

LUCIANA HARUMI OSAKI

**O PAPEL DO ALIMENTO, DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE  
ALFA E DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NA  
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO EPITÉLIO GÁSTRICO DE RATOS**

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

São Paulo

2009

LUCIANA HARUMI OSAKI

**O PAPEL DO ALIMENTO, DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE  
ALFA E DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NA  
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO EPITÉLIO GÁSTRICO DE RATOS**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Gama

São Paulo

2009

## RESUMO

Osaki LH. O papel da dieta, do fator de crescimento transformante alfa e do receptor do fator de crescimento epidermal na proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento pós-natal do epitélio gástrico de ratos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A interrupção abrupta da amamentação no desmame precoce (DP) causa mudanças na mucosa gástrica, como o aumento da proliferação celular e da expressão do Fator de Crescimento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ). No presente trabalho, avaliamos o papel desse peptídeo por meio de seu receptor EGFR no controle do crescimento gástrico. Ratos Wistar com 15 dias de vida pós-natal foram divididos em dois grupos: amamentado (controle) e DP, no qual os filhotes foram separados da mãe e alimentados com uma pasta de ração. O desmame precoce aumentou o número de células imuno-marcadas para o EGFR, que é expresso principalmente em células mucosas superficiais e parietais. A diferenciação de células mucosas do colo foi estudada por meio de reações com PAS-AB ou lectina BSII, que mostraram um aumento significativo dessa população celular a partir do 17<sup>o</sup> dia de DP. Paralelamente, observamos que a expressão de mucina 6 também aumentou. Após a inibição do EGFR com AG1478, avaliamos a proliferação celular pelos índices de síntese de DNA (IS) e mitótico (IM), e observamos redução de ambos, acompanhado de diminuição no número de células mucosas do colo. As proteínas envolvidas na sinalização de EGFR e ciclo celular foram estudadas por Western Blot. O desmame precoce induziu níveis elevados de p-ERK1/2 e p-Src no 17<sup>o</sup> dia e não alterou Akt, p21 e p27. Nós sugerimos que o padrão alimentar influencia a proliferação e diferenciação no epitélio gástrico, e que TGF $\alpha$ /EGFR podem regular esses processos durante o desenvolvimento pós-natal, provavelmente por ativação das vias de sinalização de MAPK e Src.

Palavras-chave: Estômago. Fator de Crescimento Transformante  $\alpha$ . Receptor do Fator de Crescimento Epidermal. Desenvolvimento pós-natal.

## ABSTRACT

Osaki LH. The role of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in the proliferation and differentiation of the gastric epithelium of developing rats [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The abrupt interruption of suckling at early weaning (EW) causes changes in the gastric mucosa, such as increased cell proliferation and Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) expression. We evaluated the role of this peptide and its receptor EGFR in the control of gastric growth. 15-d-old Wistar rats were splitted into two groups: suckling (control) and EW, in which pups were separated from the dam and fed with powdered chow. Early weaning increased the number of immunolabeled cells for EGFR, which is mainly expressed in surface mucous and parietal cells. The mucous neck cells differentiation was studied by PAS-AB or BSII lectin reactions, which showed a significant increase in this cell population beginning at 17 days. We also observed increased mucin 6 mRNA expression. After EGFR inhibition with AG1478, we investigated the cell proliferation by calculating the DNA synthesis (SI) and mitotic (MI) indexes, and we found a reduction in both of them, followed by decreased number of mucous neck cells. Proteins involved in EGFR signaling pathways and cell cycle were studied by Western Blot. Early weaning induced p-ERK1/2 and p-Src increased levels at 17 days and did not change Akt, p21 and p27. We suggest that the diet pattern influences the proliferation and differentiation in gastric epithelium, and that TGF $\alpha$ /EGFR can regulate these processes throughout the postnatal development, probably by activating MAPK and Src signaling pathways.

Key words: Stomach. Transforming growth factor alpha. Epidermal growth factor receptor. Postnatal development.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento e a maturação do trato gastrintestinal são coordenados por diversos elementos, incluindo a dieta, hormônios, fatores de crescimento e programa genético (Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al., 2005; De Andrade Sá et al., 2008). A maior parte das modificações ontogênicas ocorre durante as primeiras três semanas de vida pós-natal, quando o filhote passa por uma transição de dieta, da amamentação para o desmame (Henning, 1981). Poucos estudos se concentram nos mecanismos de interação entre os fatores mencionados acima, os quais garantem o desenvolvimento equilibrado do epitélio gástrico.

O colostro e o leite são as principais fontes de nutrição do animal recém-nascido e contêm anticorpos, nutrientes e fatores de crescimento que são importantes nessa fase de desenvolvimento. Estudos do nosso laboratório mostraram que alterações no padrão alimentar induzem modificações na mucosa gástrica. Alvares e Gama (1993) observaram que o jejum estimula a proliferação celular na mucosa gástrica de ratos durante a fase de amamentação, porém esse efeito é oposto em animais adultos, que se alimentam de ração. Ainda neste sentido, a fase de desmame representa uma transição para a resposta ao jejum, e aos 22 dias não há alteração da proliferação celular gástrica (Alvares e Gama, 1993). Quando a amamentação é interrompida e substituída por alimento sólido no modelo do desmame precoce, já aos 18 dias observa-se que o jejum inibe a proliferação celular no estômago desses animais, ou seja, os filhotes apresentam uma resposta, semelhante à de um animal adulto (Gama e Alvares, 2000).

O desmame precoce induz outras modificações no epitélio gastrintestinal, destacando-se o aumento na atividade de enzimas intestinais e gástricas (Lee e Lebenthal, 1983; Lin et al., 1998, 2001), o que sugere maturação acelerada da mucosa. Como os níveis de corticosterona aumentam logo após o desmame precoce, é possível que esse hormônio esteja envolvido no amadurecimento acelerado, uma vez que as alterações enzimáticas no estômago e no intestino ocorrem somente após a elevação da corticosterona (Yeh et al., 1986; Lin et al., 1998).

Dentre as moléculas que podem influenciar o crescimento pós-natal do estômago estão os fatores de crescimento transformante  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ ).

Estudos de nosso laboratório mostraram que a mucosa gástrica expressa TGF $\beta$  e seus receptores ao longo do desenvolvimento peri e pós-natal e que tanto a administração de hidrocortisona quanto o desmame precoce induzem diferencialmente a expressão desses peptídeos (De Andrade e Sá et al., 2003; Ogias et al., 2006; 2009). O TGF $\alpha$  e o seu receptor, o EGFR, também estão presentes na mucosa gástrica de ratos e, entre suas funções conhecidas estão o estímulo à proliferação, migração, diferenciação celular e a inibição de secreção ácida (Rhodes et al., 1986; Nakajima e Kuwayama, 1993, 1995; Tétrault et al., 2005). Nós demonstramos que o TGF $\alpha$  também é responsivo à modificação do padrão alimentar, de modo que o desmame precoce aumenta sua distribuição e concentração na mucosa gástrica (Osaki et al., submetido).

Portanto, o padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento influenciam o desenvolvimento pós-natal do epitélio gastrintestinal, mas a interação entre esses elementos, que deve garantir o crescimento normal do tecido, ainda precisa ser esclarecida.

## **1.1 Estômago**

O estômago é uma dilatação do tubo digestório e no rato pode ser dividido em três regiões distintas histologicamente: córnea, corpo e antro. A região da córnea possui um epitélio estratificado queratinizado, enquanto o corpo e o antro são formados por um epitélio simples secretor com glândulas tubulares que se abrem em fossetas para a luz do estômago (Lee et al., 1982).

A região do corpo compreende a maior parte da mucosa glandular e, no animal adulto, cada uma de suas glândulas pode ser subdividida em três regiões: istmo, colo e base. A superfície luminal e as fossetas são revestidas por células secretoras de muco denominadas, respectivamente, células mucosas superficiais e da fosseta. As glândulas gástricas são compostas por populações distintas de células epiteliais, representadas por: células mucosas do colo, também produtoras de muco; células parietais, secretoras de ácido clorídrico; e células zimogênicas, secretoras de pepsinogênio (Helander, 1981; Ekelund et al., 1985). Além dessas células epiteliais, ainda estão presentes células enteroendócrinas (Johnson, 1985; Date et al., 2000).

