DANIELA OGIAS

O JEJUM REGULA DIFERENCIALMENTE A *CORTICOSTERONE BINDING GLOBULIN* (CBG) PLASMÁTICA, O RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDE (GR) E PROTEÍNAS QUE CONTROLAM A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR NA MUCOSA GÁSTRICA DE FILHOTES E RATOS ADULTOS

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

RESUMO

Ogias D. O jejum regula diferencialmente a *corticosterone binding globulin* plasmática, o receptor de glicocorticóide e proteínas que controlam a progressão do ciclo celular na mucosa gástrica de filhotes e ratos adultos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O estado nutricional influencia o crescimento gástrico, e enquanto a proliferação celular é estimulada pelo jejum em filhotes, ela é inibida em ratos adultos. A corticosterona também age no desenvolvimento, e seus efeitos são regulados pela *corticosterone binding globulin* (CBG) e receptores de glicocorticóides (GR). Para investigar se a atividade da corticosterona responde ao jejum e como possíveis mudanças poderiam controlar o ciclo celular epitelial gástrico, nós avaliamos diferentes parâmetros durante a progressão do jejum em ratos de 18 e 40 dias de vida pós-natal. A restrição alimentar induziu um aumento de corticosterona no plasma em ambas as idades, mas apenas em filhotes o *binding* da CBG se elevou após o jejum curto, permanecendo alto até o final do tratamento. O jejum aumentou a atividade transcricional do GR na mucosa gástrica e os níveis protéicos, porém o efeito foi mais pronunciado em adultos. Além disso, observamos que nos filhotes, o GR é principalmente citoplasmático, enquanto em animais adultos, o receptor é acumulado no núcleo durante o jejum. As proteínas HSP 70 e HSP 90 foram diferencialmente reguladas, e podem contribuir para a estabilidade do GR no citoplasma em filhotes, e para o trânsito de GR para o núcleo em animais adultos. Quanto ao ciclo celular epitelial, observamos que em filhotes, ciclina D1 e p21 aumentaram durante o jejum, enquanto em ratos adultos, a ciclina E diminuiu e a p27 aumentou muito. Assim, nós demonstramos que a atividade da corticosterona é diferencialmente regulada pelo jejum em filhotes e ratos adultos, e que as variações observadas poderiam atenuar um possível efeito supressor durante o desenvolvimento pós-natal. Sugerimos que este mecanismo pode estimular a proliferação celular e possibilitar o crescimento da mucosa gástrica durante condições nutricionais adversas.

Palavras-chave: Mucosa Gástrica, Corticosterona, CBG, Receptor de Glicocorticóide, Ciclo Celular

ABSTRACT

Ogias D. Fasting differentially regulates plasma corticosterone-binding globulin, glucocorticoid receptor and cell cycle in the gastric mucosa of pups and adult rats [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The nutritional status influences gastric growth, and interestingly, whereas cell proliferation is stimulated by fasting in suckling rats, it is inhibited in adult animals. Corticosterone takes part in the mechanisms that govern development, and its effects are regulated in particular by corticosterone binding globulin (CBG) and glucocorticoid receptor (GR). To investigate whether corticosterone activity responds to fasting and how possible changes might control gastric epithelial cell cycle, we evaluated different parameters during the progression of fasting in 18- and 40-d-old rats. Food restriction induced higher corticosterone plasma concentration at both ages, but only in pups did CBG binding increase after short and long-term treatments. Fasting also increased gastric GR at transcriptional and protein levels, but the effect was more pronounced in 40-d-old animals. Moreover, in pups, GR was observed in the cytoplasm, whereas in adults, it accumulated in the nucleus after the onset of fasting. HSP 70 and HSP 90 were differentially regulated, and might contribute to the stability of GR and to the high cytoplasmic levels in pups and elevated shuttling in adult rats. As for gastric epithelial cell cycle, whereas cyclin D1 and p21 increased during fasting in pups, in adults, cyclin E slowly decreased concomitant with higher p27. In summary, we demonstrated that corticosterone function is differentially regulated by fasting in 18- and 40-d-old rats, and such variation might attenuate any possible suppressive effects during postnatal development. We suggest that this mechanism could ultimately increase cell proliferation and allow regular gastric growth during adverse nutritional conditions.

Key words: Gastric Mucosa, Corticosterone, CBG, Glucocorticoid Receptor, Cell Cycle

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estômago

O estômago é uma dilatação do tubo digestório e em roedores está dividido em três regiões distintas histologicamente: córnea, corpo e antro. A mucosa na região do corpo gástrico é organizada em glândulas tubulares que se abrem em fossetas (Figura 1), e é composta por diferentes populações de células epiteliais com funções específicas: mucosas superficiais e do colo que secretam muco para proteção da superfície luminal e das células da glândula; parietais que transportam H^+ e Cl^- que no lúmen gástrico compõe o ácido clorídrico; zimogênicas que são responsáveis pela secreção de pepsinogênio; enteroendócrinas, produtoras de hormônios, e as células tronco que são pluripotentes (Helander, 1981; Lee et al., 1982; Kojima et al., 1999; Date et al., 2000).

A formação da glândula gástrica tem início na gestação, que no rato tem duração de 21 dias. Assim, no 17º dia, o estômago é revestido por um epitélio pseudo-estratificado, e no 18º dia de vida intra-uterina, inicia-se a diferenciação de algumas células (Alvares, 1994). No 19º e 20º dia, notam-se dobras indicativas da formação glandular, as células migram em direção ao mesênquima, enquanto o tecido epitelial torna-se simples e com células colunares (Alvares, 1994; Goldfeder e Alvares, 2001). No primeiro dia de vida pós-natal, o estômago apresenta glândulas rasas e ainda imaturas, enquanto após três semanas, elas estão diferenciadas e organizadas, de forma que as células mucosas superficiais recobrem a fosseta; células parietais, mucosas do colo e endócrinas se espalham pela glândula, e as células zimogênicas restringem-se à base glandular (Lee et al., 1982) (Figura 1). Durante o desenvolvimento pós-natal, também tem início a síntese de peptídeos que serão fundamentais para o crescimento do estômago (De Andrade Sá et al., 2003).

Além de representar a unidade funcional da região do corpo do estômago, a glândula gástrica também desempenha um papel importante na renovação do tecido

epitelial. Como mencionado acima, células tronco fazem parte da população, e durante as três primeiras semanas de vida pós-natal o compartimento proliferativo ocupa toda a extensão da glândula. Aos 21 dias, a proliferação celular começa a se concentrar nas regiões de istmo e colo, e aos 30 dias o compartimento está totalmente restrito a essa área (Alvares e Gama, 1993).

