HELOISA GHIZONI

**DISTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE NA MUCOSA
GÁSTRICA DE RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

HELOISA GHIZONI

**DISTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE NA MUCOSA
GÁSTRICA DE RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Gama

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ghizoni, Heloisa.

Distribuição do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce / Heloisa Ghizoni. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profª. Dra. Patrícia Gama.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia dos epitélios digestivos.

Versão do título para o inglês: Distribution of glucocorticoid receptor in the gastric mucosa of rats submitted to early weaning.

1. Mucosa gástrica 2. Receptor de glicocorticóides 3. Desmame
4. Amamentação 5. Desenvolvimento pós-natal 6. Ratos I. Gama, Profª. Dra. Patrícia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Biologia celular e tecidual III. Título.

ICB/SBIB098/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):   Heloisa Ghizoni.

Título da Dissertação: Distribuição do receptor de glicocorticoide na mucosa
gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce .

Orientador(a):   Profª Dra. Patrícia Gama.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEEA.011/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 086/08/CEEA, datado de 18.09.08 e por solicitação da Profa. Dra. Patrícia Gama, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão das alunas **Heloísa Ghiizoni**, **Juliana Zulian** ao Projeto de Pesquisa "*Mecanismo de regulação do crescimento gástrico: interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 15 de março de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ângela e Marcelo,
que nunca mediram esforços para permitir que eu lutasse pelos
meus objetivos, e com muito carinho e compreensão me mostraram
o valor das conquistas ao longo desta desafiante jornada.
Aos meus queridos irmãos, Henrique e Carolina, que mesmo de longe,
me encorajaram e incentivaram a seguir em frente. Ao me amado
Fábio, muito mais que um companheiro, meu incentivador
e torcedor, que suportou pacientemente a minha ausência. Palavras
jamais serão suficientes para expressar minha gratidão!
Amo vocês incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia Gama, que me recebeu em seu laboratório e me confiou a realização deste trabalho. Sua dedicação, competência e profissionalismo incansáveis são exemplos para todos. Ao longo deste tempo, você me ensinou muito sobre ter paixão pelo nosso trabalho. Você terá sempre minha gratidão pelo meu crescimento em muitos aspectos.

Aos meus queridos avôs Luci, Nereu, Solange e Hilton e aos meus padrinhos, Helenice e Vanderlei, que sempre torceram e acompanharam com muito orgulho todas as conquistas e os momentos difíceis. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre tão generoso, me permitiu essa importante conquista, que representou muito mais que um amadurecimento profissional, um crescimento pessoal inigualável.

Aos meus queridos familiares, que mesmo à distância, sempre demonstraram apoio e incentivo ao longo desta jornada.

À minha querida amiga prof^a Eliane Goldfeder (equipe), que desde a iniciação científica me incentivou e acreditou na minha capacidade de chegar até aqui e ao Paulo; vocês sempre me trataram como carinho e torceram muito por mim, em momentos de risadas e lágrimas. Vocês são muito mais do que amigos, já são parte da família. Minha gratidão por absolutamente tudo que vocês fizeram por mim é eterna.

À minha querida amiga Waleska, que mesmo de longe, acompanhou cada passo desta caminhada com muito carinho e torcida. Sua amizade e as longas conversas foram fundamentais durante todo esse tempo para amenizar a enorme saudade da nossa convivência!

À Prof^a. Dr^a. Eliana Parisi Alvares, que apesar dos poucos momentos de convivência, sempre me tratou com gentileza e proporcionou prazerosas conversas no laboratório.

Às Prof^{as}. Dr^a. Alison Colquhoun, Dr^a. Vanessa Moraes Freitas e à Dr^a. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi pelas valiosas contribuições feitas durante meu exame de qualificação.

Às Prof^{as}. Dr^a. Estela M. A. F. Bevilacqua e Dr^a. Gláucia Maria Machado-Santelli por gentilmente permitirem o livre acesso às dependências de seus laboratórios.

À Ana Paula, pela valiosa ajuda nos ensinamentos técnicos, pela amizade e boas risadas, apesar do pouco tempo de convivência.

À Camila, pelo carinho, amizade, companheirismo e alegria constantes.

À Daniela, pelos ótimos momentos, amizade, carinho, companheirismo. Muito obrigada pelos inúmeros conselhos e ajuda durante este período tão importante!

À Juliana, pelo companheirismo, amizade e apoio constantes durante toda esta jornada. Muito obrigada pela ajuda sempre!

À Luciana, pelo carinho, amizade, apoio e bondade. Muito obrigada pela paciência durante este período de aprendizado, pelos valiosos ensinamentos que levarei para sempre comigo, além das nossas boas conversas.

À Natália, pelo amparo e amizade irrestritos. Seu apoio e companheirismo durante os momentos difíceis foram fundamentais para eu seguir em frente. Sem falar nos inúmeros momentos divertidos que compartilhamos. Sentirei muita falta desta valiosa companhia! Obrigada sempre!

À Priscila, pelo amparo, amizade e excelente companhia em todos os momentos. Sua ausência ainda é muito sentida por aqui. Saudades demais!

Ao Cruz Alberto Mendoza Rigonati (Junior), pelo suporte técnico, fundamental para o andamento e concretização deste trabalho.

À Paula Rezende-Teixeira pela valiosa ajuda nos ensaios de qPCR e pelo grande aprendizado durante a análise dos resultados obtidos.