As células epiteliais gástricas originam-se a partir de células-tronco localizadas na interface istmo-colo da glândula (Karam e Leblond, 1993a; Brittan e Wright, 2004). Estudos morfológicos sugerem que a partir dessas células-tronco surgem células pré-mucosas que migram em direção à fosseta e se diferenciam em células mucosas superficiais; células pré-parietais que têm migração bi-direcional e originam células parietais; e células pré-mucosas do colo que migram em direção à região do colo, onde se diferenciam em células mucosas do colo, as quais continuam migrando em direção à base da glândula para originar células pré-zimogênicas e zimogênicas (Karam, 1993; Karam e Leblond, 1993b, 1993c).

Hanby et al. (1999) haviam proposto que as células mucosas do colo constituem uma linhagem celular distinta, importante e funcional, e não um estado transitório na via de diferenciação de células zimogênicas, e essa idéia foi apoiada por outros pesquisadores (Dixon, 2001; Morgenstern et al., 2001). Entretanto, a teoria de origem das células zimogênicas a partir de células mucosas do colo é bem aceita e tem sido confirmada por outros estudos (Judd et al., 1999; Ramsey et al., 2007; Lagapa et al., 2008). Ramsey et al. (2007) mostraram que a deleção do gene *Mist1* aumenta o número de células mucosas do colo e sugeriram que essa resposta resulta de uma diminuição na transição de células mucosas do colo para células zimogênicas. Em um estudo sobre a clonagem das unidades gástricas, McDonald et al. (2008) observaram que todas as células epiteliais originam-se de uma ancestral comum e a presença de células mucosas do colo positivas para pepsinogênio I é consistente com a teoria proposta por Karam e Leblond (1993b, 1993c).

As células mucosas do colo são pequenas, triangulares e se localizam entre as células parietais da região do colo da glândula. Seus núcleos são basais e o citoplasma é repleto de mucina, que é marcada positivamente com a reação de ácido periódico-Schiff (PAS). Além das mucinas, essas células secretam outros peptídeos que desempenham importante papel protetor no epitélio gástrico, como os fatores “trefoil” (Hanby et al., 1999). As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que consistem de uma estrutura protéica com açúcares ligados aos resíduos de serina e treonina por pontes O-glicosídicas. Diversos genes que codificam mucinas já foram identificados e, em humanos, a mucosa gástrica normal expressa principalmente as mucinas 1, 5AC e 6 (Ho et al., 1995). Na região do corpo, a mucina 6 é expressa exclusivamente pela célula mucosa do colo, enquanto

a expressão da mucina 5AC está restrita às células mucosas superficiais e da fosseta (De Bolós et al., 1995; Bartman et al., 1998; Reis et al., 2000). Em humanos, a expressão de RNAm para as mucinas 5AC e 6 no estômago é observada em fetos com 23 semanas (Reid e Harris, 1998). A mucina 6 tem co-localização celular com o fator “trefoil” 2 (TFF2) e contribui para o papel protetor do muco contra agressões químicas e mecânicas (Laine et al., 2008). Nam et al. (2005) mostraram que o tratamento com geranilgeranilacetona, um agente citoprotetor, aumenta os níveis de MUC5AC e MUC6 no estômago e previne danos induzidos pelo etanol. Além disso, a mucina produzida pelas células mucosas do colo possui um efeito antibiótico, inibindo o crescimento de *Helicobacter pylori* (Kawakubo et al., 2004).

As células parietais, secretoras de HCl, distribuem-se por toda a extensão da glândula gástrica, sendo mais abundantes nas regiões do istmo e colo. Essas células são grandes comparadas às demais células epiteliais que compõem a glândula, possuem uma rede de canaliculos e são caracterizadas pelo alto número de mitocôndrias (Helander, 1981). Células zimogênicas localizam-se na base das glândulas gástricas. A concentração de RNA confere uma coloração basofílica na região basal do citoplasma dessas células, enquanto os grânulos contendo pepsinogênio encontram-se no ápice. Em relação à origem das células zimogênicas, Zhu et al. (2009) sugeriram que a moesina, uma proteína que tem expressão crescente durante a diferenciação dessas células a partir de células mucosas do colo, possui um papel importante nesse processo, e pode também estar relacionada com a função das células zimogênicas.

Em ratos, estão presentes também células enteroendócrinas, tais como células ECL, G, D e “X/A-like”. As células “enterochromaffin-like” (ECL) localizam-se principalmente no corpo gástrico e são repletas de grânulos contendo histamina. As células G, presentes na região do antro, secretam gastrina, que atua em receptores  $CCK_2$  das células ECL, acelerando a síntese e liberação de histamina que, por sua vez, estimula a secreção ácida (Chen et al., 2006). A somatostatina produzida pelas células D diminui a atividade das células parietais, agindo diretamente ou indiretamente pela inibição da ação da gastrina sobre as células ECL (Chen et al., 2006). Células X/A-like secretam ghrelina (“gh-relina”, originalmente), que induz a liberação do hormônio de crescimento e também estimula o apetite (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). A leptina, importante reguladora da tomada de alimento e



do balanço energético, foi descrita pela primeira vez no estômago por Bado et al. (1998) e é expressa em células enteroendócrinas e zimogênicas (Mix et al., 2000; Cammisotto et al., 2005).

No rato, todos esses tipos celulares modificam-se estruturalmente, atingindo completo amadurecimento funcional durante a terceira semana de vida pós-natal (Simões, 1992), que coincide com o período de transição alimentar. Durante as duas primeiras semanas de vida, o filhote alimenta-se exclusivamente de leite e, após esse período, passa a ingerir também alimento sólido, mantendo uma alimentação mista de leite e ração até o momento de retirada completa do leite (Henning, 1981). Assim, enquanto o filhote passa pelo desmame, ou seja, pelo período de transição entre amamentação e ingestão de ração (Henning, 1981), ocorrem os últimos estágios de diferenciação das células gástricas. As células mucosas do colo são morfologicamente evidentes apenas a partir do 21º dia de vida pós-natal, mas é possível identificar seus precursores antes dessa idade (Ihida et al., 1988; Kataoka et al., 1990; Falk et al., 1994). No mesmo período, a atividade do pepsinogênio é elevada, e o pH do estômago cai de 4 para aproximadamente 2,5 como resultado do aumento na secreção ácida (Johnson, 1985).

## **1.2 Desmame precoce**

O colostro e o leite materno são os primeiros alimentos ingeridos pelo filhote e contêm muitos peptídeos e esteróides biologicamente ativos: prolactina, somatostatina (Werner et al., 1985), insulina, hormônios estimulador e de liberação do hormônio tiroideano (TSH e TRH), hormônio de liberação do hormônio luteinizante (LHRH) (Baram et al., 1977), bombesina (Jahnke e Lazarus, 1984) e hormônio adrenocorticotrófico; TGF $\beta$  (Letterio et al., 1994), fator de crescimento epidermal (EGF) (Beardmore e Richards, 1983), fator de crescimento tipo I semelhante a insulina (IGF-I) (Olanrewaju et al., 1996), e glicocorticóides (Koldovský, 1989; Donovan e Odle, 1994; Koldovský et al., 1995; Xu, 1996; Penttila et al., 1998; Shanks e Lightman, 2001). Durante o período de aleitamento, o leite pode ter função controladora no desenvolvimento do filhote (Kacsoh et al., 1989) até que hormônios e fatores de crescimento atinjam concentrações adequadas e funcionais no

organismo em crescimento (Smith e Ojeda, 1984; Gama e Alvares, 1996; Penttila et al., 1998).

Além desses hormônios e peptídeos, o ácido linoléico conjugado também está presente no leite humano (Pariza et al., 2000) e oferece diversos benefícios para o indivíduo adulto, como inibição de carcinogênese e da aterosclerose (Ip et al., 1999; Visonneau et al., 2007). O IgA é uma imunoglobulina responsável pela proteção de mucosas sem desencadeamento de inflamação. Ratos em período de desmame que tiveram sua dieta suplementada com o ácido linoléico conjugado apresentam maior produção de IgA no intestino delgado (Perez-Cano et al., 2008). Pié et al. (2004) observaram que o período de mudança na dieta está associado a uma inflamação transitória no intestino, com aumento de expressão de citocinas. Kalliomäki et al. (1999) mostraram que o TGF $\beta$  presente no leite materno pode ser decisivo para a prevenção de alergias. Esse resultado foi confirmado por Penttila (2006), que observou a melhora da resposta imunológica à alergia alimentar em ratos lactentes que foram alimentados com uma fórmula suplementada com TGF $\beta$ .

