



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

MARCOS AURÉLIO SANTOS DA COSTA

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NO DUODENO DA PROLE DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Recife

2021

MARCOS AURÉLIO SANTOS DA COSTA

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NO DUODENO DA PROLE DE 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. Área de concentração: " Métodos Clássicos e Avançados"

Orientador (a): Sônia Pereira Leite

Coorientador (a): Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Costa, Marcos Aurélio Santos da

Efeito da melatonina exógena no duodeno da prole de ratos Wistar submetidos ao desmame precoce / Marcos Aurélio Santos da Costa - 2021.

55 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sônia Pereira Leite

Coorientadora: Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia.
Recife, 2021.

571.3 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-215

MARCOS AURÉLIO SANTOS DA COSTA

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NO DUODENO DA PROLE DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

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

Aprovada em: 28/05/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sônia Pereira Leite (presidente da banca)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros (membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros (membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luciana Maria Silva de Seixas Maia (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu a oportunidade e que com suas mãos me sustenta e me dá forças para continuar a caminhada. Por sua graça, proteção e fidelidade.

A minha mãe e meu irmão que com todo amor e dedicação me ajuda a enfrentar as dificuldades desta vida.

A minha família que esteve sempre torcendo pra mim e me incentivando a alcançar os meus objetivos.

As Professoras Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório e Profa. Dra. Sônia Pereira Leite pela orientação, colaboração e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho. Por todo o empenho e esforço sempre me incentivando a buscar o melhor.

Ao Professor Dr. José Cavalcanti, *in memoriam*, pelo incentivo na área de histologia.

Aos amigos, Felipe Mota, Willams Santigo, Barbara Joyce, Heloísa, Marília Manta, Adrienne Silva, Juliana Magalhães, Bárbara Silva, Paulo Eloi, Paulo Fernando, Ryan Cordeiro e Bruna Teixeira e pelo apoio, companheirismo e principalmente pela amizade.

Aos meus anjos da guarda Renatha e Tainá, por auxiliar o meu desenvolvimento científico durante a graduação e pós-graduação, companheirismo e amizade.

As servidoras do Centro de Biociências da UFPE e do Departamento de Histologia e Embriologia, em especial Geisa, Débora e Itacira, por serem simpáticas e ajudarem os alunos.

A todos integrantes do Laboratório de Morfofisiologia-UFPE pelo suporte durante essa trajetória, em especial Anderson, Otaciana, Jennyfer, Maria Luísa e Prof. Dr. Bruno Tenório por sempre estar ao meu lado durante os experimentos, pelo apoio, companheirismo e principalmente pela amizade.

As professoras Juliana e Luciana do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia por serem grandes professoras, pesquisadoras e acreditarem nos alunos.

A CAPES pela bolsa concedida e a PROPG pelo auxílio para execução dos experimentos.

RESUMO

O intestino delgado é a principal porção do trato digestório responsável pelo processo de digestão e absorção dos alimentos. O desmame precoce afeta diretamente a mucosa intestinal através da atrofia das criptas intestinais, diminuição das vilosidades. A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal e que está presente no leite materno. Por possuir atividade antioxidante, sendo utilizada como terapia frente a inúmeras patologias do trato digestório como esofagite, úlcera péptica, colite ulcerativa, isquemia/reperfusão intestinal e cirrose hepática. O principal objetivo desse trabalho foi investigar o efeito, a curto prazo, da melatonina exógena frente ao duodeno da prole de ratos Wistar submetidos ao desmame precoce. Para isso, ratos Wistar foram divididos em quatro grupos (10 animais cada): GI- amamentado (AM), GII- amamentado mais melatonina (AM+M), GIII- desmame precoce (DP), GIV- desmamados precocemente mais melatonina (DP+ M). O intestino foi coletado no 21 dia de vida pós-natal. Foram analisados os pesos dos animais. A avaliação da histopatologia, e morfometria do duodeno, foram realizadas pela coloração de Hematoxilina e Eosina. Dimensão fractal e lacunaridade do lúmen do duodeno também foram avaliadas assim como a histoquímica do duodeno. O grupo DP apresentou menor massa corporal comparado aos demais grupos. Através de preparações histológicas coradas observamos que a melatonina conseguiu reverter, a nível histomorfométrico, fractal e histoquímico, alguns danos do desmame precoce, como a presença de núcleos picnóticos, as áreas das vilosidades e áreas das criptas de forma significativa mostrando assim sua importância no leite materno. Concluímos assim que a melatonina atenua alguns danos frente ao desmame precoce. Sugerimos resultados devem ser utilizados em medidas preventivas e desenvolvimento de políticas públicas frente o aleitamento materno.

Palavras-chave: Desmame Precoce; Duodeno; Melatonina; Fractal; Histoquímica.

ABSTRACT

The small intestine is the main portion of the digestive tract responsible for the process of digestion and absorption of food. Early weaning directly affects the intestinal mucosa through atrophy of the intestinal crypts, reduction of the villi. Melatonin is a hormone produced by the pineal gland and is present in breast milk. It has antioxidant activity, being used as therapy against several pathologies of the digestive tract such as esophagitis, peptic ulcer, ulcerative colitis, intestinal ischemia/reperfusion and liver cirrhosis. The main objective of this study was to investigate the short-term effect of exogenous melatonin on the duodenum of the offspring of Wistar rats submitted to early weaning. For this purpose, Wistar rats were divided into four groups (10 animals each): GI- breastfed (AM), GII- breastfed plus melatonin (AM+M), GIII- early weaning (PD), GIV- early weaners plus melatonin (PD+ M). Gut was collected at day 21 postnatal life. The weights of the animals were analyzed. Histopathological evaluation, and morphometry of the duodenum, were performed by Hematoxylin and Eosin (HE) staining. Fractal dimension and lacunarity of the duodenum lumen were also evaluated as well as histochemistry of the duodenum. The PD group had lower body mass compared to the other groups. Through stained histological preparations we observed that melatonin was able to reverse, at the histomorphometric, fractal and histochemical level, some damages of early weaning, such as the presence of pyknotic nuclei, the villus areas and crypt areas significantly showing its importance in breast milk. We thus conclude that melatonin attenuates some damages in the face of early weaning. We suggest that the results should be used in preventive measures and development of public policies regarding breastfeeding.

Keywords: Early weaning; Duodenum; Melatonin; Fractal; Histochemistry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	11
1.2	GERAIS	11
1.3	ESPECÍFICOS	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	ALEITAMENTO MATERNO	12
2.2	DESMAME PRECOCE X SISTEMA DIGESTÓRIO	14
2.2.1	DUODENO	20
2.2.2	DESMAME X INTESTINO	20
2.3	MELATONINA E INTESTINO	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	28
3.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	28
3.3	DESMAME PRECOCE	28
3.4	GRUPO EXPERIMENTAL	29
3.5	TRATAMENTO COM MELATONINA	29
3.6	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DO DUODENO	29
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA	30
3.8	MÉTODO DA DIMENSÃO FRACTAL	30
3.9	MÉTODO DA LACUNARIDADE	31
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS	33
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	33
4.3	ANÁLISE HISTOQUÍMICA	35
4.4	ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS	38
4.5	ANÁLISE FRACTAL E LACUNARIDADE	41
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS	46
ANEXO A – CEUA	54
ANEXO B- ARTIGO QUALIFICAÇÃO	55

1. INTRODUÇÃO

O aleitamento materno é uma prática que proporciona benefícios tanto para a mãe, quanto filho, devendo ser exclusivo nos primeiros seis meses de vida segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Brasil, 2015.) Estratégia essa visa reduzir a morbidade e mortalidade dos neonatos (Lemos, 2019; Pietrobon et al., 2020). A amamentação é um período crítico e extremamente importante para maturação morfofisiológica do organismo, repercutindo no crescimento e desenvolvimento infantil (Lemos, 2019).

O leite materno é considerado um alimento completo suprimindo as necessidades do organismo em desenvolvimento, contendo na sua composição carboidratos, proteínas, lipídeos, fatores de crescimento e outros. A interrupção de forma abrupta do aleitamento materno exclusivo se denomina desmame precoce e é um tema de preocupação mundial. O desmame precoce pode se refletir em múltiplos sistemas, incluindo o sistema digestório, o qual é responsável pela quebra e absorção de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, tendo como principal órgão neste processo o intestino (Lemos, 2019; da Costa et al., 2020).

O intestino delgado é a principal porção do trato digestório responsável pelo processo de digestão e absorção dos alimentos (Ross, M. H., & Wojciech, P., 2016). O desmame precoce afeta diretamente a mucosa intestinal através da atrofia das criptas intestinais, diminuição das vilosidades ou aumentando a atividade de enzimas como a ornitina descarboxilase, refletindo na absorção, visto que a ausência da mesma acarretará alterações morfofisiológicas assim como o crescimento do órgão (Lin et al., 1998; Barbosa et al., 2019; da Costa et al., 2019).

Sabe-se que o trato gastrointestinal (TGI), em mamíferos, é responsável por produzir uma variedade de substâncias sendo também uma fonte extrapineal de produção do hormônio melatonina (Tolosa, 2017).

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal e que está presente no leite materno. Esta é produzida em maior quantidade no período da noite, visto que a presença de luz inibe a sua produção (Amaral & Cipolla-Neto, 2018; Tan et al., 2018; Moderie et al., 2020). Por possuir característica anfifílica, passa facilmente pela membrana celular e possui atividade antioxidante, sendo utilizada como terapia frente a inúmeras patologias do trato digestório como esofagite, úlcera péptica, colite ulcerativa, isquemia/reperfusão intestinal e cirrose hepática (De Talamoni, Nori Tolosa et al., 2017; Ferreira, 2019; Ma et al., 2020).

No entanto, faz-se necessária a compreensão da ação da melatonina em indivíduos que passam por distúrbios alimentares durante o crescimento. Assim, levando em consideração poucos relatos na literatura sobre a influência da melatonina nas consequências dos distúrbios alimentares, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito, a curto prazo, da melatonina exógena no duodeno da prole de ratos *Wistar* submetidos ao desmame precoce.

1.1 OBJETIVOS

1.2 GERAIS

- Avaliar o efeito da melatonina exógena no duodeno da prole de ratos *Wistar* submetidos ao desmame precoce.

1.3 ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia do duodeno através de microscopia óptica;
- Mensurar dimensão fractal e lacunaridade do lúmen do duodeno;
- Analisar a histopatologia, histomorfometria e histoquímica do tecido do duodeno dos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALEITAMENTO MATERNO (AM)

Durante muito tempo pensava-se que a maternidade estava ligada diretamente como uma função feminina. Apesar de que alguns autores veem mais como uma transposição social e cultural, relacionada ao fato de dar à luz e amamentar. O homem era visto como um ser superior na cadeia tridimensional (mãe-pai-filho), e desta forma a mãe era equiparada a criança, e o pai era naturalmente visto como autoridade sobre outros membros da família (Moura; Araujo, 2004).

Assim que completavam 10 anos, ou que se desprendiam dos cuidados da mãe ou da ama-de-leite as crianças eram levadas a outras famílias (através de contratos ou não) como aprendizes. Eram inseridas no meio adulto afim de inclusão até que pegassem idade. A criança pequena não era tida em conta devido à fragilidade que tinha, que tornava sua sobrevivência pouco provável na época (Caminha et al, 2010).

Moura e Araújo (2004), analisaram a justificativa do desinteresse que as mães tinham com seus filhos até o século XVIII, onde existia uma alta taxa de mortalidade infantil, com cerca de 25% dos nascidos vivos, que não permitia a mãe a se apegar a um ser com tão pouca probabilidade de sobrevivência, o mesmo inverte essa justificativa, questionando, se não seria justamente a falta de apego materno que causaria tão elevada taxa de mortalidade.

Devido a total dependência dos recém-nascidos aos cuidados da mãe, o aleitamento materno tornou-se um direito inato, por ser o aleitamento sinônimo de sobrevivência. Além de ser um alimento rico em nutrientes, age como uma forte fonte imunológica para o bebê. O leite materno passa tranquilidade a criança no aspecto psicológico, tem a vantagem financeira devido ao baixo custo, protege a mulher de câncer ovariano e mamário, auxilia na involução uterina, retarda o retorno da fertilidade na mulher, e auxilia na relação mãe e filho e aperfeiçoa a mulher no papel de mãe (Ichisato; Shimo, 2002).

Amamentação vai muito além da nutrição do neonato. É uma interação profunda entre o binômio (mãe e filho) com repercussões na fisiologia, estado nutricional, defesa contra infecções, desenvolvimento cognitivo e emocional, e na saúde ao longo prazo da criança além de ter implicações na saúde física e psíquica

da mãe (Brasil, 2015). Apesar de todas as evidências científicas provando a importância e superioridade da amamentação frente as outras formas de alimentação para a criança, assim como campanhas nacionais e internacionais, as prevalências de aleitamento materno (AM) no Brasil, especialmente a amamentação exclusiva, estão muito abaixo das recomendações (Brasil, 2015; Santos et al., 2019).

O AM deve ser exclusivo até os seis meses e após estes ocorre uma complementação com qualquer alimento sólido ou semissólido com a finalidade de complementá-lo, e não de substituí-lo (Brasil, 2015; Monteiro et al., 2020). A organização mundial de saúde (OMS) ressalta que não há vantagens da introdução de alimentos sólidos antes dos seis meses, podendo acarretar danos à saúde da criança como: diarreias, problemas respiratórios, desnutrição, menor absorção de nutrientes ricos no leite por exemplo ferro e zinco (Brasil, 2015). Mesmo com o desmame precoce ainda presente na sociedade, algumas pesquisas apontam que o aleitamento materno vem aumentando nos últimos 30 anos no Brasil. Porém os índices alcançados ainda se encontram longe dos recomendados pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e Organização Mundial de Saúde (OMS). (Oliveira; Camacho; Souza, 2005).