Figura 1. Fotomicrografia da mucosa gástrica na região do corpo do estômago de rato adulto. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento original: 40X.

As etapas do desenvolvimento morfofisiológico do estômago do rato são paralelas às variações da dieta. A partir do nascimento o animal entra em contato com o colostro e o leite materno, e este será sua única fonte de alimentação nas duas

primeiras semanas de vida. Ao decorrer do desenvolvimento, já no final da segunda semana, o leite será gradualmente substituído por ração. Nessa fase, ocorre também a abertura dos olhos e o crescimento dos dentes, que permitem ao filhote roer a ração deixada pela mãe. Aos 28 dias, o desmame é naturalmente completo, porém para animais de laboratório, a mudança do padrão alimentar é estabelecida e realizada no 21º dia, colocando fim a etapa de amamentação (Henning, 1981).

Como descrito anteriormente, a amamentação marca o primeiro contato dos filhotes com o alimento, e com os fatores nutricionais presentes tanto no colostro como no leite. O leite materno é rico em gorduras e seu principal carboidrato é a lactose, mas esta secreção contém também vários peptídeos biologicamente ativos como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformante beta (TGF β), o fator de crescimento neural (NGF), insulina, prolactina, somatostatina, o hormônio liberador do hormônio tireoideano (TRH), o hormônio estimulador da tireóide (TSH), glicocorticóides (GCs) entre outros (Koldovský, 1989; Penttilä et al., 1998). Discute-se que esses e outros componentes do leite funcionam como um suprimento para o filhote, até que a produção endógena atinja concentrações adequadas (Smith-White e Ojeda, 1984; Gama e Alvares, 1996; Penttilä et al., 1998; De Andrade Sá et al., 2008; Ogias et al., 2009).

Os processos de crescimento e amadurecimento do estômago dependem de uma combinação entre proliferação, migração, diferenciação, maturação e morte celular, iniciados na vida intra-uterina. Desde a fase fetal até as três primeiras semanas de vida pós-natal, ocorrem muitas modificações que resultam na formação das glândulas gástricas (Alvares, 1994; Gama e Alvares, 2000). Este processo intenso de crescimento aliado à renovação celular constante são essenciais para manutenção de todo trato gastrointestinal (Wong e Wright, 1999). No estômago a proliferação celular é controlada por uma complexa interação entre o estado nutricional, moléculas presentes no leite, microbiota luminal e o programa genético (Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al., 2005; De Andrade Sá et al., 2008).

Como mencionamos anteriormente, durante o crescimento do rato, o alimento sólido começa a ser “tocado” e consumido entre a segunda e terceira semanas de vida

pós-natal (Henning, 1981). A fase de alimentação mista, que representa o início do desmame, coincide com a diferenciação e amadurecimento das células gástricas (Johnson, 1985; Karam e Leblond, 1992). A variação na dieta parece influenciar também a resposta proliferativa induzida por variados estímulos. Alvares (1992) e Alvares e Gama (1993) submeteram animais de diferentes idades ao jejum alimentar¹ e observaram que durante a fase de amamentação exclusiva (até 14 dias) bem como durante o período de alimentação mista (18 dias) ocorre forte estímulo sobre a proliferação celular no epitélio gástrico. No desmame (21 dias), o jejum não tem efeito sobre o processo, enquanto na fase de alimentação sólida (aos 30 dias) ocorre inibição da proliferação. No entanto, ao anteciparmos o desmame para o 15º dia (desmame precoce) e em seguida submetermos o filhote de 18 dias ao jejum, ocorre uma forte inibição da proliferação celular gástrica, mimetizando o comportamento do animal adulto (Gama e Alvares, 2000), e sugerindo um forte papel da alimentação sobre o comportamento proliferativo da mucosa.

O padrão alimentar também influencia a expressão de fatores de crescimento no epitélio gástrico. Estudos de nosso laboratório mostraram que a mucosa gástrica sintetiza TGF β e seus receptores ao longo do desenvolvimento peri e pós-natal (De Andrade Sá et al., 2003). Quando submetemos os filhotes ao jejum, verificamos uma redução da distribuição de TGF β 3 na mucosa gástrica (Alvares et al., 2007), enquanto o desmame precoce seguido de jejum, aumenta os níveis teciduais de TGF β 3 e do receptor T β RI (Ogias et al., 2009). Osaki et al. (2007) demonstraram que a expressão do fator de crescimento transformante alfa (TGF α) também responde ao desmame precoce, de modo que ocorre um aumento de sua distribuição e concentração na mucosa gástrica. Assim, o tipo e a presença do alimento podem estar associados ao controle da produção de fatores de crescimento, que por sua vez, agem localmente sobre o desenvolvimento do estômago.

Os hormônios obtidos do leite e produzidos pelo filhote constituem outro elemento importante no mecanismo de controle do crescimento do trato gastrointestinal. Gama e Alvares (1996) estudaram o efeito do LHRH e da somatostatina sobre a

¹ No texto serão empregados os termos “jejum” e “restrição alimentar” como sinônimos.

hiperproliferação celular induzida pelo jejum no epitélio gástrico em ratos de 18 dias, e mostraram que ambos os hormônios são inibitórios. O tratamento com glicocorticóides também provoca inibição da proliferação celular epitelial tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além de induzir as células à apoptose (Gama e Alvares, 1998; Gama et al., 2000).

Existe uma forte e ampla relação entre o estado nutricional de mamíferos e a atividade do eixo hipotálamo-adreno-hipofisário. Gama e Alvares (1998) observaram uma elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona após submeter ratos de 18 dias ao jejum. A retirada total do alimento pode afetar diferencialmente a proliferação celular gástrica de acordo com a idade (Alvares e Gama, 1993), porém representa um forte estresse tanto para o filhote quanto para o rato adulto, levando a maior liberação de corticosterona para o plasma (Woodward et al., 1991).

1.2 Corticosterona

Os glicocorticóides (GCs) são hormônios esteroidais produzidos e secretados pela região cortical da glândula adrenal, e devido à sua natureza lipofílica, essas moléculas são capazes de se difundir rapidamente pela membrana celular. São responsáveis por muitos efeitos fisiológicos e são largamente utilizados como antiinflamatórios e como indutores do amadurecimento de vários sistemas biológicos desde as fases precoces de vida (Newton, 2000). Em mulheres com possibilidade de parto prematuro, os glicocorticóides são administrados ao final da fase gestacional, a fim de que o feto tenha o desenvolvimento pulmonar acelerado, evitando complicações respiratórias. Os GCs respondem rapidamente a muitos estímulos, e são responsáveis pela reação do organismo ao estresse.