No desmame precoce, os filhotes são abruptamente separados da mãe. A ausência materna e a retirada do leite e de todos os elementos nele presentes causam, além de um forte estresse, alterações no epitélio gástrico. O desmame precoce aumenta em cinco vezes a incidência de erosões gástricas (Ackerman et al., 1978) e a predisposição ao aparecimento de lesões ulcerativas mais profundas em ratos (Glavin e Pare, 1985). Gama e Alvares (2000) mostraram que o desmame precoce provoca aumento na proliferação de células epiteliais gástricas em ratos com 18 dias quando comparados com filhotes em amamentação. No mesmo estudo, verificou-se que quando os animais desmamados precocemente são submetidos ao jejum, ocorre inibição da proliferação celular, resposta inversa à observada em animais amamentados normalmente e semelhante à encontrada no rato adulto (Gama e Alvares, 2000). Lin et al. (2001) observaram o aumento de atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) no estômago após o desmame precoce e sugeriram que esse efeito pode ser um importante indicador das modificações gástricas que ocorrem com a mudança da dieta. Em conjunto, esses resultados mostram que o desmame precoce pode acelerar o aparecimento de respostas celulares típicas de um animal adulto, e ainda que o leite pode agir como um modulador do crescimento e da renovação da mucosa gastrintestinal (Lin et al.,

1998; Gama e Alvares, 2000). Diferentes estudos discutem que as alterações na mucosa gastrointestinal durante o desmame precoce seriam decorrentes do aumento de glicocorticóides observado nessa condição alimentar (Boyle e Koldovský, 1980; Yeh et al., 1986; Lin et al., 1998). Yeh et al. (1986) e Lin et al. (1998) observaram altos níveis de corticosterona logo após o início do desmame precoce seguido de um aumento na atividade de sacarase, enzima intestinal utilizada como marcadora de diferenciação na transição amamentação-desmame. No estômago, a atividade do pepsinogênio é maior nos filhotes desmamados precocemente (Lin et al., 2001) e esse aumento também ocorre após a elevação do corticóide. Takeuchi et al. (1981) e Peitsch et al. (1981) mostraram que a alteração da dieta aos 13 dias de vida não modifica os níveis de gastrina, porém aumenta a quantidade de receptores para esse hormônio na mucosa gástrica. Peitsch et al. (1981) consideram que esse efeito pode ser causado pelo aumento de corticosterona.

A administração de glicocorticóides na terceira semana de desenvolvimento induz diferenciação de células zimogênicas, síntese precoce do pepsinogênio (Kumegawa et al., 1978; Tsukada et al., 1998), e também estimula a atividade da bomba  $H^+K^+/ATPase$  nas células parietais (Wang, Z. et al., 1996). Boyle e Koldovský (1980) mostraram que os efeitos do desmame precoce sobre a atividade da sacarase são inibidos quando os animais são adrenalectomizados, sugerindo que os hormônios adrenais possuem um papel neste evento.

A alteração hormonal promovida pelo desmame precoce pode ser um dos fatores que promovem o amadurecimento acelerado da mucosa gastrointestinal. Esse efeito pode ser direto ou indireto, agindo por meio da modificação na expressão de diferentes fatores de crescimento. Neste sentido, foi demonstrado que a administração de hidrocortisona a animais em amamentação aumenta  $TGF\beta 1$  e diminui  $TGF\beta 2$  na mucosa gástrica (Ogias et al., 2006), alterando peptídeos de ação local, envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular. Estudos do nosso laboratório mostraram também que a expressão de  $TGF\beta 3$  e do receptor  $T\beta RI$  aumenta no epitélio gástrico de filhotes desmamados precocemente submetidos ao jejum (Ogias et al., 2009), sugerindo que essa família de fatores de crescimento é influenciada pelo padrão alimentar. Em relação ao  $TGF\alpha$ , o desmame precoce induz um aumento de seus níveis e distribuição na mucosa gástrica (Osaki et al., submetido). Assim, a modificação do padrão alimentar da amamentação para o

desmame envolve um complexo mecanismo de ação hormonal e de fatores de crescimento.

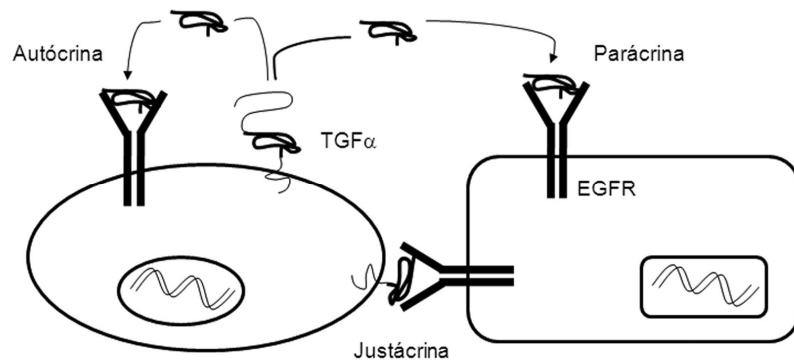
### **1.3 Fator de Crescimento Transformante $\alpha$ (TGF $\alpha$ ) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR)**

O TGF $\alpha$  é um dos fatores de crescimento que podem ser afetados pela dieta e hormônios. Esse peptídeo foi descrito pela primeira vez em 1978, em um meio de cultura de fibroblastos transformados por vírus sarcoma. A adição desse meio parcialmente purificado a fibroblastos normais causou o surgimento reversível do fenótipo maligno (transformado) e, por isso, foi denominado fator de crescimento transformante. Descobriu-se posteriormente que essa atividade transformadora era promovida por duas proteínas distintas, o TGF $\alpha$  e o TGF $\beta$ . Mais tarde, o TGF $\alpha$  foi identificado como uma molécula com atividade semelhante à do EGF e que possui uma seqüência “EGF-like” (Marquardt et al., 1983).

Na mucosa gástrica, o TGF $\alpha$  é detectado em células mucosas superficiais, mucosas do colo e parietais, tanto em humanos quanto em ratos (Hormi e Lehy, 1994; Hormi et al., 1995; Bluth et al., 1995; Montaner et al., 1999). A expressão desse fator de crescimento inicia-se durante a fase fetal de desenvolvimento (Hormi et al., 1995; Kelly et al., 1997) e aumenta durante o crescimento pós-natal. Resultados do nosso laboratório mostraram que o desmame precoce aumenta a marcação imuno-histoquímica para o TGF $\alpha$ , localizada principalmente em células mucosas superficiais e parietais (Osaki et al., submetido). Quando filhotes em amamentação ou desmamados precocemente são submetidos ao jejum, observamos um aumento do número de células que expressam o TGF $\alpha$ , porém o efeito é significativo apenas durante o desmame precoce. Esses resultados sugerem que o tipo de alimento e sua presença na mucosa gástrica podem modificar a expressão de TGF $\alpha$ .

Apesar de o TGF $\alpha$  não estar presente no leite de rata (Dvorak e Koldovský, 1994), diferentes estudos demonstraram que o EGF da placenta, saliva e leite regula a atividade desse fator de crescimento (Kelly et al., 1997; Dvorak et al., 2000; Milani e Calabró, 2001), que parece ser o principal ligante do receptor do EGF, o EGFR, na mucosa gástrica. A produção local do TGF $\alpha$  permite que essa molécula tenha ação

autócrina, parácrina e justácrina (Figura 1), ou seja, entre duas células vizinhas, devido à presença de TGF $\alpha$  preso à membrana celular (Massagué, 1990; Kumar et al., 1995).



**Figura 1.** Esquema dos diferentes modos de ação do TGF $\alpha$  (modificado a partir de Kumar et al., 1995).

O TGF $\alpha$  é um polipeptídeo pertencente à família do EGF, com o qual apresenta 35% de homologia e compartilha o receptor, o EGFR. O TGF $\alpha$  é sintetizado como uma molécula precursora de aproximadamente 160 aminoácidos, composto por: um peptídeo sinal, seguido de 50 aminoácidos que correspondem à molécula madura, uma região transmembrana e a região intracelular. Após clivagem, a molécula madura é liberada no espaço extracelular.