O leite humano possui 68 calorias a cada 100ml, sendo composto por 1,39g proteína, 6,13g açúcares, 4,20g gordura, minerais e vitaminas, quantidades segundo Tabela de Composição dos Alimentos (TBCA/USP) (TBCA, 2020). Várias substâncias bioativas como fatores de crescimento, células tronco e leucócitos estão presentes. Melatonina, insulina, grelina, leptina, adiponectina, cortisol, T3 e T4 estão entre os hormônios encontrados no leite materno (de Souza et al., 2018; Gila-Diaz et al., 2019; Katzer et al., 2016; Mazzocchi et al., 2019). Em consonância, a literatura relata a presença de concentrações de ferro, cobre, zinco, manganês, cálcio e magnésio, bem como proteínas, carboidratos e gorduras no leite materno de ratos (Keen et al., 1981). Além disso, a literatura relata que o leite materno de ratos apresenta carboidratos, lipídeos e inúmeros hormônios como: prolactina, melatonina, somatostatina, GnRH, IGF-1 entre outros na sua composição (Reppert & Klein, 1978; Zonta, 2017).

O leite materno tem papéis importantes para o crescimento, diferenciação e desenvolvimento de vários tecidos do bebê, principalmente no desenvolvimento da mucosa intestinal (Da Costa, 2019; Lemos, 2019; Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016). No lúmen do trato digestório ocorre a interação do epitélio com os nutrientes

proporcionando assim proliferação, apoptose, diferenciação e migração das células (Teles Silva et al., 2019a).

De acordo com Da Costa (2019), ratos que não sofreram desmame precoce permaneceram com o tamanho do eixo cripta-vilosidade, proliferação celular, distribuição das células caliciformes e a expressão de genes envolvidos nas funções intestinais e na renovação sem nenhuma alteração, logo a amamentação contribui para a integridade da mucosa intestinal.

Crianças amamentadas exclusivamente com o leite materno tem um percentual de morbidade por diarreia inferior ao das crianças que recebem em sua dieta a inclusão de outros tipos de alimentos complementares aos 3-4 meses. O AM também mostrou pontos importantes em relação à saúde da mulher, as mulheres que amamentaram exclusivamente até os seis primeiros meses tiveram um retardo na volta da menstruação, além de conseguirem voltar ao peso mais rápido no pós-parto (Mangabeira, 2014).

Foi realizado um estudo com dois grupos de mulheres, no primeiro grupo as mães desmamaram antes dos seis meses de idade, e no segundo as mães estenderam além de um ano de idade. Na grande maioria, cerca de 76,0% das mães que desmamaram antes dos seis primeiros meses, relataram que se sentiam felizes e prazerosas ao amamentar o seu bebê, e 15,0% disseram que sentiam medo e preocupação durante a amamentação, pois pensavam que o leite não era suficiente para a nutrição do seu bebê. Segundo dados obtidos nesse estudo, 92,0% dos desmames precoces não foram planejados. Mais de 80,0% das mães que amamentavam por tempo prolongado relataram sentir durante a amamentação sentimentos como realização pessoal e felicidade (Carrascoza; Costa Junior; Moraes, 2005).

2.2 DESMAME PRECOCE X SISTEMA DIGESTÓRIO

Os primeiros seis meses de vida são uma janela crítica de vulnerabilidade, onde a exposição a fatores ambientais pode influenciar positiva ou negativamente a saúde ao longo da vida. A ingestão exclusiva de leite materno, combinado com o cuidado materno, durante os primeiros seis meses de vida garante um melhor desenvolvimento ao recém-nascido. No entanto quando o desmame ocorre de forma abrupta, desmame precoce (DP), prática esta que vem aumentando, pode acarretar danos morfofisiológicos e comportamentais no organismo (Rodrigues, 2020).

Um dos comportamentos que sofre modificações no seu controle por exposição a agressões no início da vida é o alimentar (Da Silva et al., 2017; DE Souza et al., 2018; Ferro Cavalcante et al., 2016; Juan de Solis et al., 2016; Lira et al., 2014). Tais modificações têm sido muito investigadas pela associação com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, na maioria provenientes de maior consumo alimentar (Alves et al., 2015; Camacho et al., 2017; Lira et al., 2014; Rocha et al., 2014). Dentre estas modificações estão a elevada preferência por alimentos palatáveis, redução da saciedade, hiperfagia e outros (Oliveira et al., 2011; Ryu et al., 2008; Silva et al., 2014).

O complexo controle do comportamento alimentar é realizado por interação do SNC com componentes periféricos (Schwartz; Zeltser, 2013). Podem ser identificados dois níveis de controle, um homeostático e outro hedônico. O primeiro está relacionado ao controle da aquisição energética, o segundo a recompensa gerada por consumo de alimentos densamente energéticos (Stojakovic et al., 2017). O hipotálamo é uma das estruturas do SNC mais bem conhecidas no controle homeostático, enquanto o núcleo accumbens, a área tegmentar ventral e a amígdala estão relacionados ao controle hedônico (Simon et al., 2017).

No hipotálamo, a maioria das sinalizações de órgãos da periferia são recebidas e integradas (Schwartz; Zeltser, 2013). Entre estas estão hormônios produzidos no trato gastrointestinal e tecido adiposo, bem como nutrientes presentes na corrente sanguínea (Schwartz; Zeltser, 2013). No trato gastrointestinal são liberados em resposta ao consumo alimentar, entre outros, o peptídeo YY (PYY), a colecistoquinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e a insulina (D'Agostino et al., 2016; Young, 2012). Estas substâncias sinalizam saciedade no SNC (Schwartz; Zeltser, 2013). Até o momento, o único hormônio periférico que sinaliza fome ao SNC é a ghrelina, produzida no estômago (ZANCHI et al., 2017).

O tecido adiposo produz a leptina e as adiponectinas, que apresentam ação anorexigênica no SNC (Abdalla, 2017). A leptina é liberada em resposta ao aumento do estoque energético no tecido adiposo, e estimula a saciedade no SNC (Friedman; Halaas, 1998). Camundongos sem produção de leptina ou de seu receptor, apresentam fenótipo de obesidade (Montague et al., 1997). Alguns nutrientes presentes na corrente sanguínea também exercem função de sinalizadores do balanço energético, como é o caso da glicose, que sinaliza saciedade no SNC (Barahona et al., 2017). A produção e disponibilidade dessas substâncias tem o

objetivo de informar ao SNC sobre o estado energético do organismo, estimulando a liberação de sinalizadores anorexigênicos no balanço positivo, e orexigênicos no balanço negativo (Abdalla, 2017).

O desmame precoce ainda é prevalente em diversos países, inclusive no Brasil, sendo resultado de diversos fatores, como características maternas, condições de trabalho, situação socioeconômica, situação conjugal e o acompanhamento (Feitosa et al., 2020). Apesar da maioria das mães conhecerem a importância do aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida e complementar até os dois anos, essa prática ainda é pequena no Brasil. Os motivos para a interrupção do aleitamento materno precocemente são a falta de tempo devido ao trabalho; motivos físicos, introdução precoce de outros alimentos antes dos seis meses; pensar que seu leite é fraco devido a consistência aguada além da pequena quantidade; demora na descida do leite; questões anatômicas como o bico plano ou invertido; a própria interferência da família sobre suas decisões, dentre outros (da Silva, 2020; Feitosa et al., 2020).

A complexidade dos mecanismos do controle do comportamento alimentar ainda não está estabelecida na vida perinatal precoce, o que a deixa vulnerável a agressões ambientais no período perinatal. Vários estudos têm demonstrado que a desnutrição no período perinatal, promove hiperfagia na vida adulta (Lopes de Souza et al., 2008b).

Essas alterações em animais desnutridos parecem estar relacionadas a perturbações na regulação serotoninérgica da saciedade. Foi demonstrado que ratos desnutridos na vida perinatal não reduzem o consumo em resposta a agonista do receptor 5HT1B (Lopes de Souza et al., 2008b). Estes ratos apresentam maior ativação neuronal em áreas hedônicas em resposta a agonista do receptor 5HT6 (Da Silva et al., 2017).

Na vida neonatal, foi observado que desnutridos já apresentam alteração de ativação neuronal em áreas de produção serotoninérgica (Ferro Cavalcante et al., 2016). Além da desnutrição nas fases iniciais da vida, outros modelos de insultos perinatais buscam investigar as repercussões sobre o controle do comportamento alimentar. Um dos modelos é o estresse neonatal por separação materna (EE et al., 2013; Gracia-Rubio et al., 2016). Neste modelo, em que a prole é separada da mãe diariamente nos quatorze primeiros dias de vida por três horas, foram observadas diversas alterações de comportamento alimentar na vida adulta (Silva et al., 2014).

Os animais apresentam maior consumo de dieta palatável, maior preferência por glicose, hiperfagia de rebote além de ponto de saciedade adiantado (Gracia-Rubio et al., 2016; Michaels; Holtzman, 2006; Silva et al., 2014).

A interrupção do processo de amamentação acarreta prejuízos a saúde da prole, que pode repercutir à longo prazo (Gibbs; Forste, 2013). Camundongos desmamados precocemente apresentam aumento de comportamento de medo em teste de condicionamento ao medo por choque elétrico nas patas, associado à diminuição da expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Mogi et al., 2016).

Em gatos, foi demonstrado que o desmame precoce aumenta o comportamento agressivo em resposta a um agente estressor (Ahola; Vapalahti, 2017). Além disso, ratos desmamados precocemente apresentam aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade e diminuição do comportamento de luta amistosa (Shimozuru et al., 2007). Um dos comportamentos que é bastante modificado em roedores desmamados precocemente é a resposta a agente estressor (Nakamura et al., 2008). Em um teste de agressividade, exposição ao intruso, camundongos desmamados precocemente apresentaram redução (aproximadamente 50%) de ataques agressivos (Nakamura et al., 2008). Por outro lado, quando houve privação alimentar, o desmame precoce promoveu aumento da agressão (NAKAMURA et al., 2008).

Outro comportamento modificado pelo desmame precoce é o alimentar (Dos Santos Oliveira et al., 2011). Ratos desmamados precocemente apresentam retardo do ponto de saciedade, aumentando o tamanho da refeição (Oliveira et al., 2011). O desmame precoce também promoveu, na vida adulta, preferência por dietas palatáveis (Dos Santos Oliveira et al., 2011). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a estes ajustes duradouros no controle do comportamento alimentar ainda são desconhecidos. Um dos mecanismos de controle que pode estar envolvido nesta relação é o sistema de neurotransmissão serotoninérgico, considerando sua susceptibilidade em organismos que foram submetidos a um ambiente adverso na vida perinatal, como descrito anteriormente (Ferro Cavalcante et al., 2016; Lopes de Souza et al., 2008b; Spencer; Deneris, 2017). Os dados existentes sobre as repercussões do desmame precoce sobre o controle do comportamento alimentar são estritamente comportamentais e em ratos adultos machos.

Dessa forma, o desmame precoce não é somente o ato de cessar o leite materno a criança, mais também a inclusão de outros tipos de alimentos a dieta do mesmo, como água, sopas e chás. Muitos destes alimentos são inclusos na dieta por ser uma tradição cultural de família ou região, como os chás que são passados como sugestão para “fortalecer” a dieta da criança ou “curar” alguma doença que ela possa ter. Mesmo comprovada os benefícios que o aleitamento materno traz a mãe e a criança, o desmame precoce ainda atinge grande parte do mundo. Com o empenho das grandes empresas alimentícias infanto-juvenis, as mães acabam tendo um dúvida a respeito da nutrição do filho, pensando que a inclusão destes alimentos tão “nutritivos” mostrado nos grandes marketings são necessários para complementar a dieta (Rodrigues; Gomes, 2016).

Ao identificar as alterações morfológicas do (DP) no tecido gástrico, foi encontrado que o DP aumenta a área da mucosa, aumentando assim a área das glândulas e da muscular da mucosa, aumentando consecutivamente a acidez estomacal. Também foi observado uma diminuição na área da muscular longitudinal e submucosa, fazendo com que o organismo sofra adaptações para o funcionamento, nos ratos submetidos ao (DP). Indicando assim, possíveis danos que a interrupção do aleitamento materno de forma abrupta pode acarretar na saúde (Barbosa et al., 2020).

A diferenciação das células epiteliais gástricas termina na época do desmame. Entretanto quando o desmame ocorre de forma precoce, essa diferenciação é afetada. No estudo para investigar o papel da corticosterona frente a mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce, Zulian et al., (2017), encontraram que o (DP) aumenta a expressão de mucinas, *Mist1* e pepsinogênio C em níveis de mRNA e proteína, e mudou o número de células mucosas do colo (MNC) e células zimogênicas (ZC). Já a corticosterona regulou a expressão do pepsinogênio C e as distribuições de MNC e ZC. Comprovando assim a importância da corticosterona na maturação celular gástrica. Corroborando com este estudo, ao comparar os efeitos imediatos e de longo prazo do desmame precoce na diferenciação celular da mucosa gástrica, Teles Silva et al., (2019), observaram que o (DP) afeta de forma transitória a expressão de genes relacionados com diferenciação (*Atp4b* , *Bhlha15* e *Pgc*) assim como aumentando a população de (ZC).

Baseado em estudos anteriores sobre como o (DP) afeta a distribuição das glândulas gástricas em ratos, Bittar et al., (2016) investigaram a distribuição de grelina e de seu receptor no epitélio gástrico de ratos durante o período pós-natal. Dentro dos achados temos que o (DP) aumentou a distribuição de células secretoras de grelina. O receptor de grelina é encontrado na área do colo das glândulas, mas não ocorre mudanças nos seus níveis. Portanto, a grelina e seu receptor estão envolvidos no crescimento somático do estômago durante o desmame precoce.