Em roedores o glicocorticóide mais importante é a corticosterona, assim como em humanos tem-se o cortisol. No rato os níveis plasmáticos de corticosterona elevam-se em períodos diferentes do desenvolvimento. O primeiro pico pré-natal ocorre entre o 18º e 20º dia de vida fetal (Holt e Oliver, 1968) antecedendo o final da gestação. Após o

nascimento, há um aumento gradual de corticosterona a partir do 14º dia, mas é no 24º dia que ocorre um segundo pico (Henning, 1978), sendo que este período coincide com a complexa maturação do animal. Além disto, até os 21 dias, a corticosterona também é fornecida aos filhotes através do leite (Koldovský, 1980, Hazum, 1983, Yeh, 1984). Durante as três primeiras semanas de vida pós-natal, os animais ainda não possuem ritmo circadiano estabelecido para a secreção de corticosterona (Ramaley 1973). O ritmo em roedores inicia-se por volta do 22º dia de vida e no animal adulto encontra-se plenamente definido com um pico ao entardecer (Ramaley 1972; Lightman et al., 2008)

Os níveis plasmáticos de corticosterona podem aumentar frente a um estímulo como o estresse, sendo essa uma resposta característica do córtex da adrenal (Axelrod e Reisine, 1984). Animais em desenvolvimento, até a 3ª semana de vida pós-natal, são muito susceptíveis ao estresse. Qualquer distúrbio com a mãe (Takahashi e Kalin, 1991) ou com a ninhada, como manuseio ou injeção de substâncias irritantes estressam os filhotes e elevam os níveis plasmáticos de GCs (Henning, 1978; Lombard et al., 1983). Mizoguchi et al. (2001) observaram que em ratos a concentração plasmática de corticosterona aumenta imediatamente após o estímulo estressor, permanece alta por até 5 h, e então decai à níveis basais. Os glicocorticóides têm uma ação sistêmica não só em órgãos considerados vitais como pulmão e cérebro, mas também atuam sobre processos fisiológicos em todo trato gastrintestinal.

Kumegawa et al. (1978) observaram que a administração de hidrocortisona induz o amadurecimento precoce de células zimogênicas, que resulta na síntese antecipada de pepsinogênio, e também revelaram que esse efeito pode ser potencializado por outros hormônios como a tiroxina. Tseng e Johnson (1986) verificaram que o tratamento com corticosteróides induz o aumento da secreção ácida e de pepsinogênio no estômago de ratos com 10 dias de vida indicando também o amadurecimento precoce do órgão.

Solomon et al. (2001) mostraram que na fase pré-natal há um período de hiporresponsividade à dexametasona no intestino de camundongos. Este órgão se torna responsivo somente durante a segunda e a terceira semana de vida pós-natal, quando a administração hormonal promove a elevação da enzima trealase, marcador

de maturação intestinal (Solomon et al., 2001). Em ratos, a atividade intestinal da enzima sacarase, que representa outro marcador importante de diferenciação, também é induzida pela corticosterona (Yeh et al., 1986).

Miyata et al. (2008) mostraram que a retirada completa da adrenal provoca a diminuição da proliferação celular na cripta e do crescimento intestinal de ratos, indicando a ação do hormônio sobre o desenvolvimento do órgão. Em ratos adultos, o tratamento por 33 dias com GCs provocou o aumento de células em proliferação tanto no esôfago quanto no jejuno (Gunin e Nikolaev, 1999). Embora esses estudos *in vivo*, mostrem que a administração de hidrocortisona estimula a proliferação celular no intestino delgado (Herbst e Sunshine, 1969), outros grupos obtiveram respostas diferentes (Buts et al., 1983; Arsenault e Ménard, 1984). *In vitro*, a adição desses esteróides à cultura inibe a proliferação celular e a restituição epitelial de IEC-6 e HT-29 derivadas de intestino (Jung et al., 2001).

No estômago, Gama e Alvares (1998) submeteram animais de 18 dias ao tratamento com corticosterona e observaram diminuição da espessura da mucosa gástrica, acompanhada de inibição de proliferação celular epitelial, diminuição do potencial de duplicação e da taxa de produção celular. No entanto, quando os filhotes foram submetidos ao jejum e os níveis de corticosterona endógena aumentaram (Gama e Alvares, 1998), houve aumento da espessura da mucosa gástrica e a proliferação celular na mucosa gástrica foi estimulada (Alvares e Gama, 1993). Gama et al. (2000) estudaram o efeito do tratamento com corticosterona *in vitro* e *in vivo*, e observaram que nos dois modelos o hormônio induziu a inibição de síntese de DNA e levou as células da mucosa gástrica à apoptose. Em cultura de células derivadas de epitélio gástrico, Luo et al. (2007) observaram que a adição de dexametasona inibiu a proliferação celular induzida por FGF, e reduziu o nível dos receptores de FGF e a ativação da via ERK1/ERK2, diminuindo a síntese de DNA.

Em ratos, a retirada completa do alimento induz o aumento de corticosterona tanto em filhotes quanto em animais adultos (Woodward et al., 1991; Gama e Alvares, 1998). Concomitante ao elevado nível plasmático hormonal, o jejum representa um forte estímulo proliferativo para mucosa gástrica em filhotes e um potente inibidor de

proliferação celular gástrica em adultos (Alvares e Gama, 1993). No entanto, a concentração de GC circulante não é suficiente para indicar a atividade hormonal efetiva, uma vez que a biodisponibilidade da corticosterona é regulada pela *corticosterone binding globulin* (CBG), *clearance* plasmático, e atividade de seu receptor (GR) (Fleshner et al., 1995; Woodward et al., 1991; Breuner e Orchinik, 2002; Yudt e Cidlowski, 2002).

A corticosterona circula no plasma sob duas formas, ligada à CBG ou livre, e juntas constituem o nível total de corticosterona. A forma livre é responsável pelos efeitos biológicos no organismo. Fleshner et al. (1995) mostraram que um estresse agudo pode elevar de modo persistente a concentração de corticosterona livre, permitindo que a ação do hormônio seja amplificada temporalmente. O estudo dos agentes biorreguladores de corticosterona é de fundamental importância para o conhecimento de sua atividade em diferentes sistemas.

1.3 *Corticosterone binding globulin* (CBG)

A CBG foi identificada e caracterizada física e quimicamente por Muldon e Westphal (1967) por meio do estudo de plasma humano. É uma glicoproteína da superfamília de inibidores das serina-proteases (SERPIN), sintetizada principalmente no fígado. A produção de CBG inicia-se ainda na fase fetal, do meio para o fim da gestação e declina a níveis baixos no período peri-natal (Smith e Hammond, 1991; Scrocchi et al., 1993). Em ratos, a concentração de CBG no plasma aumenta no 12º dia de vida pós-natal antecedendo em dois dias a elevação da corticosterona plasmática (Henning, 1978). Apesar de sintetizada no fígado, a CBG também pode ser detectada em outros tecidos, como no hipotálamo (Mopert et al., 2006).