O tratamento com TGF $\alpha$  ou EGF reduz a secreção ácida estimulada pela histamina (Rhodes et al., 1986), que aumenta novamente se os animais são tratados com um inibidor do EGFR (Ancha et al., 2006). Shinohara et al. (2001) observaram que o TGF $\alpha$  provoca um retardo no esvaziamento gástrico e no trânsito intestinal. Além disso, esse fator de crescimento estimula a migração celular e a regeneração do epitélio gástrico (Nakajima e Kuwayama, 1995; Tétreault et al., 2005), e diminui em 50% o tempo de fechamento de micro-lesões em uma monocamada de células epiteliais gástricas (Tétreault et al., 2008a). Por meio da ativação da família Bcl-2, o TGF $\alpha$  é capaz de inibir apoptose em células mucosas superficiais (Kanai et al., 2001).

O efeito proliferativo do TGF $\alpha$  foi detectado em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Chen et al. (1993) e Nakajima e Kuwayama (1993, 1995) mostraram que esse fator de crescimento estimula a incorporação de timidina H<sup>3</sup> em células da glândula

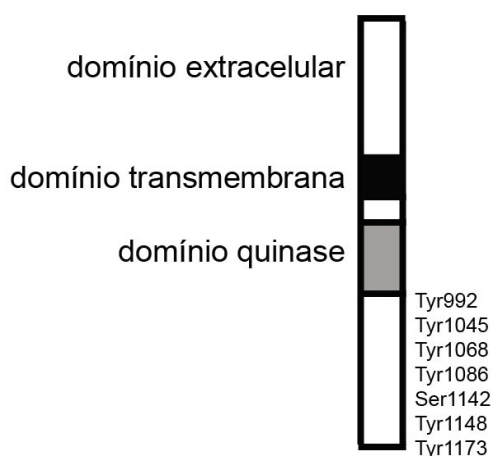
gástrica mantidas em cultura. Turner et al. (2000) estudaram animais jovens (4 a 6 meses) e encontraram aumento significativo da proliferação celular após a administração de TGF $\alpha$ . Hormi e Lehy (1996) observaram o mesmo efeito em diversos órgãos de ratos em amamentação tratados com o TGF $\alpha$ , porém o mesmo efeito não foi detectado no estômago. No entanto, de acordo com as autoras, o estímulo sobre as células gástricas não pode ser completamente descartado, uma vez que pode ter havido algum problema metodológico (Hormi e Lehy, 1996).

Além do papel nos mecanismos de proliferação, o TGF $\alpha$  influencia a diferenciação de células da mucosa gástrica. Camundongos transgênicos da linhagem MT100, que superexpressam esse fator, apresentam um fenótipo muito semelhante ao observado nos pacientes com Síndrome de Ménétrier (Bluth et al, 1995). Portadores dessa síndrome sintetizam uma grande quantidade de TGF $\alpha$  no estômago e apresentam numerosas células mucosas superficiais (Coffey et al., 2007). Sharp et al. (1995) observaram que a elevação excessiva da expressão de TGF $\alpha$  a partir da terceira semana de vida promove: aumento do número de células mucosas superficiais, que se tornam hiperplásicas; diminuição da fração de células parietais e aumento da fração de células mucosas do colo. Além disso, a diferenciação de células zimogênicas é fortemente inibida nesses animais (Sharp et al., 1995; Bockman et al., 1995). Takagi et al. (1997) confirmaram esses resultados e sugeriram também que o excesso de TGF $\alpha$  provoca uma desorganização da glândula gástrica. Entretanto, em animais selvagens em desenvolvimento pós-natal, o balanço entre o TGF $\alpha$  tecidual e os outros fatores e hormônios presentes no leite deve permitir o crescimento e a diferenciação normal das células do epitélio gástrico. Como mencionado anteriormente, resultados do nosso laboratório mostram que a mudança da dieta com o desmame precoce aumenta a expressão do TGF $\alpha$  (Osaki et al, submetido), porém desconhecemos seu papel sobre as alterações celulares citadas acima.

O TGF $\alpha$  liga-se ao receptor EGFR, uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 170 kDa que possui atividade tirosina-quinase. Na mucosa gástrica, Beauchamp et al. (1989) localizaram o EGFR em células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas. Esse receptor está distribuído na região supranuclear e no citoplasma apical das células mucosas, enquanto nas células parietais o EGFR está presente em toda membrana (Montaner et al., 1999). A

afinidade pelo ligante e a disponibilidade do receptor podem comprometer a ação do TGF $\alpha$ . Em humanos, o EGFR está presente na mucosa gástrica desde a fase fetal e, a partir do segundo trimestre de gestação, sua expressão aumenta e permanece alta até a idade adulta (Hormi e Lehy, 1994).

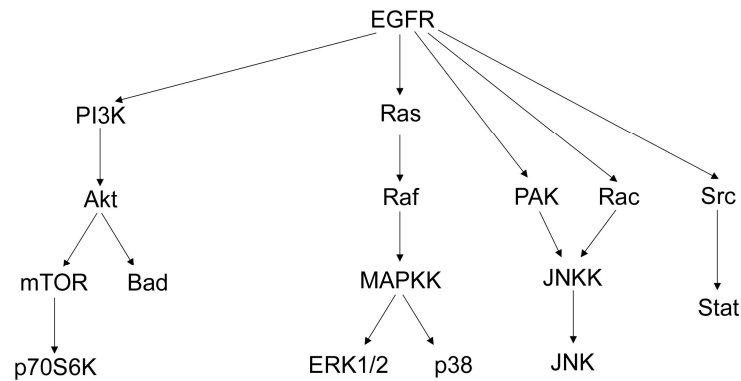
O EGFR foi isolado no início dos anos 80 na linhagem de células de carcinoma humano A-431 (Cohen et al., 1980). A família de receptores à qual pertence possui duas nomenclaturas: HER (“Human EGF receptor”) e ErbB (com relação ao EGFR viral, v-ErbB, “erythroblastic leukemia viral oncogene homolog”). O EGFR e os outros três membros da sua família são, portanto, conhecidos como: EGFR (HER1 ou ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). HER2 não possui um ligante conhecido, enquanto o HER3 carece de atividade tirosina quinase; no entanto, unem-se a outros membros da família e são capazes de gerar sinais celulares. Ao associar-se com seu ligante, o EGFR pode formar homodímeros ou heterodímeros com outros membros de receptores da sua família. Posteriormente, os receptores autofosforilam diferentes sítios, dentre os quais são conhecidos: Tyr<sup>992</sup>, Tyr<sup>1045</sup>, Tyr<sup>1068</sup>, Tyr<sup>1086</sup>, Ser<sup>1142</sup>, Tyr<sup>1148</sup> e Tyr<sup>1173</sup> (Erba et al., 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema da estrutura do EGFR e seus sítios de fosforilação. Tyr= tirosina e Ser= serina.

A fosforilação do receptor pode levar à ativação de diversas vias, que incluem: fosfolipase C $\gamma$  e suas cascatas mediadas por cálcio e proteína quinase C (PKC); ativação de Ras que leva às quinases ativadas por mitógenos (“mitogen-activated kinases”, MAPK); outras GTPases pequenas como Rho e Rac; e a tirosina quinase Src (Osherov e Levitzki, 1994; Göke et al., 1998; Wells, 1999; Jorissen et al., 2003). Em células intestinais e gástricas mantidas em cultura, a via envolvida na

proliferação celular passa por MAPK e por duas cascatas: quinases reguladas por sinal extracelular (“extracellular signal-regulated kinases”, ERKs), c-Jun-N-terminal proteína quinase (JNKs) e PI3K-Akt (Göke et al., 1998; Xiao e Majumdar, 2001; Citri e Yarden, 2006). A Figura 3 ilustra algumas das vias acionadas pelo EGFR.