O desmame precoce não farmacológico afeta também o fígado de ratos machos na vida adulta. Estudo realizado por Bertasso et al., (2020), avaliou entre dois modelos experimentais, desmame precoce não farmacológico e farmacológico (privando a produção de leite com bromocriptina), a lipogênese, β -oxidação, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e gliconeogênese em ambos os sexos em ratos Wistar adultos. Os ratos machos submetidos ao desmame precoce não farmacológico apresentaram triglicerídeos plasmáticos, triglicerídeos hepáticos e colesterol por lipogênese elevados. Já as fêmeas de ambos grupos não tiveram nenhuma alteração, apresentando assim níveis plasmáticos normais e citoarquitetura do fígado preservada.

Estudos têm associado o desmame precoce ao desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 na idade adulta. Frente a isso, foi investigado se o (DP) poderia afetar as ilhotas pancreáticas, visto que são raras pesquisas frente a essa temática. Foi demonstrado que o desmame precoce leva ao aumento da secreção de insulina em adolescentes do sexo masculino e à redução da secreção de insulina em filhos adultos (Pietrobon et al., 2020).

2.2.1 DUODENO

O intestino delgado é a porção final do trato digestório responsável pelo processo de digestão e absorção dos alimentos assim como local de secreções endócrinas. Os nutrientes (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) presentes no bolo alimentar são digeridos e absorvidos pelas células epiteliais de revestimento, os enterócitos. O intestino delgado é um órgão muito longo com aproximadamente cinco metros de comprimento e é dividido em: duodeno, jejuno e íleo. Estes últimos possuem características estruturais em comum. Trata-se de um tubo oco o qual no seu centro encontramos um lúmen, ou luz, cujo diâmetro é

variável e circundado por uma parede formada por várias camadas: mucosa, submucosa, muscular e adventícia/serosa (Junqueira e Carneiro, 2017).

A camada mucosa é composta por tecido epitelial simples cilíndrico, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e a muscular da mucosa. Vale ressaltar a presença de vilosidades na mucosa, projeções alongadas formadas pela mucosa e submucosa. No duodeno possui formato de folhas assumindo forma de dedos próximo do íleo. O epitélio das vilosidades é formado por enterócitos (células absorptivas), células caliciformes (produção de muco) conectando com o epitélio das criptas, que possuem algumas células absorptivas, caliciformes, enteroendócrinas, Paneth e tronco. As criptas tem formato tubular e apresenta alto índice proliferativo (da Costa, 2019; Junqueira e Carneiro, 2017).

Os enterócitos se apresentam com morfologia cilíndrica e núcleo oval na porção basal. Já na porção apical encontramos as microvilosidades, especialização da membrana, criando uma borda em escova, facilmente observada na microscopia de luz. Na microscopia eletrônica a borda em escova é vista como um conjunto de microvilosidades bem próximas (Junqueira e Carneiro, 2017). As células caliciformes estão distribuídas entre os enterócitos e sua função é produzir muco para proteger e lubrificar a mucosa do intestino, produto este facilmente corado pela coloração periódico-Shiff (PAS) (Junqueira e Carneiro, 2017). As células de Paneth se encontram na camada mais basal das criptas e possuem a função de defesa através da liberação dos seus grânulos eosinofílicos ricos em lisozimas e defensinas. E as células troncos possuem a função de dar origem as demais células das criptas e vilosidades (Junqueira e Carneiro, 2017; Ren et al., 2018).

A submucosa é rica em tecido conjuntivo, sendo este rico em vasos sanguíneos e linfáticos, e um plexo submucoso (plexo de Meissner). Esta camada pode conter glândulas duodenais e tecido linfoide. A camada muscular possui células musculares lisas orientadas em duas subcamadas: circular (interna) ou longitudinal (externa). Podemos observar entre essas duas camadas o plexo nervoso miontérico (plexo de Auerbach). Logo abaixo desta podemos encontrar a camada serosa ou a camada adventícia. A serosa é uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo revestida pelo mesotélio (epitélio simples plano). A adventícia formada por tecido conjuntivo juntamente com tecido adiposo (Junqueira e Carneiro, 2017).

2.2.2 DESMAME E INTESTINO

Ao avaliar os efeitos tardios do desmame precoce em ratos através da histomorfometria, Barbosa et al., (2019) observaram que no intestino delgado, o DP provocou atrofia das criptas intestinais. Corroborando com este, Lemos, et al., (2019), constatou que o grupo (DP) apresentou significativamente ($P < 0,001$) uma redução na profundidade das criptas de lieberkuhn, em comparação ao grupo controle.

Estudando o tamanho do eixo cripta-vilosidade, a proliferação celular, a distribuição de células caliciformes e a expressão de genes envolvidos nas funções intestinais e na renovação do jejuno, da Costa et al., (2019) observaram que a altura das vilosidades diminuiu significativamente pelo (DP) aos 18 dias, mostrando uma atrofia evidente. Entretanto, aos 60 dias não havia nenhuma diferença entre o grupo controle e o desmamado precocemente. Porém não houve recuperação do número de células caliciformes aos 60 dias, dos ratos que foram submetidos ao (DP) no 18º dia. Já o índice de proliferação celular diminuiu nos filhotes (DP) (18 dias), e o efeito foi mantido nos adultos (60 dias). Sugerindo assim que o desmame precoce afeta a proliferação celular, a expressão de genes e o número de células caliciformes nos ratos submetidos ao desmame no 18º dia e que esses efeitos se perduram até a idade adulta. Podendo assim afetar a fisiologia do intestino, como por exemplo, a absorção de nutrientes (da Costa et al., 2019).

Ao avaliar os efeitos da idade de desmame nas alterações morfológicas que ocorrem no intestino (jejuno e íleo) de ratos, através da histomorfometria intestinal e o crescimento somático, em filhotes de 21 dias e ratos maduros de 90 dias que foram desmamados precocemente (dia 16), observou-se que o desmame precoce resultou em criptas mais profundas, menor relação vilosidade/ cripta e menor área vilosa no dia 21. Aos 90 dias, os animais desmamados precocemente tinham criptas mais rasas, uma maior relação vilosidade/ cripta e uma área vilosa menor em comparação com os animais normalmente desmamados. Afirmando assim, que o desmame precoce afeta a mucosa intestinal, podendo acarretar danos na absorção de alimentos e concomitantemente no crescimento do órgão (Crispel et al., 2019). Rojas Castañeda et al., (1995) observaram, por um estudo morfométrico em ratos, que o (DP) aumentou o tamanho das vilosidades, a profundidade e o número de criptas no duodeno e no jejuno, enquanto o número de vilosidades diminuiu. No entanto, o íleo não apresentou alterações com o desmame precoce.

Lin et al., (1998) investigou se a atividade da ornitina descarboxilase (ODC) está envolvida no crescimento intestinal (jejuno) após o desmame precoce, visto que a atividade da enzima está associada à rápida proliferação celular em muitos tipos de células, através de imuno-histoquímica a proliferação celular. Foi visto que o DP aumentou a atividade da ODC na mucosa jejunal, pico no terceiro dia de desmame (18º dia), em comparação ao grupo amamentado. A sequência do aumento da atividade da ODC sugere que a mesma pode ser utilizada como um marcador de amadurecimento da mucosa frente ao desmame precoce. Em ratos neonatais, a introdução precoce de frutose na dieta aumenta significativamente as taxas de transporte de frutose na borda da escova e os níveis de mRNA do GLUT-5 durante o desmame precoce, confirmando assim a adaptação do intestino frente a dieta (Shu et al., 1998).

Filhotes desmamados no 17º dia mostraram um aumento imediato no comprimento intestinal, diminuição da lactase e aumento precoce da sacarase e maltase (Lee & Lebenthal, 1983). A atividade da sacarase não dependeu do período de desmame no estudo de Shinder et al., (1992) em ratos lactentes desmamados prematuramente no 15º, 17º, 19º ou 21º dia de vida. O desmame no 15º ou 17º dia de vida retardou consideravelmente a diminuição da atividade da lactase (Shinder et al., 1992). O atraso no ganho de peso corporal e no peso do intestino delgado foi maior nos lactentes que foram desmamados precocemente (Shinder et al., 1992). As mudanças no peso da mucosa segmentar, conteúdo de DNA e proteínas, no entanto, foram paralelas às dos controles. A enterocinase e a leucina aminopeptidase apresentaram poucas alterações, independentemente das modificações na dieta. Aos 19 dias, os filhotes desmamados precocemente tinham níveis séricos de corticosteróides cerca de três vezes os dos filhotes controle ou prolongados (Lee & Lebenthal, 1983). Comprovando assim, que a alteração na dieta acarreta uma mudança nos níveis das enzimas, para estas últimas atuarem frente ao padrão alimentar que o animal é submetido.

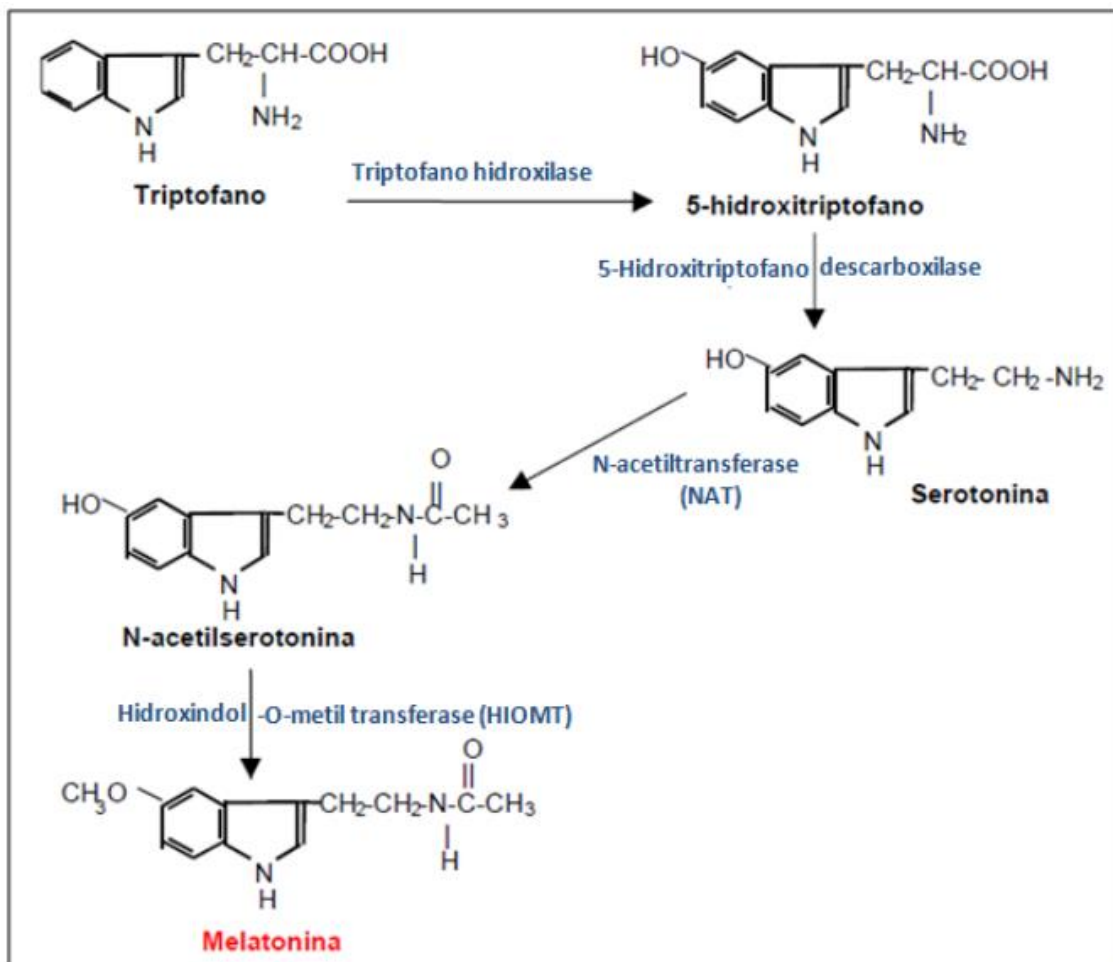
2.3 MELATONINA x INTESTINO

A melatonina (MEL) ou N-acetil-5-metoxitriptamina, é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal dos vertebrados. Descoberta em 1958 pelo dermatologista Aaron Lerner, recebeu este nome devido à sua capacidade de

contração dos melanóforos de melanócitos de sapos, resultando em clareamento da pele desses animais (Axerold, 1974).

A MEL é sintetizada a partir da serotonina na seguinte sequência de reações: conversão do triptofano em serotonina; conversão da serotonina em N-acetilserotonina (mediada pela aril-alcil-amina-Nacetiltransferase); conversão da N-acetilserotonina em MEL (mediada pela hidroxindol-O-metiltransferase). Sua secreção ocorre principalmente à noite, iniciando-se cerca de 2 horas antes do horário habitual de dormir, atingindo níveis plasmáticos máximos entre 03:00 e 04:00 horas, variando de acordo com o cronótipo do indivíduo (Claustrat et al., 2005; Pandi-Perumal, 2007) (Figura 1).

Figura 1: Produção da melatonina via glândula pineal.



Fonte: <https://farmaceuticodigital.com/2016/04/melatonina-hormonio-da-escuridao.html>

Depois de secretada, se distribui por vários tecidos corporais e não é estocada. Ela apresenta alta solubilidade em lipídeos, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, atravessando, inclusive a barreira hematoencefálica. Até 70% da MEL no sangue se encontra ligada à albumina. As taxas noturnas variam entre 10-80 g, sendo estes os menores valores já detectados para a secreção de um hormônio. Seus níveis plasmáticos exibem grande heterogeneidade entre diferentes indivíduos, porém costumam ser constantes em um mesmo indivíduo, representando um dos ritmos circadianos humanos mais marcantes (Rajaratnam et al., 2003).