A CBG é uma proteína altamente conservada entre as espécies, tem peso molecular entre 50 e 60 KDa e apresenta um único sítio específico de ligação ao esteróide (Hammond, 1990, Breuner e Orchinik, 2002; Klieber et al., 2007), podendo ligar-se também a glicocorticóides sintéticos, como a hidrocortisona e a dexametasona. Dentre os fatores que podem regular a biodisponibilidade dos GCs, a CBG é

extremamente importante, pois sua ligação é de alta afinidade (80-90%) (Hammond, 1990), e acaba por restringir a fração livre e funcional do hormônio (Henning, 1978; Leeper et al., 1988; Bright e Darmaun, 1995), impedindo sua passagem pela membrana plasmática e ativação do receptor.

Embora muitos estudos tenham considerado que a concentração de CBG é relativamente constante, outros trabalhos mostram que ocorrem variações, e consequentemente a disponibilidade de corticosterona pode ser alterada (Lynn et al., 2003, Love et al., 2004, Lewis et al., 2005; Breuner et al., 2006). Em situações nas quais o nível de CBG se modifica, ocorre variação na concentração de glicocorticóide livre, indicando que essa proteína transportadora tem função primordial de “tamponar” o hormônio no plasma. A meia vida da CBG em ratos adultos é de aproximadamente 14 horas e meia (Smith e Hammond, 1991). Alguns autores sugerem que existe um receptor para CBG, e que uma vez ligada a ele, pode ocorrer a internalização do complexo, carregando o GC para dentro da célula, e ativando o AMPc como segundo mensageiro (Breuner e Orchinik, 2002). Esta hipótese poderia então representar outro mecanismo de entrada de glicocorticóide na célula.

Os fatores que afetam o nível de CBG são ainda desconhecidos, embora alguns estudos relacionem alterações de sua concentração e capacidade de ligação a agentes estressores ou a tratamentos com GCs sintéticos. Zhao et al. (1997) mostraram que o tratamento com dexametasona induz a expressão gênica de CBG em fígado e rins imaturos em camundongos. A administração de dexametasona a ratos machos também leva à diminuição da capacidade de ligação da CBG e à redução de sua expressão (Smith e Hammond, 1992).

Fleshner et al. (1995) estudaram a concentração de CBG após o estresse provocado por choque caudal em ratos e observaram uma diminuição concomitante ao aumento de corticosteróide livre no plasma. D’Elia et al. (2005) também encontraram redução da capacidade de ligação da CBG após lesão por queimadura em camundongos. Woodward et al. (1991) mostraram que o jejum por 48 h induz o aumento da concentração plasmática de GCs e diminuição da CBG em ratos adultos, e observaram ainda que existe variação da resposta entre machos e fêmeas, as quais

reagem mais fortemente. Lynn et al. (2003) verificaram também uma redução da CBG quando pássaros são submetidos ao jejum. A mudança de dieta e a restrição do alimento podem funcionar como um estresse e fazer com que mais corticosterona circule, porém o hormônio deve estar sob a forma livre para que seja internalizado, ative seu receptor e desencadeie seus efeitos.

1.4 Receptor de glicocorticóide (GR)

O GR é uma proteína intracitoplasmática, descrita em 1968 por Allan Munck e colaboradores. Em 1985 foi clonado por Hollenberg e colaboradores, e em 1991, Encio e Detera-Wadleigh elucidaram a estrutura e localizaram o GR em humanos.

O GR é uma proteína com 777 aminoácidos e aproximadamente 94 KDa, membro de uma família de receptores nucleares que agem como fatores de transcrição dependentes de ligante. O GR não ligado ao esteróide localiza-se preferencialmente no citoplasma, enquanto que o GR ligado ao esteróide é levado rapidamente por translocação para o núcleo ($t_{1/2}$ = 5-10 min) (Qi et al., 1989) por meio de uma rede de microtúbulos (Galigniana et al., 1998). No núcleo, o GR liga-se a sítios em genes alvo, que são conhecidos como elementos responsivos a glicocorticóides (GREs) (Yudt e Cidlowski, 2002; Lu e Cidlowski, 2004). Uma vez ligados a GREs positivos, a maquinaria de transcrição é ativada principalmente para genes envolvidos na regulação metabólica (Bamberger et al., 1997).

Em humanos há duas isoformas para o receptor, o GR α e o GR β esse último formado a partir de um *splicing* alternativo do RNAm na região carboxi terminal do GR α . O GR β possui uma cadeia menor com 742 aminoácidos, pode não se ligar diretamente ao glicocorticóide, e sugere-se que ele possa regular negativamente a atividade do receptor tipo α (Encio e Detera-Waldleigh, 1991; Oakley et al., 1999). Discute-se que a variante β esteja também relacionada aos mecanismos de resistência ao glicocorticóide em humanos (Schaaf e Cidlowski, 2003), que pode ainda ocorrer devido a uma diminuição de GR α (Sánchez-Vega et al., 2006). O GR α medeia principalmente a

ativação de genes alvo por conter sítios de ligação para o hormônio e sítios que reconhecem GREs (Yudt e Cidlowski, 2002; Lu e Cidlowski, 2004). A presença de GR β em outras espécies ainda não está clara, porém recentemente essa isoforma foi identificada em *zebrafish* (Schaaf et al., 2008) e em ratos (Ju et al., 2009).

Acredita-se que a maioria dos efeitos dos GCs nas células seja mediada pelo GR (Sheppard et al., 1999; Sheppard et al., 2000; Sheppard, 2002). Por sua natureza lipofílica, os GCs têm a capacidade de se difundir pela membrana plasmática e chegar ao citoplasma. Resumidamente, o GC plasmático livre atravessa a membrana e encontra o GR que está no citoplasma. Em seguida, ocorre a ligação entre o hormônio e o receptor, que se dimeriza com outra molécula idêntica, é ativado, e todo o complexo migra para o núcleo celular. Neste ponto, ocorre o acoplamento do complexo ao GRE localizado em um ou mais genes alvo, e assim o GR funciona como fator de transcrição (Figura 2) (Madan e DeFranco, 1993, DeFranco, 2000).

Figura 2. Esquema simplificado da ação do GR.