**Figura 3.** Esquema simplificado de vias de sinalização ativadas pelo EGFR.

A via de sinalização das MAPKs está associada ao estímulo à proliferação celular. Talarmin et al. (1999) observaram que ERK1/2 são ativadas em células do fígado após uma hepatectomia parcial, procedimento que induz a regeneração do tecido e aumento na proliferação celular. No estômago, o TGF $\alpha$  induz a ativação de AP-1, que está envolvida na regulação da proliferação celular, de maneira dependente de ERK1/2 e com um menor envolvimento da via de Src (Xiao et al., 2003).

O envelhecimento estimula a proliferação e inibe a apoptose na mucosa gastrintestinal e esses eventos são acompanhados pelo aumento na expressão e ativação do EGFR (Tureaud et al., 1997; Xiao e Majumdar, 2001). Ratos idosos apresentam maior ativação de PI3K e Akt no cólon e, após a inibição de PI3K, a atividade de caspase-3 é elevada, sugerindo que essa via está envolvida no aumento da sobrevivência das células nesse segmento do intestino (Majumdar e Du, 2006).

Por ser superexpresso em diversos tipos de tumor, o EGFR tem sido estudado como alvo de intervenções farmacológicas com uso de inibidores de sua atividade tirosina-quinase (Levitzki e Gazit, 1995; Ritter e Arteaga, 2003; Bianco et al., 2004; El-Rayes e LoRusso, 2004; Nautyial et al., 2006). Esses inibidores podem atuar nos domínios extracelulares de associação com o ligante e de dimerização ou



no domínio intracelular tirosina quinase (Levitzki e Gazit, 1995; El-Rayes e LoRusso, 2004). Um exemplo desses inibidores que atuam no domínio tirosina quinase é o ZD1839 (Gefitinib<sup>®</sup> ou Iressa, AstraZeneca), um medicamento que compete pelo sítio de ligação do ATP no EGFR. O ZD1839 foi uma das primeiras drogas com essa característica e surgiu como uma grande promessa no tratamento de tumores. No entanto, o uso dessa droga é aprovado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para o câncer de pulmão em células não-pequenas (NSCLC, “non-small cell lung cancer”) apenas como uma segunda alternativa para pessoas que já passaram por algum outro tratamento. Apesar de pesquisas clínicas terem mostrado uma redução no tamanho dos tumores após a administração da droga, não houve aumento significativo na sobrevivência dos pacientes, a não ser em casos específicos, como pessoas de origem asiática ou que nunca fumaram (Thatcher et al., 2005).

Devido à ação inibitória sobre a atividade tirosina quinase do EGFR, o ZD1839 e outras moléculas com a mesma propriedade podem ser utilizados como ferramenta para estudos desse receptor. Camundongos tratados com ZD1839 apresentam diminuição da proliferação celular e pequeno aumento da apoptose no íleo (O’Brien et al., 2002). Esse efeito anti-proliferativo é causado pela inibição da atividade do receptor e conseqüente acúmulo de p27 e p21, proteínas reguladoras de ciclinas no ciclo celular. O AG1478 (Calbiochem) é uma quinazolina que age da mesma forma que o ZD1839 e é muito utilizado em pesquisas científicas. Essa molécula é altamente seletiva para o EGFR e também é considerada uma potente inibidora da atividade tirosina quinase desse receptor (Levitzki e Gazit, 1995).

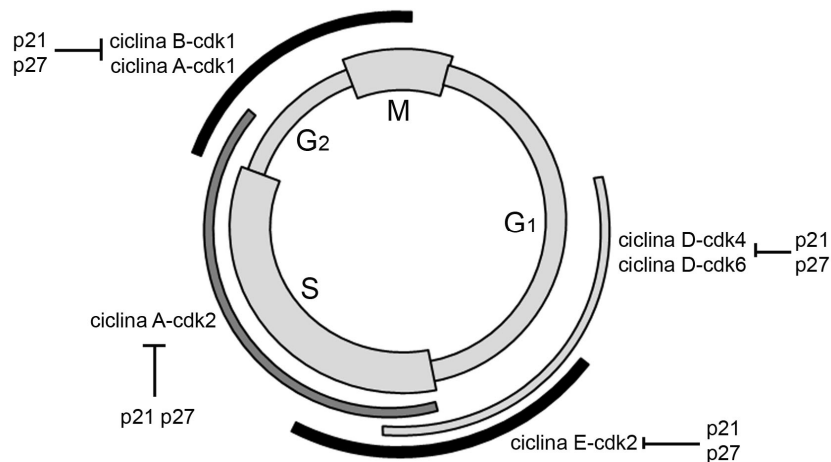
Estudos sugerem que a dieta pode influenciar a atividade do EGFR em diferentes órgãos. Ratos submetidos a um jejum prolongado apresentam diminuição na ligação de EGF às membranas de células hepáticas devido ao número reduzido de receptores, sem modificações na afinidade do receptor (Freidenberg et al., 1986). O ácido oleico, um ácido graxo insaturado, estimula a fosforilação do EGFR e a ativação da via de MAPK em células endoteliais (Vacaresse et al., 1999). Wang et al. (1996) observaram que a ingestão crônica de álcool diminui a ligação de EGF às membranas e a atividade tirosina quinase do EGFR, que ocorrem devido ao número reduzido de receptores.

## 1.4 Controle da progressão do ciclo celular

Animais com 18 dias submetidos ao desmame precoce apresentam a proliferação aumentada quando comparados com animais de mesma idade em amamentação (Gama e Alvares, 2000). No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação desse processo no desmame precoce ainda são desconhecidos.

A progressão do ciclo celular é controlada por diversas proteínas cujos níveis e atividade oscilam ao longo de todo o processo. Ciclinas interagem com quinases dependentes de ciclina (cdks) formando complexos que regulam a progressão do ciclo celular, e assim diferentes complexos ciclina-cdk são necessários nas diferentes fases (Alberts et al., 2008). A ciclina D, que se associa à cdk4 e cdk6, tem seus níveis elevados no meio e fim da fase G<sub>1</sub>. A transição entre as fases G<sub>1</sub> e S, por sua vez, é controlada pela formação do complexo ciclina E-cdk2, enquanto o complexo ciclina A-cdk2 é importante durante a fase S, estimulando a duplicação dos cromossomos, e na transição S/G<sub>2</sub>. Por fim, as ciclinas A e B associam-se à cdk1 e estimulam a entrada da célula em mitose. O retorno à fase G<sub>1</sub> ocorre pela degradação das ciclinas A e B e conseqüente inativação da cdk1.

Os complexos ciclina-cdk, por sua vez, são regulados por fatores que incluem a proteína retinoblastoma (pRb) e as proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKIs). A pRb liga-se ao fator de transcrição E2F, inativando-o e inibindo a expressão de ciclina E, que é um processo dependente desse fator. Ao ser fosforilada, a pRb deixa o E2F livre, permitindo a transcrição de genes necessários à entrada em S. As CKIs estão divididas em duas classes: INK4, da qual fazem parte as proteínas p15, p16, p18 e p19, e Kip/Cip, que abrange as proteínas p21, p27 e p57. As proteínas da classe INK4 inibem especificamente o complexo ciclina D-cdk4, enquanto Kip/Cip inibem a maioria dos complexos ciclina-cdk que se formam ao longo do ciclo celular. Harper et al. (1993) identificaram a p21 como inibidora de cdks e da fosforilação de Rb, exercendo uma função anti-proliferativa. Apesar do conhecido papel como inibidoras do ciclo celular, alguns trabalhos têm atribuído outras funções a essas proteínas, inclusive sugerem que a p21 é fundamental no estímulo à proliferação de enterócitos (Sheng et al., 2006; Stehr et al., 2006). A Figura 4 mostra um esquema simplificado da regulação do ciclo celular.



**Figura 4.** Esquema simplificado da regulação do ciclo celular.

A relação entre o EGFR e as CKIs é ainda controversa na literatura. A inibição da ativação de EGFR *in vitro* provoca aumento nos níveis de p27 (Wu et al., 1996; Busse et al., 2000; DiGennaro et al., 2003), enquanto a p21 não é alterada (Wu et al., 1996; Sheng et al., 2006) ou aumenta também (DiGennaro et al., 2003). Sheng et al. (2006) mostraram que o estímulo de EGFR eleva os níveis de p21 e a inibição do receptor não altera essa proteína. Esses autores sugeriram que a p21 é necessária para o estímulo à proliferação provocado pela ativação de EGFR no intestino. *In vivo*, o mesmo grupo mostrou que a p21 é fundamental após o estímulo de proliferação provocado pela retirada de 50% do intestino delgado, situação em que a atividade de EGFR é importante para a adaptação após esse procedimento (Stern et al., 2000; Stehr et al., 2006).