A MEL é metabolizada no fígado que depura 90% dos seus níveis circulantes, e o seu principal metabólito é a 6- sulfatoximelatonina excretada na urina humana cujos níveis refletem fielmente a atividade biossintética da glândula pineal. Há evidências de que a síntese de MEL e seus níveis séricos decrescem com o envelhecimento do indivíduo (Fourtillan et al., 2001)

A luz é o fator ambiental mais importante para a regulação da síntese de MEL e responsável pelo ritmo circadiano de sua secreção. Tal ritmo é gerado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo que atua como um oscilador circadiano endógeno, pois estudos demonstraram que, quando isolado de outras estruturas do encéfalo, seus neurônios mantêm o ritmo circadiano (Guerrero et al., 2002).

A luz tem ação inibitória sobre a pineal, realizada pela seguinte via: impulsos luminosos excitam os neurônios da retina que fazem conexão com o núcleosupraquiasmático através do trato retinohipotalâmico, cujas fibras são glutamatérgicas. Do núcleo supraquiasmático partem projeções gabaérgicas inibitórias para o núcleo paraventricular onde conexões da porção subparaventricular se ligam ao núcleo dorsomedial do hipotálamo, controlando ritmos circadianos relacionados com sono-vigília, atividade locomotora, alimentação e síntese de corticosteroides (Rogers et al., 2003).

Outras fibras eferentes do núcleo paraventricular fazem sinapses com neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal (via feixe prosencefálico medial e formação reticular). Estes se conectam aos neurônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio cervical superior que, por sua vez, enviam fibras noradrenérgicas à glândula pineal. Elas atuam nos receptores adrenérgicos,

elevando os níveis intracelulares de AMP cíclico nos pinealócitos e induzindo a expressão da N-acetiltransferase que resulta na síntese da MEL (Van Den Heuvel et al., 2005).

Assim, no período de luz, o núcleo supraquiasmático está ativo e, graças à sua ação inibitória gabaérgica sobre o núcleo paraventricular, não há estimulação noradrenérgica da pineal, enquanto que na fase escura o núcleo supraquiasmático está inativo e, portanto, há ativação da pineal. A exposição à luz durante a fase escura inibe a produção de MEL de forma aguda, mas a escuridão não estimula a sua produção (Roth et al., 2005).

Mesmo intensidades moderadas de luz, como as do interior de residências (50-300 lux), são capazes de causar inibição da produção de MEL em humanos. Intensidades de 2000-2500 lux por 2 horas são capazes de inibir completamente a produção de MEL. Repetidas exposições à luz não inibem a secreção de MEL, mas causam o atraso de sua liberação, processo denominado de “atraso de fase”. Luz azul de comprimento de onda de cerca de 466-467 nm é a mais eficaz, tanto para a supressão, quanto para causar o atraso de fase (Thapan et al., 2001)

O trato gastrointestinal (TGI), em mamíferos, é a fonte extrapineal mais abundante de MEL com concentrações, na mucosa, superiores a níveis de plasma sanguíneo em 100 - 400 vezes. Fonte essa responsável pelas concentrações no sangue periférico durante o dia. Nos ratos, a concentração de MEL intestinal varia com a idade, possuindo pico ao nascimento, diminuindo com idade. No jejuno, íleo e cólon, o declínio da MEL é maior em comparação com o estômago. Mais tarde, em vida, a concentração de MEL na mucosa do íleo e no cólon distal é 126% mais elevada em ratos mais velhos em comparação a ratos mais novos (Bertrand, 2010; Tolosa, 2017). A biossíntese MEL no TGI não é dependente da glândula pineal, como foi visto em ratos pinealectomizados (Bubenik & Brown, 1997).

A principal produção de MEL no TGI ocorre durante o dia e está relacionada com a periodicidade da ingestão alimentar. Através de estudos de imunohistoquímica e radioimunoensaio validados por HPLC foi confirmado a presença de MEL na mucosa do TGI, como também identificaram as células enterocromafins como a principal fonte de MEL no TGI (Bubenik et al, 1996). Messner et al. (2001) encontraram concentrações elevadas de MEL na mucosa gástrica, duodenal e do colón.

A MEL desempenha papel importante no TGI por agir na regulação da motilidade gastrointestinal, eliminação de radicais livres, atividade anti-inflamatória local sendo assim um potencial alvo terapêutico no tratamento de doenças intestinais (Ferreira, 2019; Ma et al., 2020). Wu et al., (2019) destacaram a potência terapêutica adjuvante da melatonina frente ao câncer colorretal, visto que essa ativa a apoptose e a imunidade ao câncer do cólon, reduzindo concomitantemente a proliferação, autofagia, metástase e angiogênese, exercendo assim seus efeitos anticancerígenos. Os resultados de Lin et al., (2020) sugerem que a MEL atenua significativamente a lesão induzida por estresse psicológico na mucosa intestinal. O tratamento com melatonina recuperou a concentração de melatonina no cólon e modulou a disbiose da microbiota intestinal (Park et al., 2020). A suplementação de melatonina aumentou o peso corporal e conservou a morfologia intestinal, possuindo pouco efeito na proliferação celular e apoptose, bem como nas células caliciformes e células Paneth no íleo de camundongos desmamados (da Costa et al., 2020).

A síntese de melatonina no intestino ocorre através das células enterocromafins, a partir do triptofano, pela ação das enzimas N-acetiltransferase e hidroxyndole O-metiltransferase. Sua concentração está relacionada com o maior número dessas células enterocromafins, as quais foram encontradas em maior parte no reto e cólon, em estudos com animais e humanos, e em menor concentração no jejuno e íleo. Outros estudos mostraram que períodos de jejum influenciam diretamente o status de melatonina, aumentando sua concentração no estômago e intestino, mostrando uma possível ação no controle da ingestão alimentar (Chen, 2011).

Ao contrário da sua sabida atuação no sistema nervoso central, a função da melatonina no intestino ainda não é totalmente elucidada. A melatonina parece desenvolver um papel na regulação da motilidade intestinal, no sistema imunológico e na liberação de peptídeos envolvidos no balanço energético, como o peptídeo YY. Além disso, também pode apresentar ação de proteção do cólon em diferentes condições patofisiológicas. Esses efeitos protetores estariam envolvidos com a ativação do sistema antioxidante ou através da regulação do tônus dos vasos sanguíneos, alterando sua perfusão. Outro possível efeito é a alteração da composição bacteriana da microbiota intestinal através de potente ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de *E. coli* em estudos in vitro (Thor, 2008).

A melatonina altera a motilidade intestinal através da ativação de seus receptores nas células da musculatura lisa na mucosa gastrointestinal, mostrando em estudos em animais tanto efeitos excitatórios, quanto inibitórios, dependendo da dose administrada. A ação na motilidade acontece através do antagonismo com a serotonina – os estudos mostram que a serotonina tem efeito de contração e geração espasmos na musculatura lisa da mucosa gastrointestinal, enquanto a melatonina tem ação inibindo este efeito de espasmos, e a força de contração, mas mantém a frequência e amplitude do peristaltismo. Com esse relaxamento da musculatura lisa, há um aumento do fluxo sanguíneo. Este último efeito aumentando a perfusão sanguínea foi identificado como efetivo para o tratamento e prevenção de úlceras gástricas e intestinais (Reiter, 2010; Thor, 2008).

Outro grande efeito da melatonina que veem sendo estudado em diversos sistemas orgânicos é a sua ação antioxidante. Segundo Bubenik (2008), sua ação antioxidante e ligante de radicais livres é ainda mais potente que a vitamina C e E, sendo avaliada e aprovada em estudos para o tratamento e prevenção de patologias na cavidade oral, estômago, esôfago, pâncreas e cólon. Em relação aos efeitos no sistema imune, a melatonina parece regular a expressão de citocinas pró inflamatórias como IL2, IL2R e IFN, podendo ainda interferir na expressão de COX2 e INOS. Desta forma, pode ser uma grande aliada ao tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

Com base nessas informações, percebemos que o efeito na regulação da motilidade, ação antioxidante e anti-inflamatória, fazem da melatonina uma grande aliada no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Chron, por exemplo (Conde Silira, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE sob o nº 23/2020. (ANEXO 1).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 8 ratas albinas (200-250g de peso corporal) da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas (n= 8) para um macho (n=4). A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozoide no esfregaço vaginal e confirmada pelo ganho de peso corporal (Damasceno, D. C et al; 2002). A partir do diagnóstico, as ratas prenhas foram transferidas para gaiolas individuais e durante a gestação e lactação receberam dietas padrão de biotério (Labina, Presence ®). Após o nascimento dos filhotes foi realizada a sexagem para a formação das ninhadas com 8 filhotes por mãe. Foram realizados mais de um acasalamento para obtenção de 10 animais por grupo. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (22°C \pm 2°C, sob ciclo claro/escuro de 12horas, luz apagada às 18horas), recebendo ração e água ad libitum.

3.3 DESMAME PRECOCE

O dia do nascimento da ninhada foi considerado dia zero. No décimo dia pós-natal, foi realizada a sexagem dos animais com o objetivo de manter 8 filhotes machos em cada ninhada (as ninhadas que não obtiveram esse número serão complementadas por fêmeas). Os grupos experimentais foram formados de acordo com o período do desmame de cada ninhada: GI (n=10); GII (n=10); GIII (n=10); GIV (n=10). As ninhadas pertencentes aos grupos (GI; GII) foram desmamadas no 15º dia pós-natal e aos grupos (GIII; GIV) foram desmamadas no 21º dia pós-natal que é considerado período natural de desmame. As matrizes dos animais dos grupos (GI; GII) foram separadas de seus filhotes que receberam ração e água por meio de pipetas Pasteur descartáveis e foram massageados para facilitar a excreção de urina e fezes (Teles Silva et al., 2019).

3.4 GRUPO EXPERIMENTAL

Grupos desmamados no 15º dia

(GI), n= 10 - animais desmamados no 15º dia pós-natal;

(GII), n= 10 - animais desmamados no 15º dia pós-natal e tratados com melatonina;

Após o desmame precoce, os animais pertencentes a ambos os grupos foram separados, da matriz, em gaiolas individuais até o 21º dia pós-natal.

Grupos desmamado no 21º dia

(GIII), n= 10 - animais desmamados no 21º dia pós-natal;

(GIV), n= 10 - animais desmamados no 21º dia pós-natal e tratados com melatonina;

3.5 TRATAMENTO COM MELATONINA

O tratamento foi realizado segundo o modelo de suplementação de melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) já estabelecido na literatura por Prata Lima; Baracat; Simões, (2004). Os animais receberam 200 µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal por via intraperitoneal (i.p) no período noturno (18:00h) durante 6 dias (15º ao 21º) nos grupos GII e GIV. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (NaCl a 0,9%). Os animais do grupo GI e GIII receberam, respectivamente, solução NaCl 0,9% e 0,02 mL de etanol (placebo).

3.6 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DO DUODENO

No 21º de vida, os ratos 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) (i.p) para anestesia cirúrgica. Posteriormente os animais foram posicionados em decúbito ventral com imobilização de fita adesiva, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de intervenção cirúrgica, exposição do duodeno e retirada do órgão. Após o duodeno ter sido retirado, (região após o esfíncter pilórico) um pequeno fragmento foi imerso em solução fixadora de formol tamponado a 10% durante 24 horas para o preparo de lâminas histológicas. No final do experimento os animais foram eutanasiados. A massa corpórea dos animais foi pesada entre o 15º e 21º dia através de uma balança comercial.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA

Amostras do duodeno dos grupos experimentais foram clivadas, desidratadas em soluções de álcool etílico com concentrações crescentes de 70, 80, 90 e 100%, diafanizadas pelo xilol, impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 60 °C e incluídas em parafina histológica purificada (PF 56-58°C). Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo, ajustado para 3 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. Em seguida, foram submetidas à técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica. Foram realizadas 10 lâminas por cada grupo.

A avaliação histoquímica foi realizada através dos seguintes métodos de coloração do PAS (Ácido Periódico de Schiff), Alcian Blue, Tricrômico de Mallory e Orceína.

Para análise morfométrica, as imagens histológicas foram capturadas pela câmera digital "Moticam 2300 3.0M Pixel USB 2.0" acoplada ao microscópio óptico "Olympus CX22" com aumento de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas usando o software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), onde o comprimento, área das vilosidades intestinais e a área da glândula intestinal foram analisados. Foram realizadas medidas de 10 campos por lâminas, totalizando 1000 campos por grupo.

3.8 MÉTODO DA DIMENSÃO FRACTAL

As imagens microscópicas do duodeno foram usadas para calcular a dimensão fractal pelo método de box counting (D_{box}) e dimensão por entropia de informação (D_{inf}) de acordo com Tenorio et al. (2017). Estas imagens foram analisadas usando o software Benoit 1.3 (Fractal Analysis System, TruSoft, St. Petersburg, USA). Em síntese, a dimensão fractal obtida pelo método de box counting foi calculada através da cobertura da imagem com $N(r)$ caixas, onde N é o número de caixas e r é o comprimento de um lado da caixa contendo ao menos um ponto da estrutura analisada. Este processo será repetido com caixas de diferentes tamanhos e plotados em um gráfico duplo log de $N(r)$ como uma função de r . A inclinação desta relação entre os sinais invertidos é a dimensão fractal por box

counting e ε é a menor variação no tamanho das caixas. Isto pode ser formalmente descrito pela fórmula 1:

$$D_{bc} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \varepsilon) - \log N(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right] \quad (1)$$

Na dimensão fractal por entropia de informação (D_{inf}) a imagem também é coberta por caixas, mas este método está relacionado a frequência na qual cada caixa está ocupada pela estrutura analisada; formalmente descrito pelas fórmulas 2 e 3:

$$D_{inf} = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{(S(r + \varepsilon) - S(r))}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right] \quad (2)$$

$$S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i) \quad (3)$$

Onde, $S(r)$ é a entropia de Kolmogorov, $m_i = M_i/M$ (M_i é o número de pontos na caixa i , e M é o número de pontos na estrutura analisada).

Foram realizadas medida de 10 campos por lâminas, totalizando 1000 campos por grupo.

