 1988.

KODAMA, Y. et al. Effects of Early Weaning on Anxiety and Prefrontal Cortical and Hippocampal Myelination in Male and Female *Wistar* Rats. 2007.

KORVEL-HANQUIST, A.; DJURHUUS, B. D.; HOMØE, P. The Effect of Breastfeeding on Childhood Otitis Media. **Curr Allergy Asthma Rep**. 17(7):45, 2017

KRAUSE, W. J. Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. **Prog. Histochem. Cytochem**. v. 35, n. 4 :259367, 2000.

LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 97–105, 2006.

LEGRAND, D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. **J Pediatr**, 173(Suppl):S10–5, 2016.

LEVINE, D. S.; HAGGITT, R. C. Normal histology of the colon. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 13, n. 11, p. 966-984, 1989.

LI, S.; YUE, A.; ABBEY, C.; MEDINA, A.; SHI, Y. Breastfeeding and the Risk of Illness among Young Children in Rural China. **Int J Environ Res Public Health** .7;16(1). pii: E136. doi: 10.3390/ijerph16010136, 2019.

LIMA, N. S.; DE MOURA, E. G.; FRANCO, J. G.; PINHEIRO, C. R.; PAZOS-MOURA, C. C.; CABANELAS, A.; et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Horm Metab Res**, 45, 1, 22-30, 2013.

LIMA, N. S.; DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C.; NOGUEIRA NETO, F.J.; REIS, A. M.; DE OLIVEIRA, E. LISBOA, P.C. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **Br J Nutr**. 105(9):1045-13, 2011.

LIN, C. H.; LYONS, H.; SEELBACH, M. S.; TOLIA, V.; VIJESURIER, R. Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. **Digestion**, 63(4):214-9, 2001.

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.

LONGO, B. M. et al. Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. August, p. 1–17, 2018.

MACHADO, M. C. M.; ASSIS, K. F.; OLIVEIRA, F. C. C.; RIBEIRO, A. Q.; ARAÚJO, R. M. A.; CURY, A. F.; FRANCESCHINI, S. C. C. Determinantes do abandono exclusivo da amamentação: fatores psicossociais. **Revista de Saúde Pública**, 48 (6), 985-994, 2014.

MATSUI, F.; MORIMOTO, M.; *et al.* Effects of stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes. **Brain Dev**, Oct 7. 2009.

MIGUEL, R. D. DA S.; OLIVEIRA, L. DOS S.; SOUZA, S. L. Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 5, p. 584, 2015.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric Epithelial Stem Cells. **Gastroenterology**. 140(2):412-424, 2011.

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); 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 10 passos pra uma alimentação saudável. Guia alimentar para crianças brasileiras e Distrito Federal. Brasília-DF; 2002

MOGI, K. et al. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. **Developmental Psychobiology**, v. 58, n. 8, p. 1034–1042, 2016.

MOORE, K. I.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 8. ed .Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.

MOORE, K. I.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia básica**, 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MORÉS, N.; AMARAL, A. L. Patologias associadas ao desmame. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007.

MOURLON, V. et al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviours only in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 278–287, 2010.

OETTING, L. L.; UTIYAMA, C. E.; GIANE, P. A.; RUIZ, U. S.; MIYADA, V. S. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n4, p. 1389-1397, 2006

OGIAS, D. DE ANDRADE SÁ, E. R.; ALVARES, E. P.; GAMA, P. Oposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of sucking and weaning rats. **Nutrition**, 26(2):224-9, 2010

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 (*Rattus norvegicus*). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, 4 (3):215-220, 2000.

OLIVEIRA, L. S.; SILVA, L. P.; SILVA, A. I.; MAGALHÃES, C. P.; SOUZA, S. L.; CASTRO, R. M. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural processes**, 86, 1, 119-124, 2011.

OLIVEIRA, M. I. C.; RIGOTTI, R. R.; BOCCOLINI, C. S. Fatores associados à falta de diversidade alimentar no semestre de vida. **Cad. Saúde Colet.** vol.25 n.1, 2017

OSAKI, L. H.; CURI, M. A.; ALVARES, E. P.; GAMA, P. **Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: Possible role of TGF α /EGFR.** **Diferentiation**, 79(1), pp. 48-56, 2010.

PENTTILA, I. A. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. **J Pediatr.** 156(2 Suppl):S21-5, 2010.

PESSANHA, C. R.; BOUERI, B. F. C.; COSTA, L. R.; FERREIRA, M. R.; MELO, H. S.; ABREU, M. D. C.; et al. Brain development in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. **Journal of developmental origins of health and disease**, 6, 4, 268-271, 2015.

PIRES, P. L.; TRAHMS, C. M. Nutrient needs of infants and children. **Nutrition in Infancy and childhood.** 5 ed. St Louis: Mosby p. 30-58. 1993.

PRENTICE, P. et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 105, n. 6, p. 641–647, 2016.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SCHUBERT, M.L. Gastric exocrin and endocrin secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, 25(6):529-36, 2009.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Electronics Letters**, v. 0, 2013.

SHUMETIE, G.; GEDEFAW, G.; KEBEDE, A.; DERSO, T. Exclusive breastfeeding and rotavirus vaccination are associated with decreased diarrheal morbidity among under-five children in bahir dar, northwest ethiopia. **Public Health Reviews** 39:28, 2018.