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos nossos resultados, constatamos que:

- 1) O desmame precoce acelera a diferenciação das células mucosas do colo;
- 2) O padrão alimentar modifica a expressão de EGFR, e o desmame precoce aumenta sua distribuição na mucosa gástrica, mas não os tipos celulares que expressam esse receptor;
- 3) O EGFR está envolvido no estímulo à proliferação celular e à diferenciação de células mucosas do colo dentro do modelo do desmame precoce;
- 4) As vias de sinalização de ERK e Src atuam nas modificações celulares encontradas no desmame precoce.

Assim, concluímos que existe uma relação entre a dieta e o EGFR, e que a interação entre esses dois elementos faz parte do controle da proliferação e da diferenciação celular do epitélio gástrico, e portanto, do crescimento do estômago.

## REFERÊNCIAS\*

Abe S, Sasano H, Katoh K, Ohara S, Arikawa T, Noguchi T, Asaki S, Yasui W, Tahara E, Nagura H, Toyota T. Immunohistochemical studies on EGF family growth factors in normal and ulcerated human gastric mucosa. *Dig Dis Sci.* 1997;42:1199-209.

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

Aherne WA, Camplejohn RS, Wright NA. An introduction to population cell kinetics. London: Edward Arnold; 1977.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science; 2008.

Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. P21Cip1 promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem.* 2002;277(10):8517-23.

Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26:869-73.

Ancha AR, Ancha HB, Tedesco DS, Ward AR, Harty RF. Inhibition of epidermal growth factor receptor activation enhances in vivo histamine-stimulated gastric acid secretion in the rat. *Dig Dis Sci.* 2006; 51(2):274-81.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998;394(6695):790-3.

Baram T, Koch Y, Hazum E, Fridkin M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science.* 1977;198(4314):300-2.

Bartman AE, Buisine MP, Aubert JP, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, Kelly EJ, Crabtree JE, Ho SB. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol.* 1998;186:398-405.

Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. Prevention of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in polyamine-depleted IEC-6 cells is mediated through the activation of ERK1/2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G479-90.

Beardmore JM, Richards RC. Concentrations of epidermal growth factor in mouse milk throughout lactation. *J Endocrinol.* 1983;96(2):287-92.

### \* De acordo com:

International Committee of Medical journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003- Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ. Localization of transforming growth factor alpha and its receptor in gastric mucosal cells. Implications for a regulatory role in acid secretion and mucosal renewal. *J Clin Invest.* 1989;84:1017-23.

Bianco R, Caputo R, Caputo R, Damiano V, De Placido S, Ficorella C, Agrawal S, Bianco AR, Ciardiello F, Tortora G. Combined targeting of epidermal growth factor receptor and MDM2 by Gefitinib and antisense MDM2 cooperatively inhibit hormone-independent prostate cancer. *Clin Can Res.* 2004;10:4858-64.

Bluth RF, Carpenter HA, Pittelkow MR, Page DL, Coffey RJ. Immunolocalization of transforming growth factor alpha in normal and disease human gastric mucosa. *Human Pathol.* 1995;26:1333-40.

Bockman DE, Sharp R, Merlino G. Regulation of terminal differentiation of zymogenic cells by transforming growth factor alpha in transgenic mice. *Gastroenterology.* 1995;108(2):447-54.

Boyle JT, Koldovský O. Critical role of adrenal glands in precocious increase in jejunal sucrase activity following premature weaning in rats: negligible effect of food intake. *J Nutr.* 1980;10:169-77.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif.* 2004;37:35-53.

Busse D, Doughty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM, Shawver LK, Arteaga CL. Reversible G1 arrest induced by inhibition of the EGFR tyrosine kinase requires up-regulation of p27KIP1 independent of MAPK activity. *J Biol Chem.* 2000;275(10):6987-95.

Cammisotto PG, Renaud C, Gingras D, Delvin E, Levy E, Bendayan M. Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:851-60.

Chen MC, Lee AT, Karnes WE, Avedian D, Martin M, Sorvillo JM, Soll AH. Paracrine control of gastric epithelial cell growth in culture by transforming growth factor- $\alpha$ . *Am J Physiol.* 1993;264(27):G390-6.

Chen M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 1999;18(6):1571-83.

Chen D, Aihara T, Zhao C-M, Hakanson R, Okabe S. Differentiation of the gastric mucosa I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G539-44.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signaling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:505-16.

Coffey RJ, Washington MK, Corless CL, Heinrich MC. Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. *J Clin Invest.* 2007;117:70-80.

Cohen S, Carpenter G, King Jr L. Epidermal growth factor-receptor-kinase interactions. Co-purification of receptor and epiderma growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem.* 1980;255:4834-42.

Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *TRENDS Cell Biol.* 2003;13(2):65-70.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000;141:4255-61.

De Andrade Sá ER, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. In vivo effects of TGF $\beta$ 1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. *Regul Pept.* 2008;146:293-302.

De Andrade Sá ER, Jordão L, Takahashi CA, Alvares EP, Gama P. Ontogenic expression of TGF $\beta$ 1, 2 and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. *Dev Dyn.* 2003; 227:450-457.

De Bolós C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the humam stomach. *Gastroenterology.* 1995;109:723-34.

Di Gennaro E, Barbarino M, Bruzzese F, De Lorenzo S, Caraglia M, Abruzzese A, Avalone A, Comella P, Caponigro F, Pepe S, Budillon A. Critical role of both p27<sup>KIP1</sup> and p21<sup>CIP1/WAF1</sup> in the antiproliferative effect of ZD1839 ('Iressa'), an Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2003;195:139-50.

Dixon MF. Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Gut.* 2001;49:2-4.

Donepudi M, Resh MD. C-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGF receptor activation and signaling. *Cell Signal.* 2008;20(7):1359-67.

Donovan SM, Odle J. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:147-67.

Dvorák B, Koldovský O. The presence of transforming growth factor- $\alpha$  in the suckling rat small intestine and pancreas and the absence in rat milk. *Pediatr Res.* 1994;35:348-53.

Dvorák B, Williams C, McWilliam D L, Shinohara H, Dominguez JA, McCuskey RS, Philippis AF, Koldovský O. Milk-borne epidermal growth factor modulates intestinal transforming growth factor  $\alpha$  levels in neonatal rats. *Pediatr Res*. 2000;47:194-200.

Ekelund M, Hakanson R, Hedenbro J, Rehfeld JF, Sundler F. Endocrine Cells and Parietal Cells in the Stomach of the Developing Rat. *Acta Physiol Scand*. 1985;124:483-497.

El-Rayes BF, LoRusso PM. Targeting the epidermal growth factor receptor. *Brit J Cancer*. 2004;91:418-24.

Erba EB, Bergatto E, Cabodi S, Silengo L, Tarone G, Defilippi P, Jensen ON. Systematic analysis of the epidermal growth factor receptor reveals stimulation-dependent multisite phosphorylation. *Mol Cell Prot*. 2005;4:1107-21.

Falk P, Roth KA, Gordon JI. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am J Physiol*. 1994;266:G987-1003.

Freidenberg GR, Klein HH, Kladde MP, Cordera R, Olefsky JM. Regulation of epidermal growth factor receptor number and phosphorylation by fasting in rat liver. *J Biol Chem*. 1986;261(2):752-7.

Gallo-Payet N, Pothier P, Hugon JS. Ontogeny of EGF receptors during postnatal development of mouse small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1987;6:114-20.

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

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

Garcia-Suarez O, Germanà G, Naves FJ, Ciriaco E, Represa J, Vega JA. Sensory epithelium of the vomeronasal organ express TrkA-like and epidermal growth factor receptor in adulthood. *Anat Rec*. 1997;247:299-306.

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

Göke M, Kanai M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor  $\alpha$  in wounded rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 1998;114(4):697-705.

Goldstein IJ, Poretz RD. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, editors. *The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. New York: Academic Press; 1986. p. 33-247.