4.9 MÉTODO DA LACUNARIDADE

A análise da lacunaridade foi realizada usando os procedimentos anteriormente descritos em Tenorio et al (2017). A distribuição das lacunas na estrutura analisada foi descrita pelo valor da lacunaridade obtida usando o software Image J (National Institutes of Health –NIH, USA) com o plug-in FracLac (A. Karperien - Charles Sturt University, Australia). A imagem foi coberta por uma série de grades, cada grade contendo um número de caixas de diferentes tamanhos (ε) e orientações (g). A lacunaridade média (Λ) será obtida pela fórmula 4:

$$\Lambda = \left[\sum_g \sum_i (1 + (\sigma|\mu)^2) \right] / n \quad (4)$$

Onde σ é o desvio padrão; μ é valor médio de pixels por caixa de lado ε ; n é o número do tamanho das caixas em uma orientação g .

Foram realizadas medida de 10 campos por lâminas, totalizando 1000 campos por grupo.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada em um programa computacional GraphicPad Prism 5, onde dados foram avaliados por meio de testes não-paramétricos de Kruskal Wallis com post-hoc de Dunn. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

O peso dos animais do grupo DP apresentou diferença significativa quando comparado aos demais grupos demonstrando menor média (Tabela 1).

Tabela 1: Peso dos animais dos grupos experimentais. Grupo DP com diferença estatística quando comprado aos demais grupos.

GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=10)	PESO DOS ANIMAIS (g)
AM	37,9 ± 4,20 a
AM+M	39,6 ± 6,89 a
DP	28,3 ± 4,69 *
DP+M	34,1 ± 7,12 a
K	0.0007

Teste de Kruskal Wallis com post hoc de Dunn, nível de significância $p \leq 0,05$

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os duodenos dos ratos do grupo AM e AM+M apresentaram as vilosidades com morfologia com aspecto de folhas, típico do duodeno, com mucosa, submucosa e muscular bem preservadas. A mucosa apresentou o epitélio simples cilíndrico com borda em escova, composto por enterócitos, células caliciformes e mastócitos. Além da lâmina própria espessa, rica em tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e células defesa como os linfócitos. A camada submucosa estava presente rica em glândulas duodenais como a glândula de Brünner e a camada muscular apresentou duas camadas um circular interna e uma longitudinal externa recoberta por uma serosa de tecido conjuntivo recoberto por epitélio simples plano, mesotélio. Foram observados ainda células de Paneth (Figura 2).

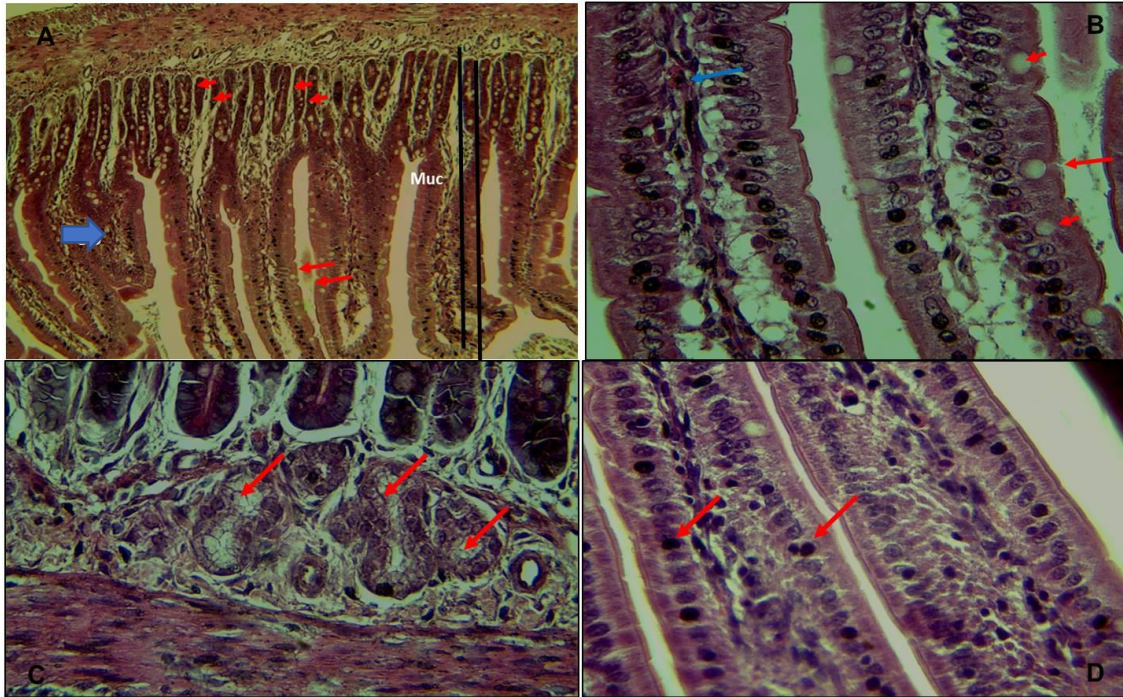


FIGURA 2: Fotomicrografias do Duodeno dos animais dos grupos experimentais. A: Duodeno do grupo AM. Mucosa (Muc) com vilosidades revestidas por epitélio simples colunar (Seta longa); Lâmina própria (Seta azul). Glândulas intestinais (setas curtas); Submucosa (Sb); Muscular (Mus); AU 100X; Coloração H.E. **B:** Duodeno do grupo DP. Vilosidades revestidas por epitélio simples colunar com borda em escova (Seta longa); presença de células caliciformes (seta curta); Mastócito (seta azul); AU 400X; Coloração H.E. **C:** Duodeno do Grupo AM+M. Glândulas de Brünner na submucosa duodenal. AU 400X; Coloração H.E. **D:** Duodeno do Grupo DP+M. células com núcleo picnóticos (setas) AU 400X; Coloração H.E

Já nos duodenos dos grupos DP e DP+M evidenciou-se características morfológicas semelhantes aos grupos AM e AM+M. No entanto, o grupo DP apresentou algumas células com núcleo picnótico. No grupo DP+M esta característica foi reduzida (Figura 2)

5.3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Na análise histoquímica verificou-se que a expressão das mucinas aumentou progressivamente no grupo DP, conforme o aumento do número de células caliciformes Alcian Blue e PAS positiva (figura 3 e 4).

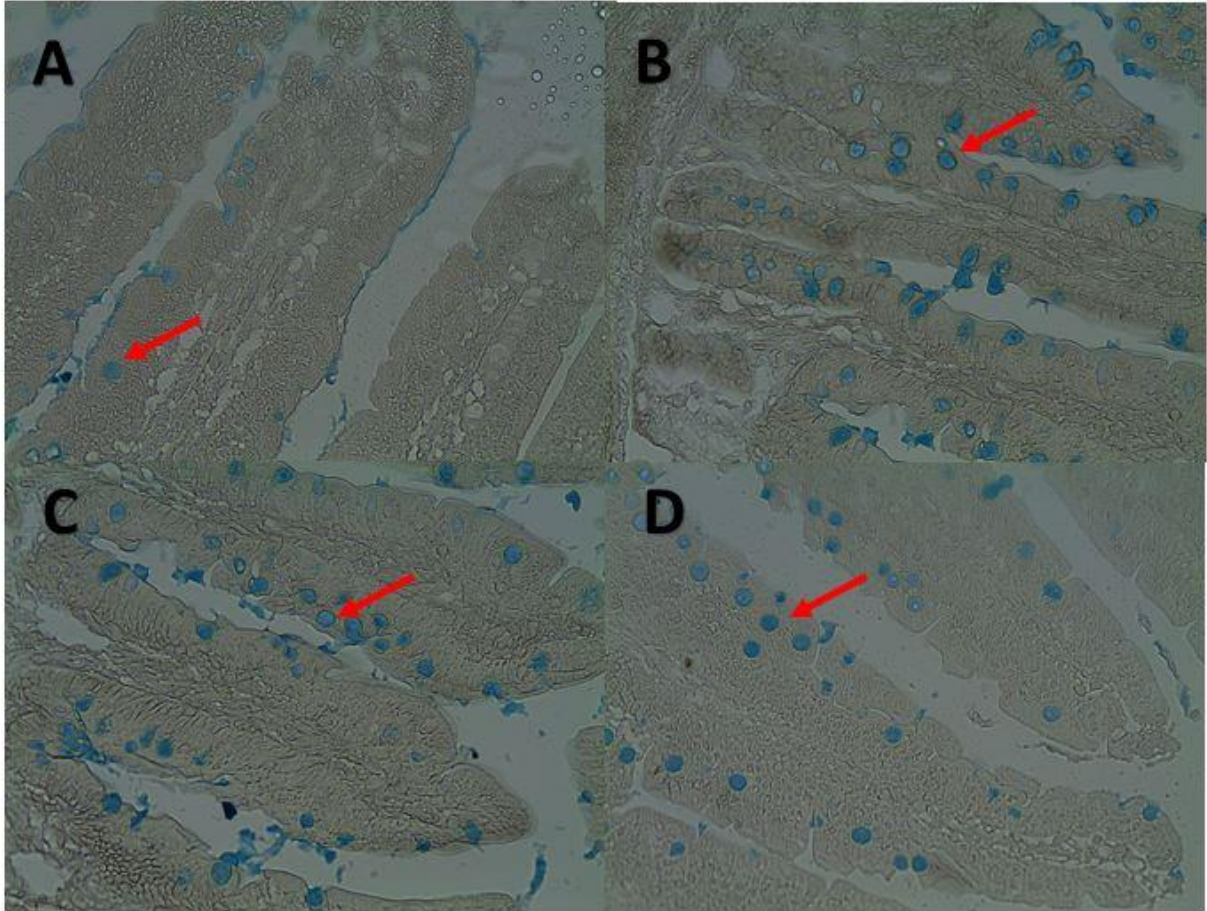


FIGURA 3: Fotomicrografias do Duodeno dos animais dos grupos experimentais. A, B, C e D: observar células caliciformes Alcian Blue positiva (setas vermelha); AU 100x. Coloração Alcian Blue.

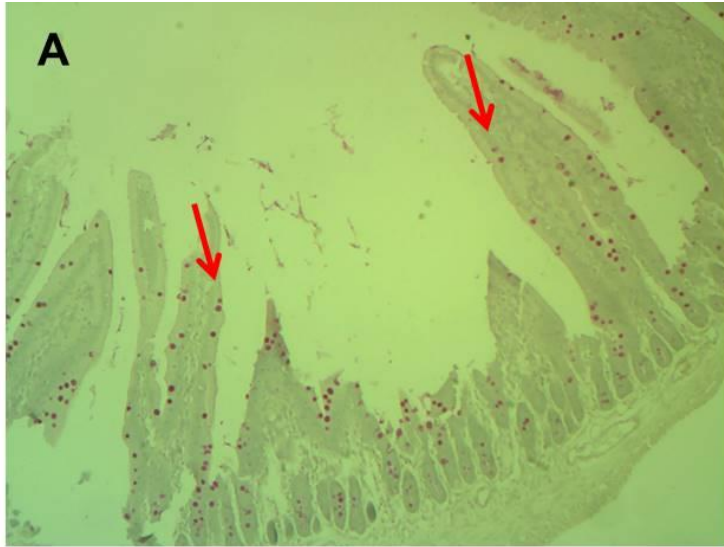


FIGURA 4: Fotomicrografia do Duodeno dos animais dos grupos experimentais. Imagem representativa: observar células caliciformes PAS positiva (setas vermelha); AU 100x. Coloração PAS

Em relação à histoquímica pela orceína, não houve diferenças significativas no aumento do número de fibras orceína positiva entre os animais dos grupos experimentais (Figura 5)

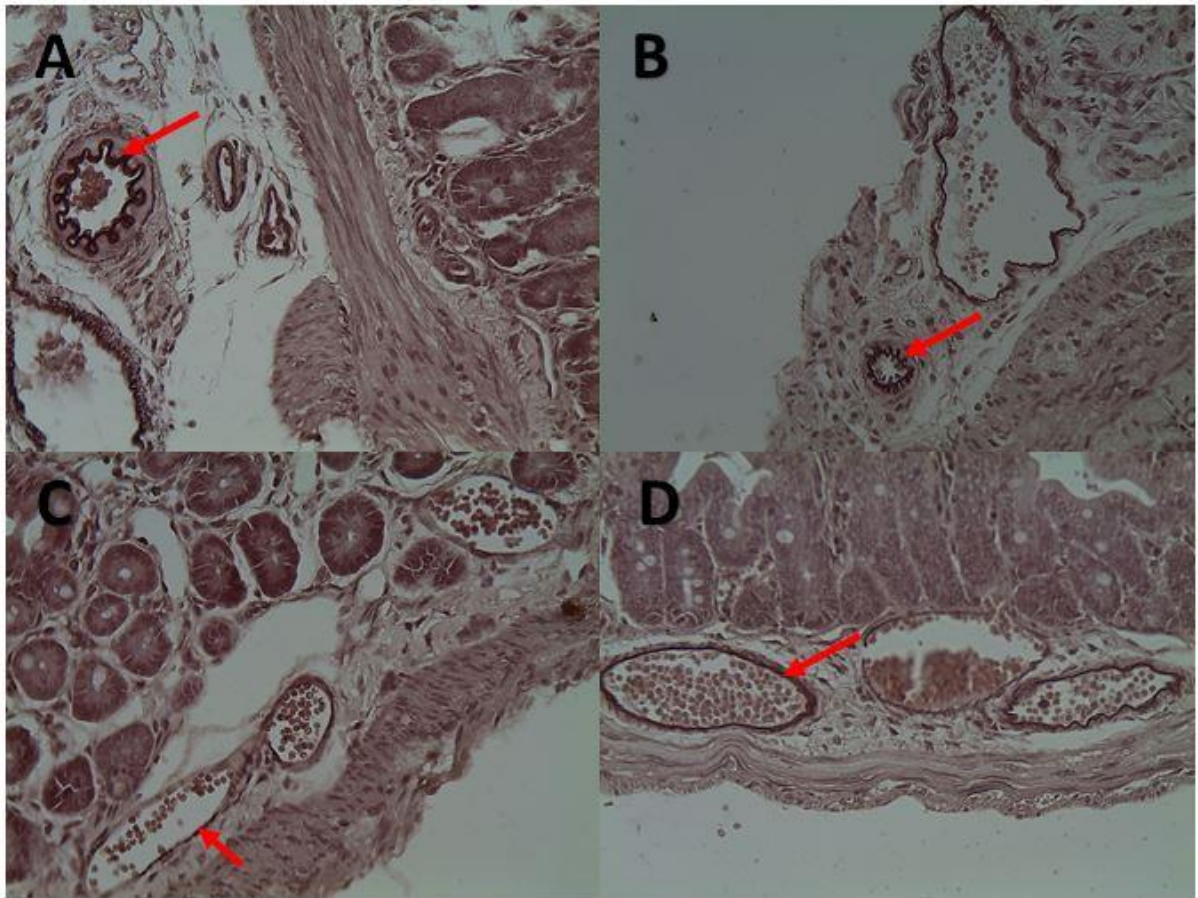


FIGURA 5: Fotomicrografia do duodeno do animais experimentais. A, B, C e D: observar estruturas orceína positiva (coloração roxa) (setas vermelha); AU 100x. Coloração Orceína