No citoplasma, o GR não ligado aos glicocorticóides está associado a um complexo protéico formado por chaperonas que incluem *heat shock proteins* (HSP) 70 e 90, *heat hock cognate* (HSC) 70, p23, entre outras. Essas chaperonas colaboram para estabilidade e conformação do receptor (Hutchison et al., 1994; Rajapandi et al., 2000), mantendo os dobramentos que propiciam a alta afinidade pelo ligante (Czar et al., 1997) e a translocação do GR para o núcleo celular (Furay et al., 2006) (Figura 2). Além disso, a associação do GR com a HSP 90 tem papel fundamental na proteção do receptor contra degradação por ubiquitinação ou proteólise (Dittmar et al., 1997; Spencer et al., 2000; Zhang et al., 2006).

A função e a presença de HSP 70 no complexo com o GR são controversas, sendo que em alguns modelos ela é imprescindível para que a HSP 90 se associe ao GR. Estudos revelam que a HSP 70 assim como a HSP 90 são importantes para o

dobramento protéico em cultura de células mantidas ou não sob estresse (Bukau e Horwich, 1998). Cvorovic e Matic (2002) observaram que a expressão de HSP 70 é induzida em fígado de rato após choque hipertérmico. David et al. (2002) estudaram porcos durante o desmame e observaram a presença de HSP 70, 90 e p23 ao longo de todo trato gastrointestinal, e em especial no estômago. Nelson et al. (2004) descreveram a participação de chaperonas e co-chaperonas na maturação funcional do GR em modelos *in vitro*.

A presença de proteínas chaperonas (HSP 70 e 90) em células nas quais o GR está presente é de suma importância para a capacitação funcional do receptor, já que sua ativação depende da dissociação desse complexo, seguido de uma dimerização e por fim a migração para o núcleo celular.

Costa et al. (1996) mapearam a distribuição do GR em embriões humanos utilizando imuno-histoquímica e detectaram-no em diferentes órgãos, incluindo o estômago, mais especificamente, a mucosa gástrica. Mais tarde, Kanemasa et al. (1999) identificaram e localizaram o GR em células parietais no estômago de ratos. Nesses animais, o GR também está presente no córtex cerebral, hipocampo, músculo esquelético, intestino, e outros órgãos (Kalinyak et al., 1989; Spencer et al., 2000; Murphy et al., 2002; Yao et al., 2006; Galeeva et al., 2006).

O estímulo estressor desencadeia a secreção de corticosterona no plasma, pode modificar a capacidade de ligação da CBG e também altera a síntese do GR em muitos tipos celulares. Alguns estudos indicam que a expressão do GR é regulada pelos níveis hormonais circulantes. Spencer et al. (1996) observaram que tanto a expressão protéica quanto o *binding* do GR foram maiores em ratos que passaram por estresse, ou seja, a alta concentração hormonal induziu a síntese de GR e a ligação entre o receptor e a corticosterona. Al-Mohaisen et al. (2000) mostraram o estresse por imobilização aumenta a expressão de GR no fígado.

1.5 Controle da progressão do ciclo celular

O ciclo celular compreende quatro fases distintas: G_1 , S, G_2 e M. Durante todas essas fases a célula passa por pontos de checagem, nos quais complexos protéicos verificam a integridade de várias moléculas, e “decidem” pela progressão, ajuste ou parada do ciclo celular. As proteínas que controlam essas fases são denominadas ciclinas e quinases dependentes de ciclina (cdk), e essas duas classes protéicas se combinam aos pares (ciclina-cdk). A atividade dos complexos é regulada por modificações transcricionais, pós-translacionais e pela taxa de degradação (Alberts et al., 2008).

A fase G_1 é definida como um intervalo (*gap 1*- G_1) entre a mitose e a próxima fase de síntese de DNA (S), e para a maioria das células é um intervalo que pode durar muitas horas, permitindo que a célula cresça e sintetize as moléculas necessárias para o prosseguimento para próxima fase. Durante G_1 , mais precisamente da metade para o final dessa fase, a ciclina D associa-se a cdk 4 ou cdk 6. Ao final, na transição entre as fases G_1 e S, a concentração e a atividade de ciclina D- cdk4/6 diminui muito e inicia-se o controle pelo complexo ciclina E-cdk 2. Em S ocorre a síntese de DNA, e nessa fase o complexo formado e ativado é composto por ciclina A-cdk 2 que além de estimular a replicação também controla a transição S/ G_2 . Para entrada da célula em divisão (M), as ciclinas A e B se complexam com cdk 1 e estimulam a progressão para mitose. A degradação das ciclinas A e B e inativação da cdk 1 são responsáveis pelo retorno da célula à fase G_1 (Pardee, 1989) (Figura 3).

Figura 3. Esquema simplificado da regulação do ciclo celular (Osaki, 2009).

A regulação do complexo ciclina-cdk é realizada por proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKIs), e essas proteínas pertencem a duas famílias: INK4, da qual fazem parte p15, p16, p18 e p19 e Kip1/Cip1 que compreende as proteínas p21^{Kip1}, p27^{Cip1(2)} e p57. As CKIs se ligam aos complexos de ciclina-cdk e inibem sua atividade catalítica (Morgan, 1995). Entretanto, recentemente, tem-se discutido muito o papel da p21 como proteína exclusivamente inibitória do complexo ciclina D- cdk 4. Alt et al. (2002) observaram que a p21 promove um acúmulo nuclear de ciclina D, colaborando com a progressão do ciclo celular. Sheng et al. (2006) e Stehr et al. (2006) sugerem que a p21 é fundamental no estímulo à proliferação de enterócitos. Wierod et al. (2008) mostraram que a p21 estimula a translocação nuclear de cdk, participando de forma efetiva na progressão do ciclo celular.

O efeito antiproliferativo dos GCs depende diretamente da atividade dos GRs e de proteínas do ciclo celular. Rogatsky et al. (1997) observaram que existe um envolvimento entre a ativação do GR, a repressão transcricional de ciclina E- cdk 2 e o aumento de transcrição de p27 e p21 em células transformadas. Wang e Garabedian, (2003) estudaram a correlação entre o grau de atividade do receptor e as cdks, e observaram que a proteína p27 está diretamente envolvida com o GR. Em diferentes experimentos, os autores mostraram que animais deficientes em p27 são resistentes à ação inibitória do glicocorticóide. Ausserlechner et al. (2004) demonstraram que os GCs

² Essas proteínas serão nomeadas no decorrer do texto como p21 e p27.

reduzem os níveis de c-myc e ciclina D3 e levam ao aumento de p27 em células linfoblásticas de pacientes com leucemia, sugerindo que essas proteínas regulatórias do ciclo celular sejam alvo da ação dos glicocorticóides. Durante o jejum, Ko et al. (2002) mostraram que o nível de ciclina D3 não é alterado pelo tratamento, porém a expressão de cdk 4 diminui significativamente.