Hanby AM, Poulson R, Playford RJ, Wright NA. The mucous neck cell in the human gastric corpus: a distinctive, functional cell lineage. *J Pathol*. 1999;187:331-7.



Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805-16.

Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Intl Rev Cytol*. 1981;70:217-289.

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

Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res*. 1995;55:2681-90.

Hormi K, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor proteins in the human pancreas and digestive tract. *Cell Tissue Res*. 1994;278:439-50.

Hormi K, Lehy T. Transforming growth factor-alpha in vivo stimulates epithelial cell proliferation in digestive tissues of suckling rats. *Gut*. 1996;39:532-8.

Hormi K, Onolfo JP, Gres L, Lebraud V, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor-alpha in the upper digestive tract and pancreas of the rat. *Regul Pept*. 1995;55:67-77.

Ichikawa T, Endoh H, Hotta K, Ishihara K. The mucin biosynthesis stimulated by epidermal growth factor occurs in surface mucus cells, but not in gland mucus cells, of rat stomach. *Life Sci*. 2000;67:1095-1101.

Ihida K, Suganuma T, Tsuyama S, Murata F. Glycoconjugate histochemistry of the rat fundic gland using Griffonia simplicifolia Agglutinin-II during the development. *Am J Anat*. 1988;182(3):250-6.

Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res*. 1999;250:22-34.

Jahnke GD, Lazarus LH. A bombesin immunoreactive peptide in milk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:578-82.

Johnson LR. Functional development of the stomach. *Ann Rev Physiol*. 1985;47:199-215.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):31-53.

Judd LM, Gleeson PA, Toh B-H, van Driel IR. Autoimmune gastritis results in disruption of gastric epithelial cell development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1999;40:G209-18.

Kacsoh B, Terry LC, Meyers JS, Crowley WR, Grosvenor CE. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat. I. Involvement of milk factors. *Endocrinology*. 1989;125(3):1326-36.

Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor- $\beta$  in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;125:1-7.

Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Takeuchi T, Chiba T. TGF $\alpha$  inhibits apoptosis of murine gastric pit cells through an NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Gastroenterology*. 2001;121:56-67.

Kanno H, Horikawa Y, Hodges RR, Zoukhri D, Shatos MA, Rios JD, Dartt DA. Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284:988-98.

Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat Rec*. 1993;236:314-32.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cells and pinpointing of the stem cells. *Anat Rec*. 1993a;236:259-79.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat Rec*. 1993b;236:280-96.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec*. 1993c;236:297-313.

Kataoka K, Takeoka Y, Furihata C. Immunocytochemical study of pepsinogen 1-producing cells in the fundic mucosa of the stomach in developing mice. *Cell Tissue Res*. 1990;261:211-217.

Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda MN, Fukuda M, Katsuyama T, Nakayama J. Natural Antibiotic Function of a Human Gastric Mucin Against *Helicobacter pylori* infection. *Science*. 2004;305:1003-6.

Kazumori H, Ishihara S, Rumi MAK, Ortega-Cava CF, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Transforming growth factor- $\alpha$  directly augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G508-14.

Kelly EJ, Newell SJ, Brownice KG, Farmery SM, Cullinane C, Reid WA, Jackson P, Gray SF, Primrose JN, Lagopoulos M. Role of epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  in the developing stomach. *Arch Dis Child*. 1997;76:158-62.

Kholodenko BN. MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *TRENDS Cell Biol.* 2002;12(4):173-7.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656-60.

Koldovský O. Critical review: search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J Nutr.* 1989;119:1543-51.

Koldovský O, Illnerová H, Macho L, Strbák V, Stepánková R. Milk-borne hormones: possible tools of communication between mother and suckling. *Physiol Res.* 1995;44(6):349-51.

Konturek PC, Ernst H, Brzozowski T, Ihlm A, Hahn EG, Konturek SJ. Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  after exposure of rat gastric mucosa to stress. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:209-16.

Kruger JS, Reddy KB. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res.* 2003;1:801-9.

Kumar V, Bustin SA, McKay IA. Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int.* 1995;19:373-88.

Kumegawa M, Takuma T, Hosoda S, Kunei S, Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Bioch Biophys Acta.* 1978;543:243-50.

Lafky JM, Wilken JA, Baron AT, Maihle NJ. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1785:232-65.

Lagapa JT, Oku Y, Nonaka N, Kamiya M. *Taenia taeniaeformis*: fate and proliferation of mucosal cells during gastric hyperplasia in larvae infected rats. *Exp Parasitol.* 2008;118:576-82.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2008;135(1):41-60.

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

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

Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal rescue of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 null mice. *Science.* 1994;264:1936-8.

Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 1995;267:1782-7.

Lin CH, Correia L, Tolia K, Gesell MS, Tolia V, Lee P, Luk GD. Early weaning induces jejunal ornithine decarboxylase and cell proliferation in neonatal rats. *J Nutr*. 1998;128:1636-42.

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

Liu L, Turner JR, Yu Y, Khan AJ, Jaszewski R, Fligiel SE, Majumdar AP. Differential expression of EGFR during early reparative phase of the gastric mucosa between young and aged rats. *Am J Physiol*. 1998;275:943-50.

Luttrell DK, Luttrell LM, Parsons SJ. Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src. *Mol Cell Biol*. 1988;8(1):497-501.

Maa M-C, Leu T-H, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6981-5.

Majumdar APN, Du J. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling stimulates colonic mucosal cell survival during aging. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:49-55.

Malecka-Panas E, Relan NK, Majumdar APN. Increased activation of EGF-receptor tyrosine kinase by EGF and TGF- $\alpha$  in the colonic mucosa of aged rats. *J Gerontol*. 1996;51A:B60-5.

Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, Todaro GJ. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:4684-8.

Massagué J. Transforming growth factor  $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1990;265(35):21393-6.

McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deheragoda M, Leedham SJ, Taylor RW, Lee CY, Preston SL, Lovell M, Hunt T, Elia G, Oukrif D, Harrison R, Novelli MR, Mitchell I, Stoker DL, Turnbull DM, Jankowski JA, Wright NA. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology*. 2008;134:500-10.

Milani S, Calabró A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech*. 2001;53:360-71.

Mix H, Widjaja A, Jandi O, Cornberg M, Kaul A, Göke M, Beil W, Kuske M, Brabant G, Manns MP, Wagner S. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut*. 2000;47:481-6.

Montaner B, Asbert M, Pérez-Tomás R. Immunolocalization of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in the rat gastroduodenal area. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1408-16.

Morgenstern S, Koren R, Moss SF, Fraser G, Okon E, Niv Y. Does *Helicobacter pylori* affect gastric mucin expression? Relationship between gastric antral mucin expression and *H. pylori* colonization. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13:19-23.

Nakajima N, Kuwayama H. Effects of transforming growth factor alpha and beta on rabbit gastric epithelial cell proliferation: a preliminary report. *J Clin Gastroenterol*. 1993;17:121-4.

Nakajima N, Kuwayama H. Stimulatory effect of transforming growth factor-alpha on gastric epithelial cell migration through proliferation. *J Clin Gastroenterol*. 1995;21:45-9.

Nam SJ, Kim N, Lee CS, Choi KD, Lee HS, Jung HC, Song IS. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Dig Dis Sci*. 2005;50(11):2110-20.

Nanthakumar NN, Young C, Ko JS, Meng D, Chen J, Buie T, Walter WA. Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol*. 2005;288:85-92.

Nautyial J, Rishi AK, Majumdar APN. Emerging therapies in gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46): 7440-50.

Nguyen T, Chai J, Li A, Akahoshi T, Tanigawa T, Tarnawski AS. Novel roles of local Insulin-like growth factor-1 activation in gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelization, and induces cyclooxygenase-2 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *Am J Pathol*. 2007;170(4):1219-28.

Nicolle G, Daher A, Maillé P, Vermey M, Loric S, Bakkar A, Wallerand H, Vordos D, Vacherot F, de Medina SGD, Abbou CC, Van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F, Chopin DK. Gefitinib inhibits the growth and invasion of urothelial carcinoma cell lines in which akt and MAPK activation is dependent on constitutive epidermal growth factor receptor activation. *Clin Cancer Res*. 2006;12(9):2937-43.