Em relação a contagem de células PAS e Alcian Blue positivas observou-se um maior aumento no grupo DP quando comparado com os demais grupos. A área individual e a área total das células PAS e Alcian Blue positivas não demonstraram diferenças significativas (Tabela 2)

Tabela 2: Morfometria da contagem de células caliciformes, área individual e área total das células PAS e Alcian Blue positivas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=10)	AM	AM+M	DP	DP+P	K
Quantidade de células	159,8±49,2a	166,0±32,2a	220,4±16,4b	159,5±15,8a	0.0024
Área Individual	39,6±9,5a	40,7±5,7a	49,6±6,9a	46,4±1,2a	0.1044
Área Total	6681,3±3299,1a	6940,4±2373,3a	11146,4±2292,8a	7438,9±656,5a	0.0728

Teste de Kruskal Wallis com post hoc de Dunn, nível de significância $p \leq 0,05$

5.4 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

Os resultados histomorfométricos demonstraram que o grupo DP e DP+M apresentaram as menores médias no comprimento das vilosidades em relação aos grupos experimentais AM e AM+M, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,005$) (Figura 6).

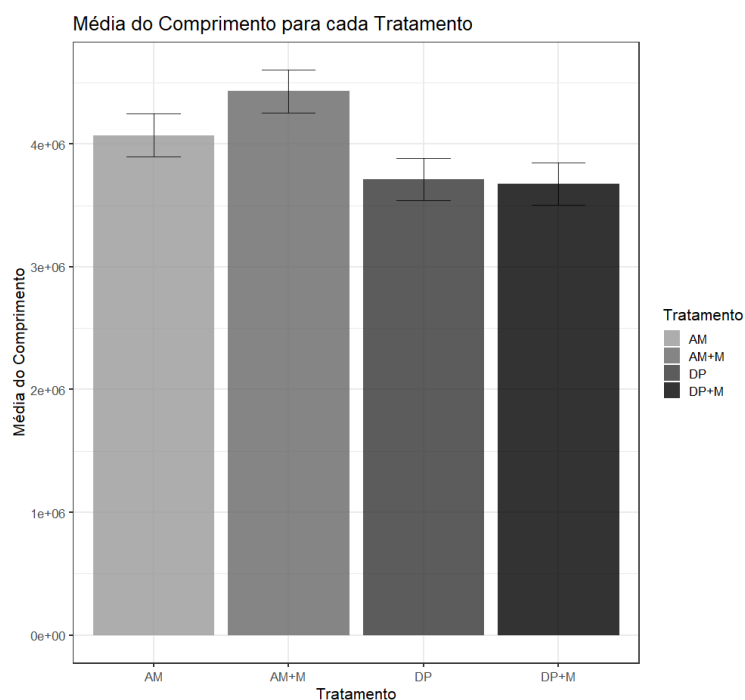


FIGURA 6. Comprimento das vilosidades dos grupos experimentais. O grupo AM+M apresentou maior média do comprimento comparado aos grupos DP e DP+M. ($p < 0,005$).

Na área de vilosidade a maior média foi do grupo AM diferenciando-se estatisticamente dos grupos AM+M e DP, que apresentaram as menores médias (Figura 7). O grupo DP+M apresentou uma área de vilosidade maior que o grupo DP e o grupo AM+M.

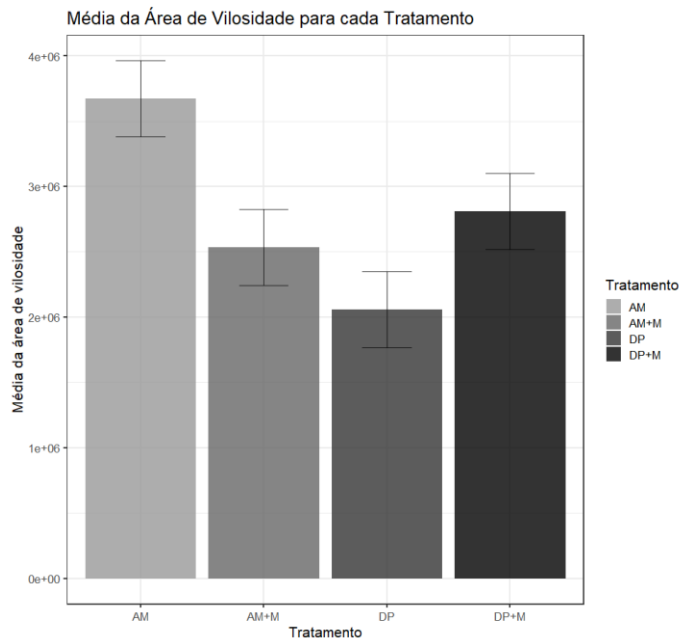


FIGURA 7. Média da área da vilosidade. O grupo AM apresentou maior área de vilosidade em comparação com os outros grupos. Os grupos AM+M e DP apresentaram as menores médias ($p < 0,005$).

Em relação a área das criptas, o grupo DP apresentou a menor média quando comparado com os demais grupos experimentais demonstrando diferença significativa. Os grupos AM, AM+M e DP+M não apresentaram diferenças significativas (Figura 8).

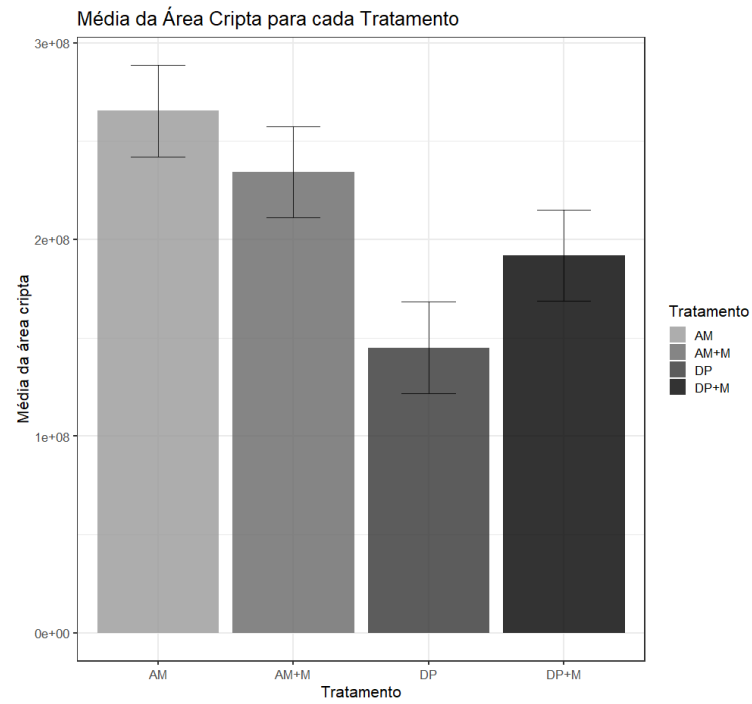


FIGURA 8. Área da cripta. O Grupo DP apresentou diferença significativa quando comparado com os demais grupos experimentais. ($p < 0,005$).

5.5 ANÁLISE FRACTAL E LACUNARIDADE

A análise por meio de imagem binarizada (Figura 9) do método do fractal e lacunaridade do duodeno dos animais dos grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas. Além disso, a área do lúmen, perímetro do lúmen, circular do lúmen, elipse do lúmen e feret do lúmen (diâmetro máximo) não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 3).

Tabela 3: Análise do duodeno dos animais dos grupos experimentais: fractal, lacunaridade, área do lúmen, perímetro do lúmen, circular do lúmen, elipse do lúmen, feret do lúmen.

GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=10)	AM	AM+M	DP	DP+M	p
Fractal	1,7713± 0,023a	1,7735± 0,022a	1,7953± 0,029a	1,7713± 0,016a	0,6019
Lacunaridade	0,4437± 0,100a	0,4417± 0,076a	0,4742± 0,048a	0,4363± 0,060a	0,7651
Área do Lúmen	1469255,28± 1512461,34a	1281575,07± 1254643,16a	1931626,09± 345513,10a	1917341,78± 458409,46a	0,61
Perímetro do Lúmen	31748,35± 6448,05a	27083,85± 10356,18a	38875,79± 5867,98a	25643,73± 2603,23a	0,08
Circular do Lúmen	0,02± 0,02a	0,02± 0,01a	0,02± 0,01a	0,04± 0,01a	0,090
Elipse do Lúmen	1,33± 0,18a	1,31± 0,23a	1,41± 0,15a	1,44± 0,25a	0,32
Feret do Lúmen	2154,14± 671,13a	1947,49± 518,71a	2511,47± 260,16a	2331,44± 93,66a	0,14

Teste de Kruskal Wallis com post hoc de Dunn, nível de significância $p \leq 0,05$

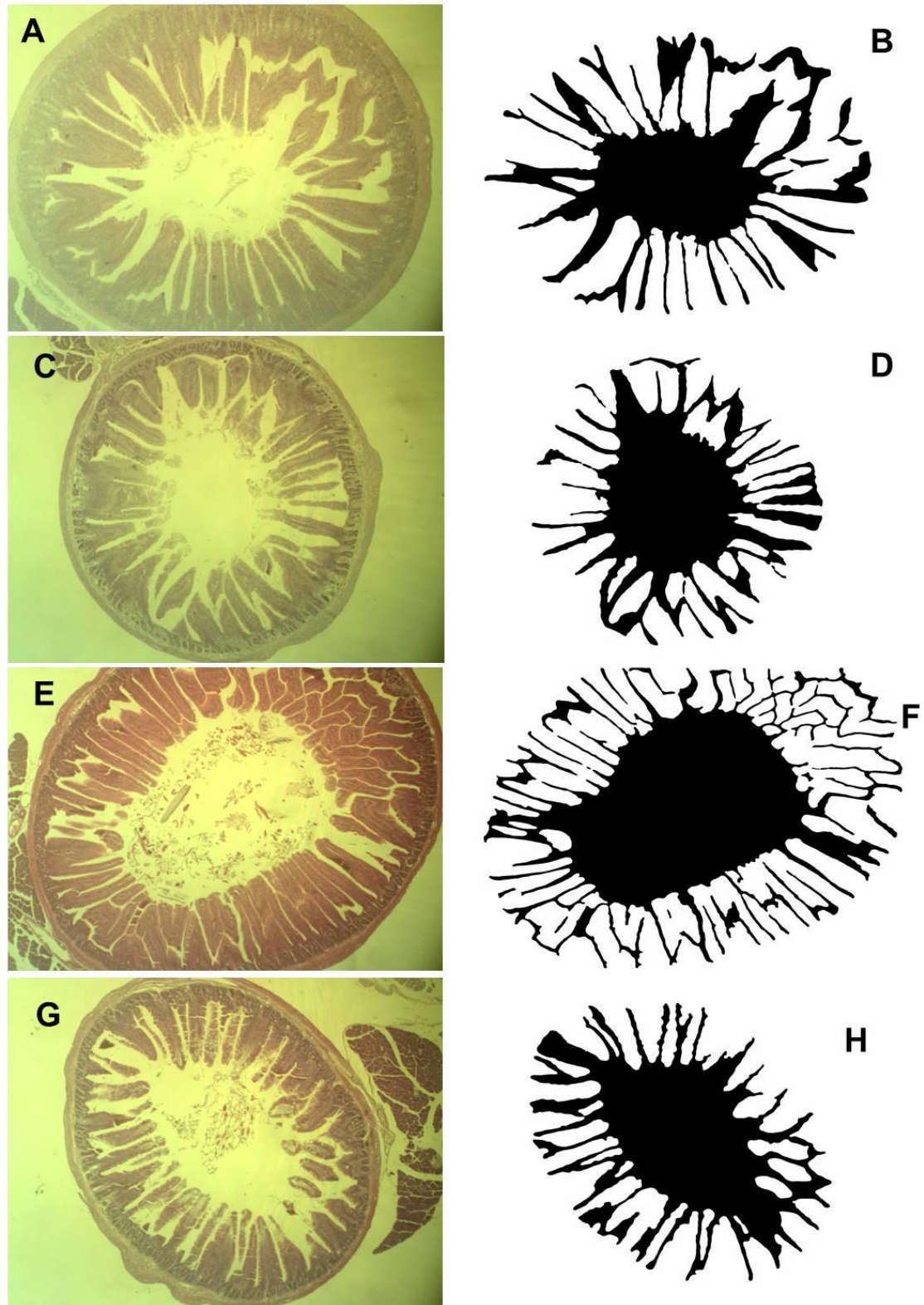


FIGURA 9: Imagens A, C, E e G- Fotomicrografias do Intestino duodeno dos grupos Experimentais: AM, AM+M, DP, DP+M respectivamente. B, D, F, H-imagem binarizada da segmentação do lúmen do intestino duodeno dos grupos experimentais: AM, AM+M, DP, DP+M respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, encontrou-se diferença no peso dos animais do grupo DP em relação aos demais grupos experimentais. Tais achados estão em desacordo com Tavares et al., (2020) onde não foram encontradas diferenças na massa corporal entre o desmame precoce e o desmame regular em ratos machos, mas estão de acordo com Pietrobon et al., (2020) em que no 21º dia, os machos submetidos ao desmame precoce mostraram menor massa corporal em comparação ao grupo controle. Teles Silva et al., (2019b) encontraram redução da massa corporal no 18º dia do grupo desmamado em relação ao grupo controle (amamentado) mas esta diferença foi reduzida no 60º dia, ficando com suas respectivas massas corporais similares. Logo, o tratamento com melatonina pode ter interferido no peso corporal dos animais, visto que os animais dos grupos DP+M apresentou massa corporal semelhante ao controle revertendo o processo.