2 CONCLUSÃO

Constatamos que em ratos de 18 dias, o jejum aumentou a concentração de corticosterona plasmática e a capacidade de ligação da CBG, o que diminuiu a disponibilidade do hormônio e acabou por reduzir o trânsito de GR para o núcleo. A atividade baixa do receptor refletiu-se em níveis elevados de proteínas que permitem a progressão do ciclo celular, em especial a ciclina D e a p21, possibilitando o estímulo da proliferação do epitélio gástrico. Em ratos de 40 dias, demonstramos que o jejum aumentou a concentração de corticosterona plasmática, porém alterou pouco a capacidade de ligação da CBG, o que permitiu a maior disponibilidade do hormônio e o trânsito de GR para o núcleo celular. A alta atividade do receptor aumentou muito o nível de p27 na mucosa gástrica, possibilitando a inibição da proliferação celular epitelial.

Nós concluímos que o estresse induzido pelo jejum regula diferencialmente a ação da corticosterona no estômago de ratos de 18 e 40 dias de vida pós-natal. Sugerimos que a variação da resposta nas duas idades pode estar diretamente ligada ao estímulo e à inibição da proliferação celular descritos no epitélio gástrico em animais em diferentes fases do desenvolvimento. Finalmente, o mecanismo de regulação verificado nos filhotes pode ser importante para permitir o crescimento durante condições nutricionais adversas.

REFERÊNCIAS³

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

Al-Mohaisen M, Cardounel A, Kalimi M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. *Steroids*. 2000;65:8-15.

Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. p21^(Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem*. 2002;277:8517-23.

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.

Alvares EP, Jordão LR, Gama P. Differential distribution of transforming growth factor β and receptors in the hyper or hypoproliferative gastric mucosa of developing and adult rats. *Histol Histopatol*. 2007;22:147-53.

Alvares EP. Circadian rhythms of mitotic activity in gastric mucosa of feeding and fasting rats. *Prog Clin Biol Res*. 1987;227A:353-60.

Alvares EP. Extensive networks of TMPase positive lysosomes are present in fetal rat gastric epithelium before over differentiation. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1994;26:515-23.

Alvares EP. The Effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day old suckling rat. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25:641-9.

Arsenault P, Ménard D. Comparative study of the effect of hydrocortisone and thyroxine on suckling mouse small intestine in organ culture. *Comp Biochem Physiol*. 1984;77:721-5.

Ausserlechner MJ, Obexer P, Bock G, Geley S, Kofler R. Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ*. 2004;11:165-74.

Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones their interaction and regulation. *Science*. 1984;224:452-9.

AyanlarBatuman O, Ferrero AP, Diaz A, Jimenez SA. Regulation of transforming growth factor- β 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1991;88:1574-80.

³ 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]

Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ. p27^{Kip1} and p21^{Cip1} are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol.* 2003;23:7285-90.

Bamberger CM, Bamberger A-M, De Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor β , a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest.* 1995;95:2435-41.

Bamberger CM, Wald M, Bamberger A-M, Schulte HM. Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;131:233-40.

Beane ML, Cole MA, Spencer RL, Rudy JW. Neonatal handling enhances contextual fear conditioning and alters corticosterone stress responses in young rats. *Horm Behav.* 2002;41:33-40.

Berdusco ETM, Hammond GL, Jacobs RA, Grolla A, Akagi K, Langlois D, Challis JRG. Glucocorticoid-induced increase in plasma corticosteroid-binding globulin levels in fetal sheep is associated with increased biosynthesis and alterations in glycosylation. *Endocrinology.* 1993;132:2001-8.

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.

Breuner CW, Lynn SE, Julian GE, Cornelius JM, Heidinger BJ, Love OP, Sprague RS, Wada H, Whitman BA. Plasma-binding globulins and acute stress response. *Horm Metab Res.* 2006;38:260-8.

Breuner CW, Orchinik M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol.* 2002;175:99-112.

Bright GM, Darmaun D. Corticosteroid-binding globulin modulates cortisol concentration responses to a given production rate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:764-9.

Bukau B, Horwich AL. The HSP-70 and HSP-60 chaperone machines. *Cell.* 1998;92:351-66.

Buts JD, De Meyer R, Kolanowski J. Ontogeny of cell proliferation and DNA synthesis in rat colon: role of glucocorticoids. *Am J Physiol.* 1983;244:G469-74.

Challis JRG, Berdusco ETM, Jeffray TM, Yang K, Hammond GL. Corticosteroid-binding globulin (CBG) in fetal development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;53:523-7.

Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, Kino T. The human glucocorticoid receptor (hGR) β isoform suppresses the transcriptional activity of hGR α by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol.* 2005;19:52-64.

Costa A, Rocci MP, Arisio R, Benedetto C, Fabris C, Bertino E, Botta G, Marozio L, Mostert M, Urbano D, Emanuel A. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in tissue of human embryos. *J Endocrinol Invest.* 1996;19:92-8.

Cvoro A, Matic G. Hyperthermic stress stimulates the association of both constitutive and inducible isoforms of 70 KDa heat shock protein with rat liver glucocorticoid receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:279-85.

Czar MJ, Galigniana MD, Silverstein AM, Pratt WB. Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry.* 1997;36:7776-85.

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.

David JC, Grognet JF, Lalles JP. Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. *J Nutr.* 2002;132:2551-61.

De Andrade Sá ER, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. In vivo effects of TGFβ1 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 TGFβ1, 2 and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. *Dev Dyn.* 2003;227:450-7.

DeFranco DB. Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int.* 2000;57:1241-9.

D'Elia M, Patenaude J, Hamelin C, Garrel DR, Bernier J. Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E852-60.

Deschênes C, Vézina A, Beaulieu JF, Rivard N. Role of p27^(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology.* 2001;120:423-38.

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^{KIP1} and p21^{CIP1/WAF1} 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.

Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, Pratt WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. *J Biol Chem.* 1997;272:21213-20.

Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1991;266:7182-8.

Fleshner M, Deak T, Spencer RL, Laudenslager ML, Watkins LR, Maier SF. A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure *Endocrinology*. 1995;136:5336-42.

Furay AR, Murphy EK, Mattson MP, Guo Z, Herman JP. Region-specific regulation of glucocorticoid receptor/HSP90 expression and interaction in brain. *J Neurochem*. 2006;98:1176-84.

Galeeva A, Ordyan N, Pivina S, Pelto-Huikko M. Expression of glucocorticoid receptors in the hippocampal region of the rat brain during postnatal development. *J Chem Neuroanat*. 2006;31:216-25.

Galnigiana MD, Scruggs JL, Herrington J, Welsh MJ, Carter-Su C, Housley PR, Pratt WB. Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol*. 1998;12:1903-13.