O'Brien DP, Nelson LA, Williams JL, Kemp CJ, Erwin CR, Warner BW. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor impairs intestinal adaptation after small bowel resection. *J Surg Res*. 2002;105(1):25-30.

Ogias D, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. Corticosteroids induce the differential expression of TGF $\beta$  isoforms, receptors and signaling in the gastric mucosa of suckling rats. *Regul Pept*. 2006;135:17-22.

Ogias D, de Andrade Sá ER, Alvares EP, Gama P. Opposite effects of fasting on TGF $\beta$ 3 and T $\beta$ RI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. Nutrition. In press 2009.

Olanrewaju HA, Sanzenbacher ED, Seidel ER. Insulin-like growth factor I in suckling rat gastric contents. Dig Dis Sci. 1996;41(7):1392-7.

Oliver P, Picó C, De Matteis R, Cinti S, Palou A. Perinatal expression of leptin in rat stomach. Dev Dyn. 2002;223:148-54.

Osherov N, Levitzki A. Epidermal-growth-factor-dependent activation of the Src-family kinases. Eur J Biochem. 1994;225:1047-53.

Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. Proc Soc Exp Biol Med. 2000;223:8-13.

Peitsch W, Takeuchi K, Johnson LR. Mucosal gastrin receptor. VI. Induction by corticosterone in newborn rats. Am J Physiol. 1981;240(6):G442-9.

Penttila IA, Van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC. Transforming growth factor- $\beta$  level in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. Pediatric Res. 1998;44(4):524-31.

Penttila I. Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. Pediatr Res. 2006;59(5):650-5.

Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Molero-Luís M, Castell M, Rivero M, Castellote C, Franch A. Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy. J Lipid Res. 2008;50(3):467-76.

Pié S, Lallés JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP. Weaning is associated with an upregulation of expression on inflammatory cytokines in the intestine of piglets. J Nutr. 2004;134:641-7.

Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires *Mist1*. Development. 2007;134:211-22.

Reid CJ, Harris A. Developmental expression of mucin genes in the human gastrointestinal system. Gut. 1998;42:220-6.

Reis CA, David L, Carvalho F, Mandel U, De Bolós C, Mirgorodskaya E, Clausen H, Sobrinho-Simões M. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. J Histochem Cytochem. 2000;48(3):377-88.

Rhodes JA, Tam JP, Finke U, Saunders M, Bernanke J, Silen W, Murphy RA. Transforming growth factor inhibits secretion of gastric acid. Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:3844-6.

Ritter CA, Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Seminars in Oncology*. 2003;30(1):3-11.

Romano M, Krauss ER, Boland CR, Coffey RJ. Comparison between transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in the protection of rat gastric mucosa against drug-induced injury. *Ital J Gastroenterol*. 1992;102:1467-74.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3. 1998. Disponível em [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) [2008 Jun 28].

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

Sharp R, Babyatsky MW, Takagi H, Tågerud S, Wang TC, Bockman DE, Brand SJ, Merlino G. Transforming growth factor  $\alpha$  disrupts the normal program of cellular differentiation in the gastric mucosa of transgenic mice. *Development*. 1995;121:149-61.

Sheng G, Bernabe KQ, Guo J, Warner B. Epidermal Growth Factor Receptor-mediated proliferation of enterocytes requires p21waf1/cip1 expression. *Gastroenterology*. 2006;131:153-64.

Shinohara H, Williams CS, McWilliam DL, Koldovský O, Phillips AF, Dvorák P. Transforming growth factor  $\alpha$  delays gastric emptying and small intestinal transit in suckling rats. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:356-60.

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

Smith SS, Ojeda SR. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors via milk LHRH. *Endocrinology*. 1984;115(5):1973-83.

Stehr W, Bernal NP, Erwin CR, Bernabe KQ, Guo J, Warner BW. Roles for p21waf1/cip1 and p27kip1 during the adaptation response to massive intestinal resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G933-41.

Stern LE, Erwin CR, O'Brien DP, Huang F, Warner BW. Epidermal growth factor is critical for intestinal adaptation following small bowel resection. *Microsc Res Tech*. 2000;51:138-48.

Takagi H, Fukusato T, Kawaharada U, Kuboyama S, Merlino G, Tsutsumi Y. Histochemical analysis of hyperplastic stomach of TGF- $\alpha$  transgenic mice. *Dig Dis Sci*. 1997;42:91-8.

Takeuchi K, Peitsch W, Johnson LR. Mucosal gastrin receptor. V. Development in newborn rats. *Am J Physiol.* 1981;240(2):G163-9.

Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G1 phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6003-11.

Tétreault MP, Chailier P, Rivard N, Ménard D. Differential growth factor induction and modulation of human gastric epithelial regeneration. *Exp Cell Res.* 2005;306:285-97.

Tétreault MP, Chailier P, Beaulieu JF, Rivard N, Ménard D. Specific signaling cascades involved in cell spreading during healing of micro-wounded gastric epithelial monolayers. *J Cell Biochem.* 2008a;105:1240-9.

Tétreault MP, Chailier P, Beaulieu JF, Rivard N, Ménard D. Epidermal growth factor receptor-dependent PI3K-activation promotes restitution of wounded human gastric epithelial monolayers. *J Cell Physiol.* 2008b;214:545-57.

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, Carroll K. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet.* 2005;366:1527-37.

Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by src family kinases. *Ann Cell Dev Biol.* 1997;13:513-609.

Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* 1994;4:694-701.

Tsukada S, Ichinose M, Yahagi N, Matsubara Y, Yonezawa S, Shiokawa K, Furihata C, Miki K, Fukamashi H. Induction of precocious pepsinogen synthesis by glucocorticoids in fetal rat gastric epithelium in organ culture: Importance of mesenchyme for epithelial differentiation. *Differentiation.* 1998;62:239-47.

Tureaud J, Sarkar FH, Fligiel SEG, Kulkarni S, Jaszewski R, Reddy K, Yu Y, Majumdar APN. Increased expression of EGFR in gastric mucosa of aged rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997;273:G389-98.

Vacaresse N, Lajoie-Mazenc I, Augé N, Suc I, Frisach M-F, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res.* 1999;85:892-9.

Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:251-337.



Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca JA, Santoli D, Kritchevsky D. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res.* 2007;17:969-973.

Wang S-L, Wu-Wang CY, Feng J, Espina N, Garro AJ. Chronic ethanol feeding alters the structure and function of the epidermal growth factor receptor in rat stomach. *Alcohol.* 1996;13(5):461-6.

Wang ZM, Aizman R, Grahnquist L, Yasui M, Hemphälä A, Celsi G. Glucocorticoids stimulate the maturation of H,K-ATPase in the infant rat stomach. *Pediatric Res.* 1996;40(5):658-63.

Weber W, Gill GN, Spiess J. Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science.* 1984;224:294-7.

Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(6):637-43.

Werner H, Amarant T, Millar RP, Fridkin M, Koch Y. Immunoreactive and biologically active somatostatin in human and sheep milk. *Eur J Biochem.* 1985;148:353-7.

Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A, Mendelsohn J. Involvement of p27kip1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene.* 1996;12:1397-403.

Xiao ZQ, Yu Y, Khan A, Jaszewski R, Ehrinpreis MN, Majumdar APN. Induction of G1 checkpoint in the gastric mucosa of aged rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999;277:G929-34.

Xiao ZQ, Jaszewski R, Majumdar APN. Aging enhances G1 phase in the colonic mucosa of rats. *Mech Ageing Dev.* 2000;116:1-14.

Xiao Z, Majumdar APN. Increased in vitro activation of EGFR by membrane-bound TGF- $\alpha$  from gastric and colonic mucosa of aged rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:G111-6.

Xiao ZQ, Li J, Majumdar APN. Regulation of TGF- $\alpha$ -induced activation of AP-1 in the aging gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285:G396-403.

Xu RJ. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fert Dev.* 1996;8:35-48.

Yeh KY, Du FW, Holt PR. Endogenous corticosterone rather than dietary sucrose as a modulator for intestinal sucrase activity in artificially reared rat pups. *J Nutr.* 1986;116:1334-42.

Zhu L, Hatakeyama J, Zhang B, Makdisi J, Ender J, Forte JG. Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G185-95.