SILBERSTEIN, T.; et al. Colostrum of Preeclamptic Women Has a High Level of Polyphenols and Better Resistance to Oxidative Stress in Comparison to That of Healthy Women. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Article ID 1380605, 5 pages, 2019

SMITH, F.; CLARK, J. E.; OVERMAN, B. L.; TOZEL, C. C.; HUANG, J. H.; RIVIER, J. E.; BLIKSLAGER, A. T.; MOESER, A. J. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 298(3):G352-63, 2010.

SONG, B. J.; JOUNI, Z. E.; FERRUZZI, M. G. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. **Nutrition**, 29(1): 195–202, 2013

STUEBE, A. M. et al. Duration of lactation and incidence of Type 2 Diabetes. **J.A.M.A.**, [S.l.], v. 294, p. 2601-10, 2005.

SUMNER, B. E. H. et al. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT1A and higher 5-HT2A receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1077–1092, 2008.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

TUCCI, F. M.; THOMAZ, M. C.; NAKAGHI, L. S. O.; HANNAS, M. I.; SCANDOLERA, A. J.; BUDINO, F. E. L. Efeitos da adição de agentes tróficos de leitões desmamados sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado e sobre o desempenho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.63 no.4, 2001

UMER, A.; HAMILTON, C.; EDWARDS, R. A.; COTTRELL, L.; *et al.* Association Between Breastfeeding and Childhood Cardiovascular Disease Risk Factors. **Maternal and Child Health Journal**.doi:10.1007/s10995-018-2641-8, 2018

VAN ODIJK, J. *et al.* Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. **Allergy**, [S.l.], v. 58, p. 833-43, 2003.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J. D.; FRANCA G. V. A.; HORTON, S.; KRASEVEC, J.; MURCH, S.; SANKAR, M. J.; WALKER, K.; ROLLINS, N. C. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, 387 (10017), pp. 475-490, 2016.

VINAGRE, R. D.; DINIZ, E. M. A. O leite humano e sua importância na nutrição do recém-nascido prematuro. **Atheneu**, p. 142, 2001.

WERSHIL, B. K.; FURUTA, G. T. Gastrointestinal mucosal immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. S380-383, 2008.

WILLET, S. G.; MILLS, J. C. Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 2(5):546-559, 2016.

WONG, P. D.; ANDERSON, L. N.; DAI, D. D. W.; PARKIN, P. C.; MAGUIRE, J. L.; BIRKEN, C. S. The Association of Breastfeeding Duration and Early Childhood Cardiometabolic Risk. **J Pediatr**, 192:80-85, 2018.

World Health Organisation Staff, World Health Organization, UNICEF. Global strategy for infant and young child feeding. Geneva: **World Health Organization**; 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet*, [S.l.], v. 355, p. 451-5, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; Global strategy for infant and young child feeding. Geneva, 2003.

XIE, R.; WANG, J.; YAO, Y.; QUI, M.; HUANG, S.; ZHAO, Z.; CHEN, Y.; YANG, Z.; SHENG, H.; FEI, J.; MAO, E.; CHEN, E. Fluid resuscitation via the rectum ameliorates hemodynamic disorders through adjusting aquaporin expression in an experimental severe acute pancreatitis model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, vol. 17,1: 437-443, 2018.

YOUNES-RAPOSO, V.; MOURA, E. G.; LIMA, N. S.; BARRADAS, P. C.; MANHÃES, A. C.; OLIVEIRA, E.; LISBOA, P.C. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. **British Journal of Nutrition**, 108:2286-2295, 2012.

ZIVICH, P., LAPIKA, B., BEHETS, F., & YOTEBIENG, M. (2018). Implementation of Steps 1–9 to Successful Breastfeeding Reduces the Frequency of Mild and Severe Episodes of Diarrhea and Respiratory Tract Infection Among 0–6 Month Infants in Democratic Republic of Congo. **Maternal and Child Health Journal**, 22(5), 762–771., 2019.

ZONTA, G. M. A.; Efeitos Tardios do Desmame Precoce sobre a Renovação e Diferenciação do Epitélio Gástrico em Ratos [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)] São Paulo: **Instituto de Ciência Biomédicas**, Universidade de São Paulo, 2017.

ZULIAN, J. G.; HOSOYA, L. Y.; FIGUEIREDO, P. M.; OGIAS, D.; OSAKI, L. H.; GAMA, P. Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. **Sci Rep.**, 31;7: 45867, 2017.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 6840 | 2126 8351
 Fax: 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br

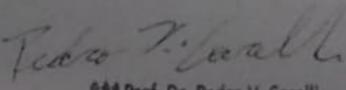
Ofício nº125/17 Recife, 11 de dezembro de 2017

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: Prof.^a Juliana Pinto de Medeiros
 Departamento de Histologia e Embriologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.015456/2017- 42

Certificamos que a proposta intitulada "**Alterações Histomorfológicas das Mucosas Gástrica e Intestinal em Ratos Wistar Submetidos ao Desmame Precoce.**" registrada com o nº 23076.015456/2017- 42 sob a responsabilidade de Prof.^a **Juliana Pinto de Medeiros** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (concea), e foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais (ceua) da universidade federal de pernambuco (UFPE), em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2017 a 01/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	62
Peso/Idade	220-380g/ 90 dias
Sexo	Macho (42) e fêmea (20)
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição da UFPE

Atenciosamente



Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 SIAPE 1801584