Gama P, Alvares EP. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation in the gastric epithelium of suckling rats. *J Gastroenterol*. 1998;33:32-8.

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.

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

Gama P, Goldfeder EM, Moraes JC, Alvares, EP. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. *Anat Rec*. 2000;260:213-21.

Goldfeder EM, Alvares EP. Effects of somatostatin, LHRH and TGF α on epithelial cell proliferation in fetal stomach maintained in organ culture. *Braz J Morphol Sci*. 2001;18:21-8.

Gunin AG, Nikolaev DV. Effect of acute and chronic glucocorticoid treatments on epithelial cell proliferation in the esophagus and small intestine of rats. *J Gastroenterol*. 1999;34:661-7.

Hammond GL, Lähteenmäki PL. A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. *Clin Chim Acta*. 1983;132:101-10.

Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev*. 1990;11:65-79.

- Hazum E. Hormones and neurotransmitters in milk. *Trends Pharmacol Sci.* 1983;4:454-6.
- Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8:321-30.
- Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol.* 1981;70:217-89.
- Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol.* 1978;235:E451-6.
- Henning SJ. Postnatal Development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol.* 1981;41:G199-214.
- Herbst JJ, Sunshine P. Postnatal development of the small intestine of the rat. *Pediatr Res.* 1969;3:27-33.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318:635-41.
- Holt PG, Oliver IT. Plasma corticosterone concentration in prenatal rat. *Biochem J.* 1968;108:339-41.
- Hu JM, Bodwell JE, Munck A. Cell cycle-dependent glucocorticoid receptor phosphorylation and activity. *Mol Endocrinol.* 1994;8:1709-13.
- Hu JM, Bodwell JE, Munck A. Control by basal phosphorylation of cell cycle-dependent, hormone-induced glucocorticoid receptor hyperphosphorylation. *Mol Endocrinol.* 1997;1:305-11.
- Hutchison KA, Dittmar KD, Pratt WB. All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure, a "foldosome". *J Biol Chem.* 1994;269:27894-9.
- Jiang W, Zhu Z, Bhatia N, Agarwal R, Thompson HJ. Mechanisms of energy restriction: effects of corticosterone on cell growth, cell cycle machinery, and apoptosis. *Cancer Res.* 2002;62:5280-7.
- Johnson LR. Functional development of the stomach. *Ann Rev Physiol.* 1985;47:199-215.
- Ju H, Wang X, Liu Z, Liu P, Zhao Y, Xiong R, Zhou Y, Chen X. Identification and tissue distribution of a novel rat glucocorticoid receptor splice variant. *Acta Biochim Pol.* 2009;56:109-13.

Jung S, Fehr S, Harder-d'Heureuse J, Wiedenmann B, Dignass AU. Corticosteroids impair intestinal epithelial wound repair mechanisms in vitro. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36:963-70.

Kalinyak JE, Griffin CA, Hamilton RW, Bradshaw JG, Perlman AJ, Hoffman AR. Developmental and hormonal regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA in the rat. *J Clin Invest.* 1989;84:1843-8.

Kanemasa H, Ozawa H, Konishi H, Ito T, Nishi M, Mitsufuji S, Kodama T, Hattori T, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity in gastric mucosa of normal and adrenalectomized rats. *Dig Dis Sci.* 1999;44:2081-7.

Karam SM, Leblond CP. Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. *Anat Rec.* 1992;232:231-46.

Kelly A, Bowen H, Jee YK, Mahfiche N, Soh C, Lee T, Hawrylowicz C, Lavender P. The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:203-8.

Klieber MA, Underhill C, Hammond GL, Muller YA. Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *J Biol Chem.* 2007;282:29594-603.

Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Mysliwski A. The effects of fasting and refeeding on adrenal cortex morphometry and serum concentrations of ACTH and corticosterone in young and old male rats. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:77-84.

Ko TC, Pan F, Sheng H, Brown DB, Thompson EA, Beauchamp RD. Cyclin D3 is essential for intestinal epithelial cell proliferation. *World J Surg.* 2002;26:812-8.

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

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

Koldovský O. Hormones in milk. *Life Sci.* 1980;26:1833-6.

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

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997;11:847-62.

- Lee ER, Transler 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 weanling and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. *Pediatr Res.* 1983;17:645-50.
- Leeper LL, Schroeder R, Henning SJ. Kinetics of circulating corticosterone in infant rats. *Pediatr Res.* 1988;24:595-9.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta.* 2005;359:189-94.
- Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC, Henley DE, Russell GM, Leendertz JA, McKenna MA, Spiga F, Wood SA, Conway-Campbell BL. The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol.* 2008;583:255-62.
- Lombard MN, Rieutort M, Strosser MT. Plasma levels of growth hormone, corticosterone and insulin, during induced hepatocyte synchronization in young rats. *Cell Tissue Kinet.* 1983;16:145-53.
- Love OP, Breuner CW, Vézina F, Williams TD. Mediation of a corticosterone-induced reproductive conflict. *Horm Behav.* 2004;46:59-65.
- Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell.* 2005;18:331-42.
- Lu NZ., Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:102-23.
- Luo JC, Chi CW, Lin HY, Chang FY, Lu CL, Chen CY, Lee SD. Dexamethasone inhibits epidermal growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320:687-94.
- Lynn SE, Breuner CW, Wingfield JC. Short-term fasting affects locomotor activity, corticosterone, and corticosterone binding globulin in a migratory songbird. *Horm Behav.* 2003;43:150-7.
- Macrì S, Chiarotti F, Würbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res.* 2008;191:227-34.
- Madan AP, DeFranco DB. Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3588-92.
- Miyata T, Minai Y, Haga M. Impaired growth of small intestinal epithelium by adrenalectomy in weaning rats. *Acta Histochem Cytochem.* 2008;41:83-8.

- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26:443-59.
- Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF. Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus. *Horm Metab Res*. 2006;38:246-52.
- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374:131-4.
- Muldoon TG, Westphal U. Steroid-protein interactions. XV. Isolation and characterization of corticosteroid-binding globulin from human plasma. *J Biol Chem*. 1967;242:5636-43.
- Munck A, Brinck-Johnsen T. Specific and nonspecific physio-chemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells *in vitro*. *J Biol Chem*. 1968;243:5556-65.
- Murphy EK, Spencer RL, Sipe KJ, Herman JP. Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. *Endocrinology*. 2002;143:1362-70.
- Nanthakumar NN, Dai D, Meng D, Chaudry N, Newburg DS, Walker WA. Regulation of intestinal ontogeny: effect of glucocorticoids and luminal microbes on galactosyltransferase and trehalase induction in mice. *Glycobiology*. 2005;15:221-32.
- Nelson GM, Prapapanich V, Carrigan PE, Roberts PJ, Riggs DL, Smith DF. The heat shock protein 70 cochaperone hsp70 enhances functional maturation of glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*. 2004;18:1620-30.
- Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000;55:603-13.
- Noorlander CW, De Graan PNE, Middeldorp J, Van Beers JJBC, Visser GHA. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: Effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *J Comp Neurol*. 2006;499:924-32.
- Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem*. 1999;274:27857-66.
- Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR Jr, Cidlowski JA. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 1997;138:5028-38.
- Ogias D, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. Corticosteroids induce the differential expression of TGF β 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- β 3 and T β RI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weaning rats. *Nutrition*. 2009; doi:10.1016/j.nut.2009.03.014.