Baptista et al (2008) encontraram grande quantidade de timócitos em apoptose nos ratos jovens submetidos à desnutrição proteica, corroborando com os presentes achados. Na histoquímica referente às células caliciformes produtoras de mucinas ácidas (coradas por Alcian Blue) e neutras (coradas por PAS) Rosa et al (2019) observaram diferença considerável na população de células caliciformes com restrição de alimentação quando comparado com o grupo controle. Sabe-se que suplementação de melatonina tem efeito sobre a expressão de mRNA de mucina2 derivada de células caliciformes (Muc2) e fator trifólio 3 (Tff3) no íleo, bem como no número de células caliciformes nas vilosidades do íleo (Da Costa, 2019). No entanto, Ren et al., (2018), observou que a melatonina não alterou o número de células caliciformes nas vilosidades do íleo em camundongos recém-desmamados, o que está de acordo com a presente pesquisa onde sugere-se que o tratamento com melatonina pode ter provocado uma alteração à normalidade onde o grupo DP+M se assemelha neste parâmetro histoquímico ao grupo AM. Em relação a coloração Orceína, sendo esta específica para fibras elásticas, Brito et al (2017) observaram a presença de mais fibras elásticas maduras em ratos adultos do que nos mais velhos.

Corroborando com os nossos resultados, Costa et al., (2019) avaliaram o mesmo parâmetro (altura/comprimento) das vilosidades de ratos desmamados precocemente e esta foi menor nos grupos desmamados em comparação aos ratos que foram amamentados. Estudos anteriores em que a suplementação de melatonina foi realizada (durante duas semanas após o 21º dia) teve efeito na

proporção de vilosidades/ cripta no duodeno, embora a melatonina diminuiu o comprimento das vilosidades e a profundidade da cripta no duodeno (Ren et al., 2018). Portanto, a nível histomorfométrico não houve nenhuma interferência da melatonina frente o comprimento das vilosidades sobre o grupo desmamado precocemente (DP).

No estudo de Crispel et al., (2019), onde foi encontrado que o desmame precoce resultou em criptas mais profundas, menor relação vilosidade/ cripta e menor área vilosa no dia 21. Resultado este que se perdurou até a idade adulta dos animais, ao avaliar no 90º dia, os animais que foram submetidos ao desmame precoce permaneceram com a menor área vilosa (Crispel et al., 2019). Já em relação ao grupo DP+M que apresentou uma área vilosa maior que o grupo DP, corrobora com o achados de Ren et al., (2018), o qual o grupo tratado com melatonina apresentou um alto índice de vilosidade/ cripta no íleo. Logo a melatonina reverteu os danos do desmame precoce frente a área da vilosidade.

Barbosa et al., (2019) relataram em seu estudo que o desmame precoce acarretou atrofia das criptas. Já Lemos, et al., (2019), afirmou que os animais do grupo (DP) apresentaram redução da profundidade das criptas intestinais. Corroborando com outros estudos, os quais mostraram uma diminuição na relação vilosidade/ cripta, em que tinha-se mais vilosidade do que criptas intestinais (Crispel et al., 2019; Rojas Castañeda et al., 1995).

Portanto a melatonina reverteu a atrofia das criptas intestinais visto que o grupo DP+M apresentou um aumento significativo em relação ao grupo DP frente a área das criptas. Já referente a área do lúmen através dos métodos de fractal e lacunaridade, foi encontrado no presente trabalho nenhuma diferença significativa entre os grupos, sugerindo assim que mesmo com diferença de comprimento no grupo AM+M com os demais grupos, o análise fractal e lacunaridade do lúmen não apresentaram alterações.

7. CONCLUSÃO

Dessa forma, conclui-se que o desmame precoce pode promover alterações morfológicas no duodeno, assim como diminuição da massa corpórea e que a melatonina exógena é capaz de atenuar alguns danos causados por este processo. Sugerimos que estes resultados devem ser utilizados em medidas preventivas e desenvolvimento de políticas públicas frente o aleitamento materno.

Referências:

- Abdalla, M. M. I. Central and peripheral control of food intake. *Endocrine Regulations*, v. 51, n. 1, 2017.
- Afeche SC, do Amaral FG, Villela DCM, Abrahão MV, Peres R, Cipolla-Neto J. Melatonin and the Pineal Gland. In: Romano E, De Luca S, editors. *New Research on Neurosecretory Systems*. New York: Nova Biomedical Books; 2008. p. 151-77
- Ahola, M. K.; Vapalahti, K. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. *Scientific Reports*, p. 1–9, 2017.
- Alves, M. B. et al. Increased palatable food intake and response to food cues in intrauterine growth-restricted rats are related to tyrosine hydroxylase content in the orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Behavioural Brain Research*, v. 287, p. 73–81, 2015.
- Amaral, F. G. D., & Cipolla-Neto, J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of endocrinology and metabolism*, 62(4), 472-479.
- Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 1974, 184(144), pp. 1341-1348.
- Barahona, M. J. et al. Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia*, n. October, p. 1–14, 2017.
- Baptista, J. D. S. (2008). Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica e à renutrição precocemente corrigida (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Barbosa, Mércia Maria Bezerra. Avaliação histomorfométrica da mucosa gástrica e intestinal em ratos Wistar submetidos ao desmame precoce. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- Barbosa, M. M. B., Aguiar Júnior, F. C. A. De, Maia, C. S., Tenório, F. Das C. Â. M., Oliveira, L. Dos S., & Medeiros, J. P. De. (2020). Aspectos morfológicos do estômago de ratos submetidos ao desmame precoce / Morphological aspects of the stomach of rats submitted to early weaning. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(5), 13876–13889. <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n5-200>
- Bertasso, I. M., Pietrobon, C. B., da Silva, B. S., Miranda, R. A., Bonfleur, M. L., Balbo, S. L., Manhães, A. C., Oliveira, E., de Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2020). Hepatic lipid metabolism in adult rats using early weaning models: sex-related differences. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1–10. <https://doi.org/10.1017/S2040174420000495>
- Bertrand, P. P., Bertrand, R. L., Camello, P. J., & Pozo, M. J. (2010). Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *Journal of pineal research*, 49(1), 23-34.
- Bittar, N. M. V. R., Zulian, J. G., Ogias, D., & Gama, P. (2016). Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning? *Nutrition*, 32(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.06.014>
- Brasil. (2015). Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. Ministério da Saúde.

- Brito, M. F. G., Barbosa, A. C. S., Silveira, M. P., & Chopard, R. P. (2017). Morphological and morphometric study of collagen and elastic fibers of the gastroduodenal junction of adult and old Wistar rats. *Journal of Morphological Sciences*, 30(4), 0-0.
- Bubenik, G. A. Thirty Four Years Since The Discovery Of Gastrointestinal melatonin. *Journal Of Physiology Any Pharmacology, Ontario*, v. 2, n. 59, p.33-51, 2008.
- Bubenik, G. A., & Brown, G. M. (1997). Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Neurosignals*, 6(1), 40-44.
- Bubenik, G. A., & Pang, S. F. (1994). The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation of food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback. *Journal of pineal research*, 16(2), 91-99.
- Bubenik, G. A., Pang, S. F., Hacker, R. R., & Smith, P. S. (1996). Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *Journal of pineal research*, 21(4), 251-256.
- Camacho, A. et al. Obesogenic diet intake during pregnancy programs aberrant synaptic plasticity and addiction-like behavior to a palatable food in o ff spring. *Behavioural Brain Research*, v. 330, n. May, p. 46–55, 2017.
- Caminha, Maria de Fátima Costa et al . Aspectos históricos, científicos, socioeconômicos e institucionais do aleitamento materno. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.*, Recife , v. 10, n. 1, p. 25-37, mar. 2010 .
- Carrascoza, Karina Camillo; COSTA JUNIOR, Áderson Luiz; MORAES, Antônio Bento Alves de. Fatores que influenciam o desmame precoce e a extensão do aleitamento materno. *Estud. psicol. (Campinas)*, Campinas, v. 22, n. 4, p. 433-440, dezembro de 2005.
- Chen, Chun-qi. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World Journal Of Gastroenterology, Munich*, v. 34, n. 17, p.3888-3896, 14 set. 2011.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005, 9, pp. 11-24. 1
- Crispel, Y., Shaoul, R., Khamaise, R., Sabo, E., & Hochberg, Z. (2019). Effect of weaning age on the small intestine mucosa of rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(9), 985–989. <https://doi.org/10.1139/apnm-2018-0454>
- Conde Silira, M . Melatonin treatment alters glucosensing capacity and mRNA expression levels of peptides related to food intake control in rainbow trout hypothalamus. *General And Comparative Endocrinology, Vigo- Spain*, v. 1, n. 178, p.131-138, 01 ago. 2012.
- Cummins, A. G. (2002). Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut*, 51(5), 748–754. <https://doi.org/10.1136/gut.51.5.748>
- Da Costa, A. V., Rattes, I. C., Silva, K. M., Rigonati, C. A. M., & Gama, P. (2019). Effect of early weaning on proliferation and differentiation of intestinal mucosa. *The FASEB Journal*, 33(1_supplement), 762-1.
- da Costa, M. A. S., dos Santos Silva, R. R., da Silva, M. E., da Silva Linhares, L. H., Nascimento, T. O., de Oliveira, M. L. F., ... & Tenorio, F. C. A. M. (2020). Efeito da melatonina exógena frente ao trato digestório da prole de camundongos submetidos ao desmame precoce: uma revisão sistemática. *Research, Society and Development*, 9(10),

e5009108869-e5009108869.

- Da Silva, A. A. M. et al. Undernutrition during pregnancy and lactation increases the number of fos-cells in the reward system in response to a 5-HT₆ receptor agonist in male adolescent rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, p. 1– 6, 2017.
- Da Silva Marques, V. G. P., Silva, M. P. B., Soares, I. L., de Lima Oliveira, B., de Sousa, F. L. L., da Silva, E. R., ... & de Almeida, L. F. (2020). Fatores que influenciam o desmame precoce. *Research, Society and Development*, 9(10), e6249108910-e6249108910.
- De Souza, J. A. et al. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite*, v. 123, p. 114–119, 2018.
- De Souza, M., Araujo, S., de Oliveira, N., Porfírio, P., Silveira, A., & Viera, V. (2018, September 27). *O Efeito Protetor do Aleitamento Materno Contra Obesidade Infantil*. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1674864>
- de Talamoni, N. T., Areco, V., Rodríguez, V., Marchionatti, A., & Pérez, A. (2017). Melatonin, Gastrointestinal Protection, and Oxidative Stress. In *Gastrointestinal Tissue* (pp. 317-325). Academic Press.
- EE, J. H. L. et al. Early life stress experience may blunt hypothalamic leptin signalling. *Journal of Biosciences*, 2013.
- Feitosa, M. E. B., Silva, S. E. O. Da, & Silva, L. L. Da. (2020). Aleitamento materno: causas e consequências do desmame precoce. *Research, Society and Development*, 9(7), e856975071. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.5071>
- Ferreira, R. A. P., de Sá Ramos, P., Salvador, A. A. A., da Silva, A. A. N., Rossetti, F. X., dos Anjos Tamasia, G., ... & de Brito Bello, S. R. (2019). O efeito do uso da melatonina no tratamento das doenças inflamatórias intestinais: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, 8(9), 12.
- Friedman, J. M.; Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals *Nature*, 1998.
- Ferro Cavalcante, T. C. et al. Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rats. *Physiology and Behavior*, v. 165, p. 35–42, 2016.
- Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP.(2001) Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men an women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Geoffriau M, Claustrat B, Veldhuis J. Estimation of frequently sampled nocturnal melatonin production in humans by deconvolution analysis: evidence for episodic or ultradian secretion. *J Pineal Res*. 1999, 27, pp. 139-144.
- Gila-Díaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., López de Pablo, Á. L., Sáenz de Pipaón, M., & Ramiro-Cortijo, D. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. *Nutrients*, 11(6), 1307. <https://doi.org/10.3390/nu11061307>.
- Gomes, O. A., Castelucci, P., de Vasconcellos Fontes, R. B., & Liberti, E. A. (2006). Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of