Osaki LH, Curi MAF, Alvares EP, Gama P. The role of EGFR in the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa. *Mol Biol Cell*. 2007;18(suppl):71 (CD-ROM).

Osaki LH. O papel do fator de crescimento transformante alfa e do receptor do fator de crescimento epidermal na proliferação e diferenciação celular do epitélio gástrico de ratos em desenvolvimento [dissertação] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;2009.

Otto C, Reichardt HM, Schütz G. Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J Biol Chem*. 1997;272:26665-8.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246:603-8.

Penttilä IA, Van Spriël AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC. Transforming growth factor- β levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res*. 1998;44:524-31.

Presman DM, Hojiman E, Ceballos NR, Galigniana MD, Pecci A. Melatonin inhibits glucocorticoid receptor nuclear translocation in mouse thymocytes. *Endocrinology*. 2006;147:5452-59.

Qi M, Hamilton BJ, DeFranco D. v-mos oncoproteins affect the nuclear retention and reutilization of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*. 1989;3:1279-88.

Quaroni A, Tian JQ, Seth P, Ap Rhys C. p27^(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1045-57.

Quiros I, Mayo JC, Garcia-Suarez O, Hevia D, Martin V, Rodriguez C, Sainz RM. Melatonin prevents glucocorticoid inhibition of cell proliferation and toxicity in hippocampal cells by reducing glucocorticoid receptor nuclear translocation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;110:116-24.

Rajapandi T, Greene LE, Eisenberg E. The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:22597-604.

Ramaley JA. Change in daily serum corticosterone values in maturing male and female rats. *Steroids*. 1972;20:185-97.

Ramaley JA. The development of daily changes in serum corticosterone in pre weaning rats. *Steroids*. 1973;21:433-42.

Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3181-93.

Rosewicz S, McDonald AR, Maddux BA, Goldfine ID, Miesfield RL, Logsdon CD. Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J Biol Chem*. 1988;263:2581-4.

Sánchez-Vega B, Krett N, Rosen ST, Gandhi V. Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;12:3062-70.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev*. 1986;11:65-76.

Schaaf MJM, Champagne D, van Laanen IH, van Wijk DC, Meijer AH, Meijer OC, Spaink HP, Richardson MK. Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. *Endocrinology*. 2008;149:1591-9.

Schaaf MJM, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;83:37-48.

Scrocchi LA, Orava M, Smith CL, Han VKM, Hammond GL. Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice. *Endocrinology*. 1993;132:903-9.

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.

Sheppard KE, Hourigan S, Li KXV, Kzrozowski ZS. Novel nuclear corticosteroid binding in rat small intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279:G536-42.

Sheppard KE, Li KXZ, Auteliano DJ. Corticosteroid receptors and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in rat epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1999;277:G541-7.

Sheppard KE. Nuclear receptors II. Intestinal corticosteroid receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:G742-6.

Smith CL, Hammond GL. An amino acid substitution in biobreeding rat corticosteroid binding globulin results in reduced steroid binding affinity. *J Biol Chem*. 1991;266:18555-9.

Smith CL, Hammond GL. Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat. *Endocrinology*. 1991;128:983-88.

- Smith CL, Hammond GL. Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology*. 1992;130:2245-51.
- Smith-White S, Ojeda SR. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian LHRH receptors via milk LHRH. *Endocrinology*. 1984;115:1973-83.
- Solomon NS, Gartner H, Oesterreicher TJ, Henning SJ. Development of glucocorticoid-responsiveness in mouse intestine. *Pediatr Res*. 2001;49:782-88.
- Song C-Z, Tian X, Gelehrter TD. Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor- β signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. *PNAS*. 1999;96:11776-81.
- Spencer RL, Kalman BA, Cotter CS, Deak T. Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis. *Brain Res*. 2000; 868:275-86.
- Spencer RL, Miller AH, Moday H, McEwen BS, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR. Chronic social stress produces reduction in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology*. 1996;21:95-109.
- Stehr W, Bernal NP, Erwin CR, Bernabe KQ, Guo J, Warner BW. Roles for p21^{waf1/cip1} and p27^{kip1} during the adaptation response to massive intestinal resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G933-41.
- Takahashi LK, Kalin NH. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain Res*. 1991;558:75-8.
- Towers R, Naftali T, Gabay G, Carlebach M, Klein A, Novis B. High levels of glucocorticoid receptors in patients with active Crohn's disease may predict steroid resistance. *Clin Exp Immunol*. 2005;141:357-62.
- Tseng CC, Johnson LR. Does corticosterone affect gastric mucosal cell growth during development? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1986;250:G633-8.
- Wall JP, Cockrem JF. Effects of corticosterone treatment on responses to fasting in Japanese quail. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 2009;doi:10.1016/j.cbpa.2009.06.006.
- Wang Z, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation, phosphorylation, and growth inhibition by p27^{kip1}. *J Biol Chem*. 2003;26:50897-901.
- Wierod L, Rosseland CM, Linderman B, Oksvold MP, Grosvik H, Skarpen E, Huitfeldt HS. Activation of the p53-p21^{Cip1} pathway is required for CDK2 activation and S-phase entry in primary rat hepatocytes. *Oncogene*. 2008;27:2763-71.

- Wong WM, Wright NA. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol*. 1999;52:321-333.
- Woodward CJH, Hervey GR, Oakey RE, Whitaker EM. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br J Nutr*. 1991;66:117-127.
- Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAP phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem*. 2005;280:4117-24.
- Yao Z, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Modeling circadian rhythms of glucocorticoid receptor and glutamine synthetase expression in rat skeletal muscle. *Pharm Res*. 2006;23:670-9.
- 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.
- Yeh KY. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallel changes after induced stress. *Endocrinology*. 1984;115:1364-70.
- Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*. 2002;16:1719-26.
- Zhang X, Clark AF, Yorio T. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:700-8.
- Zhao XF, Scrocchi LA, Hammond GL. Glucocorticoids induce corticosteroid-binding globulin biosynthesis by immature mouse liver and kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997;60:163-9.