- the rat small intestine: a quantitative morphological study. *Autonomic Neuroscience*, 126, 277-284.
- Gracia-Rubio, I. et al. Maternal separation induces neuroinflammation and longlasting emotional alterations in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 65, p. 104–117, 2016.
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr: Top Med Chem*. 2002, 2, pp. 167-179. 25. Haimov N, Lavie P, Laudon M, Herer P, Vigder C, Zisapel N. Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep*. 1995, 18(7), pp. 598-603. 26.
- Ichisato, Sueli Mutsumi Tsukuda; Shimo, Antonieta Keiko Kakuda. ALEITAMENTO MATERNO E AS CRENÇAS ALIMENTARES. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto, v. 9, n. 5, p. 70-76, set. De 2002.
- Juan de solis, A. et al. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation 53 of hypothalamic feeding circuits. *Molecular Metabolism*, v. 5, n. 3, p. 198–209, 2016.
- Junqueira, L. C. U.; Carneiro, J.; ABRAHAMSOHN, P. *Histologia Básica*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- Katzer, D., Pauli, L., Mueller, A., Reutter, H., Reinsberg, J., Fimmers, R., Bartmann, P., & Bagci, S. (2016). Melatonin Concentrations and Antioxidative Capacity of Human Breast Milk According to Gestational Age and the Time of Day. *Journal of Human Lactation*, 32(4), NP105–NP110. <https://doi.org/10.1177/0890334415625217>
- Keen, C. L., Lönnerdal, B., Clegg, M., & Hurley, L. S. (1981). Developmental Changes in Composition of Rat Milk: Trace Elements, Minerals, Protein, Carbohydrate and Fat. *The Journal of Nutrition*, 111(2), 226–236. <https://doi.org/10.1093/jn/111.2.226>
- Lee, P. C., & Lebenthal, E. (1983). Early Weanling and Precocious Development of Small Intestine in Rats: Genetic, Dietary or Hormonal Control. *Pediatric Research*, 17(8), 645–650. <https://doi.org/10.1203/00006450-198308000-00008>
- Lemos, G. T. D. L. (2019). Avaliação histomorfométrica do intestino delgado de ratos wistar adultos submetidos ao desmame precoce (Bachelor's thesis).
- Lin, C.-H., Correia, L., Tolia, K., Gesell, M. S., Tolia, V., Lee, P.-C., & Luk, G. D. (1998). Early Weaning Induces Jejunal Ornithine Decarboxylase and Cell Proliferation in Neonatal Rats. *The Journal of Nutrition*, 128(10), 1636–1642. <https://doi.org/10.1093/jn/128.10.1636>
- Lin, R., Wang, Z., Cao, J., Gao, T., Dong, Y., & Chen, Y. (2020). Role of melatonin in intestinal mucosal injury induced by restraint stress in mice. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 342-351.
- Lira, L. A. et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, ago. 2014
- Lopes de souza, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *The European journal of neuroscience*, v. 27, n. 6, p. 1400–8, mar. 2008b.

- Ma, N., Zhang, J., Reiter, R. J., & Ma, X. (2020). Melatonin mediates mucosal immune cells, microbial metabolism, and rhythm crosstalk: a therapeutic target to reduce intestinal inflammation. *Medicinal research reviews*, 40(2), 606-632.
- Mangabeira, Simone Brito. Benefícios e importância do aleitamento materno. Núcleo de educação em saúde coletiva-UFMG, Minas Gerais, 2014.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005, 165, pp. 139-149. 39
- Mazzocchi, A., Giannì, M. L., Morniroli, D., Leone, L., Roggero, P., Agostoni, C., De Cosmi, V., & Mosca, F. (2019). Hormones in Breast Milk and Effect on Infants' Growth: A Systematic Review. *Nutrients*, 11(8), 1845. <https://doi.org/10.3390/nu11081845>
- Messner, M., Huether, G., Lorf, T., Ramadori, G., & Schwörer, H. (2001). Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life sciences*, 69(5), 543-551.
- Michaels, C. C.; Holtzman, S. G. Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. v. 89, p. 735–741, 2006.
- Moderie, C., Van der Maren, S., Paquet, J., & Dumont, M. (2020). Home versus laboratory assessments of melatonin production and melatonin onset in young adults complaining of a delayed sleep schedule. *Journal of Sleep Research*, 29(3), e12905.
- 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.
- Montague, C. T. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe earlyonset obesity in humans. *Nature*, v. 387, n. 6636, p. 903–908, 1997.
- Monteiro, J. C. Dos S., Guimarães, C. M. De S., Melo, L. C. De O., & Bonelli, M. C. P. (2020). Breastfeeding self-efficacy in adult women and its relationship with exclusive maternal breastfeeding. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 28. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.3652.3364>
- Moura, Solange Maria Sobottka Rolim de; ARAUJO, Maria de Fátima. A maternidade na história e a história dos cuidados maternos. *Psicol. cienc. prof.*, Brasília , v. 24, n. 1, p. 44-55, mar. 2004 .
- Nakamura, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5ht1b mRNA receptor expression in male mice from early weaning. *Behavioural Brain Research*, v. 187, n. 2, p. 442–448, 2008.
- Oliveira, Maria Inês Couto de; Camacho, Luiz Antonio Bastos; SOUZA, Ivis Emília de Oliveira. Promoção, proteção e apoio à amamentação na atenção primária à saúde no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma política de saúde pública com base em evidência. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1901-1910, dezembro de 2005.
- Oliveira, S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behavioural Processes*, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011.
- Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Revista Da*

- Associação Médica Brasileira*, 62(6), 584–593. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.06.584>
- Pandi-Perumal SR . Dim light melatonin onset (DLMO): A tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog in Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007, 31, pp. 1-11. 47.
- Park, Y. S., Kim, S. H., Park, J. W., Kho, Y., Seok, P. R., Shin, J. H., ... & Kim, E. K. (2020). Melatonin in the colon modulates intestinal microbiota in response to stress and sleep deprivation. *Intestinal Research*, 18(3), 325.
- Poon, A. M. S., Chow, R. H., Mak, A. S. Y., & Pang, S. F. (1997). Autoradiographic localization of 2 [125I] iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *Journal of pineal research*, 23(1), 5-14.
- Pietrobon, C. B., Miranda, R. A., Bertasso, I. M., Mathias, P. C. De F., Bonfleur, M. L., Balbo, S. L., Reis, M. A. De B., Latorraca, M. Q., Arantes, V. C., Oliveira, E., Lisboa, P. C., & Moura, E. G. (2020). Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in Wistar rats of both sexes. *The Journal of Physiology*, 598(3), 489–502. <https://doi.org/10.1113/JP278833>
- Rajaratnam SM, Dijk DJ, Middleton B, Stone BM, Arendt J. Melatonin phase-shifts human circadian rhythms with no evidence of changes in the duration of endogenous melatonin secretion or the 24-hour production of reproductive hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88(9), pp. 4303-4309. 51.
- Reiter, Russel J. Gastrointestinal tract and melatonin: reducing pathophysiology. *Gastroenterologia Polska, Texas – Usa*, v. 3, n. 17, p.213-218, 2010.
- Ren, W., Wang, P., Yan, J., Liu, G., Zeng, B., Hussain, T., ... & Zhu, G. (2018). Melatonin alleviates weanling stress in mice: involvement of intestinal microbiota. *Journal of pineal research*, 64(2), e12448.
- Reppert, S. M., & Klein, D. C. (1978). Transport of maternal [3H]melatonin to suckling rats and the fate of [3H]melatonin in the neonatal rat. *Endocrinology*, 102(2), 582–588. <https://doi.org/10.1210/endo-102-2-582>
- Rocha, M. L. M. et al. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. *Neuroscience*, v. 256, p. 379– 391, 2014.
- Rodrigues, Nathália de Abreu; Gomes, Ana Cecília de Godoy. Aleitamento materno: fatores determinantes do desmame precoce. *Enfermagem Revista*, Belo Horizonte, v. 17, n. 1, p. 30-48, set. 2016. ISSN 2238-7218
- Rodrigues Neto, F. (2020). Aleitamento materno e educação em saúde: uma revisão integrativa da literatura.
- Rojas Castañeda, J. C., Viguera Villaseñor, R. M., Vences Mejía, A., & Carmona Mancilla, A. (1995). [The effects of early and late weaning on the development of the small intestine in the rat: a light-microscopic morphometric study]. *Revista de Gastroenterologia de Mexico*, 60(2), 70–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638535>
- Rosa, a. C. S., Siervo, g. E., Fernandes, g. S. A., & Schneider, l. C. L. (2019). Análise quantitativa das células caliciformes e colágeno tipo ie iii no íleo de ratos expostos a restrição de sono.

- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2016). Histologia. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- Roth T, Stubbs C, Walsh JK. Ramelton (TAK-375), a selective MT1/MT2-receptor agonist, reduces latency to persistent sleep in a model of transient insomnia related to a novel sleep environment. *Sleep*. 2005, 28(3), pp. 303-307.
- Ryu, V. et al. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. p. 1355–1362, 2008.
- Santos, E. M. Dos, Silva, L. S. Da, Rodrigues, B. F. De S., Amorim, T. M. A. X. De, Silva, C. S. Da, Borba, J. M. C., & Tavares, F. C. De L. P. (2019). Avaliação do aleitamento materno em crianças até dois anos assistidas na atenção básica do Recife, Pernambuco, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 24(3), 1211–1222. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018243.126120171>
- Schwartz, G. J.; Zeltser, L. M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. *Annual review of nutrition*, v. 33, p. 1–21, jan. 2013.
- Shimozuru, M. et al. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats. *Developmental Psychobiology*, v. 49, n. 4, p. 343–350, 2007.
- Silva, M. C. et al. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. v. 5, p. 219–228, 2014.
- Shinder, D. A., Usmanova, O. D., & Rakhimov, K. R. (1992). [Changes in the saccharase and lactase activities of the small intestine in suckling rats prematurely weaned from the nursing dam]. *Fiziologicheskii Zhurnal SSSR Imeni I. M. Sechenova*, 78(1), 53–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330717>
- Shu, R., David, E. S., & Ferraris, R. P. (1998). Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274(2), G232–G239. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.2.G232>
- Spencer, W. C.; Deneris, E. S. Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, 2017.
- Stojakovic, A. et al. Effects of nicotine on homeostatic and hedonic components of food intake. 2017.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (forc). Versão 7.1. São Paulo, 2020. [Acesso em: 18/11/20]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.
- Tan, D. X., Xu, B., Zhou, X., & Reiter, R. J. (2018). Pineal calcification, melatonin production, aging, associated health consequences and rejuvenation of the pineal gland. *Molecules*, 23(2), 301.
- Tavares, G. A., do Amaral Almeida, L. C., de Souza, J. A., de Farias, V. V., de Souza, F. L., de Andrade Silva, S. C., Lagranha, C. J., Kaeffer, B., & de Souza, S. L. (2020). Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. *Behavioural Brain Research*, 383, 112531. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112531>
- Teles Silva, M., Mesquita da Silva, K., Campos Rattes, I., Maria Agostini Zonta, G., Vasques

- da Costa, A., Galvão Figueredo Costa, R., Karen Cordeiro Nogueira, L., Ogias, D., & Gama, P. (2019). Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 196. <https://doi.org/10.3390/ijms21010196>
- Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, noncone photoreceptor system in humans. *J Physiol*. 2001, 535, pp. 261-267.
- Thor, Pj. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. *And Pharmacology*, Cacrow – Poland, n. , p.97-103, dez. 2008
- Tolosa de Talamoni, Nori (2017). Gastrointestinal Tissue || Melatonin, Gastrointestinal Protection, and Oxidative Stress. , (), 317–325.
- Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-Garcia P, et al. MT1 melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88, pp. 450-458.
- Touitou Y, Bogdan A. Promoting adjustment of the sleep– wake cycle by chronobiotics. *Physiology & Behavior*. 2007, 90, pp. 294-300.
- . Van den Heuvel CJ, Ferguson SA, Macchi MM, Dawson D. Melatonin as a hypnotic: Con. *Sleep Med Rev*. 2005, 9, pp. 71-80.
- Wu, H., Liu, J., Yin, Y., Zhang, D., Xia, P., & Zhu, G. (2019). Therapeutic opportunities in colorectal cancer: focus on melatonin antioncogenic action. *BioMed Research International*, 2019.
- Zanchi, D. et al. The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review. v. 80, n. February, p. 457–475, 2017.
- Zonta, G. M. A. (2017). Efeitos tardios do desmame precoce sobre a renovação e diferenciação do epitélio gástrico em ratos, (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Zulian, J. G., Hosoya, L. Y. M., Figueiredo, P. M., Ogias, D., Osaki, L. H., & Gama, P. (2017). Corticosterone activity during early weaning reprograms molecular markers in rat gastric secretory cells. *Scientific Reports*, 7(1), 45867. <https://doi.org/10.1038/srep45867>.

ANEXO A– CEUA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 03 de julho de 2020

Ofício nº 39/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Sônia Pereira Leite**

Departamento de Histologia e Embriologia/UFPE

processo nº0023/2020

Certificamos que a proposta intitulada “**Investigação do efeito do tratamento da melatonina sobre o sistema digestório na prole de ratos wistar após o desmame precoce**”, registrado com o nº0023/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Sônia Pereira Leite** 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 30/06/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	agosto/2020 a fevereiro/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	52
Peso/Idade	30-50g e 280-300g / 15, 21 e 90 dias
Sexo	macho () e Fêmea ()
Origem: Biotério de Criação	Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da (UFPE)
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da (UFPE)

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

ANEXO B – ARTIGO QUALIFICAÇÃO

Research, Society and Development, v. 9, n. 10, e5009108869, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8869>

Efeito da melatonina exógena frente ao trato digestório da prole de camundongos submetidos ao desmame precoce: uma revisão sistemática

Effect of exogenous melatonin on the digestive tract of offspring of mice submitted to early weaning: a systematic review

Efecto de la melatonina exógena en el tracto digestivo de la descendencia de ratones sometidos a destete temprano: una revisión sistemática

Recebido: 28/09/2020 | Revisado: 30/09/2020 | Aceito: 03/10/2020 | Publicado: 08/10/2020

Marcos Aurélio Santos da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-9444>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: marcosxp17@gmail.com

Rodrigo Reges dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0141-5649>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: rodrigoregesufpe@gmail.com

Maria Eduarda da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5369-6051>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: mariaeduardaufpe@gmail.com

Luiz Henrique da Silva Linhares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0768-9184>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: lnhares.lui8@gmail.com

Thiago Oliveira Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6288-8557>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: thiago.13oliveira@hotmail.com

Maria Luísa Figueira de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9006-8794>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: malufigueira_2@outlook.com