Aos meus “vizinhos” de laboratório, Camila, Vivian, Luana, Evandro, Natália, Karolline, Sara e Rodrigo, com quem compartilhei conquistas, além das ótimas conversas de corredor.

Às companheiras de apartamento, Mariane e Jessica, por tornarem a saudade de casa menos dolorosa.

Aos amigos Adam e Chayrra, pela amizade, sempre ótima companhia, além das deliciosas conversas e risadas!

Às secretárias do departamento, Ana Lúcia, Celiana, Eloise e Regina, que sempre me atenderam nos momentos necessários.

Aos funcionários do biotério, José Braz, Cláudio Cabado e Fernando G Araujo, que tratam dos nossos animais com cuidado e dedicação. Obrigada pela valiosa ajuda!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro essencial durante toda a realização deste trabalho.

*“Se eu vi mais longe,
foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

RESUMO

Ghizoni H. Distribuição do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Durante o desenvolvimento pós-natal, o leite materno representa uma fonte de nutrientes, peptídeos biologicamente ativos e hormônios que podem atuar na maturação e no crescimento da mucosa gástrica. O desmame precoce é caracterizado pela abrupta substituição do leite por dieta sólida e pela separação materna, que em conjunto constituem uma situação de estresse para os animais, e podem ter impacto sobre o desenvolvimento do estômago. A mudança de dieta leva ao aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, hormônio que age por meio da ligação com o receptor de glicocorticoide (GR), que por sua vez está presente no citoplasma das células, e após a ativação, migra para o núcleo onde atua como fator de transcrição. No presente estudo, investigamos a expressão, a distribuição tecidual e subcelular do GR na mucosa gástrica de animais amamentados e submetidos ao desmame precoce. Filhotes de ratos da linhagem Wistar foram separados em dois grupos experimentais aos 15 dias de vida pós-natal: amamentados (C) e desmame precoce (DP). Os animais do grupo C permaneceram com as mães, ao passo que os animais em DP receberam dieta pastosa *ad libitum* até a eutanásia, nos dias 15, 16, 17 e 18 de vida pós-natal. Primeiramente, investigamos o perfil de expressão gênica de GR na mucosa gástrica de filhotes de ambos os grupos, e as análises de RT-PCR e qPCR mostraram a presença de RNAm para o receptor em todos os dias estudados. Nos animais C, a expressão aumentou aos 17 dias ($p < 0,05$), enquanto que nos filhotes em DP níveis mais altos foram detectados do 17º para o 18º dia. Em seguida, avaliamos o nível proteico de GR na mucosa gástrica. No DP, constatamos uma diminuição de GR, sendo que aos 18 dias, encontramos uma redução significativa de sua concentração, identificada por meio de *immunoblot* e imuno-histoquímica ($p < 0,05$). No entanto, o DP não alterou a distribuição tecidual de GR, de forma que o receptor foi identificado nas diferentes linhagens celulares do epitélio gástrico, assim como nos grupos controle. O passo seguinte foi avaliar a distribuição de GR nas frações citoplasmática e nuclear por *immunoblot*. Os animais C apresentaram GR mais concentrado no citoplasma ($p < 0,05$), principalmente no 16º e 18º dia. Já nos filhotes em DP, este perfil só foi encontrado no 16º dia; aos 17 e 18 dias, a concentração de GR foi similar entre os compartimentos, com uma diminuição expressiva no citoplasma ($p < 0,05$), acompanhada de um sutil aumento no núcleo. Dessa forma, nós identificamos o GR na mucosa gástrica durante a terceira semana de vida pós-natal e

demonstramos que apesar da diminuição de sua concentração durante o DP, a atividade do GR pode estar mantida, devido ao equilíbrio entre os compartimentos celulares, observado ao final do tratamento. Nós sugerimos que a mudança do padrão alimentar alterou um elemento essencial na cascata de resposta à corticosterona, e essa modificação pode ser importante na coordenação do crescimento da mucosa gástrica durante o desmame precoce.

Palavras-chave: Mucosa gástrica. Amamentação. Desmame precoce. Receptor de Glicocorticoide. Desenvolvimento pós-natal

ABSTRACT

Ghizoni H. Distribution of glucocorticoid receptor in the gastric mucosa of rats submitted to early weaning. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

During postnatal development, milk represents an important source of nutrients, biologically active peptides and hormones that can control gastric mucosa growth and maturation. Early weaning characterizes the abrupt change from milk to solid food and the maternal separation, which together are stressful for pups and can induce alterations in gastric mucosa development. Such dietary change increases corticosterone levels, which act through glucocorticoid receptor (GR) binding. This molecule resides in the cytoplasm and when bound to hormone, it translocates to the nucleus, where it acts as transcriptional factor. In the current study, we aimed to investigate GR expression, tissue and subcellular distribution in the gastric mucosa of suckling and early-weaned pups. Wistar rats were separated into two experimental groups on 15th postnatal day: suckling (S) and early-weaned (EW). Pups from S group were kept with the dam, while the EW were separated to receive hydrated powdered chow ad libitum until euthanasia on the 15th, 16th, 17th and 18th postnatal days. We first investigated GR expression in gastric mucosa, and through RT-PCR and qPCR we detected the mRNA in S and EW groups. For S rats, higher levels were found at d 17 ($p<0.05$), whereas in the EW group, GR increased from the 17th to 18th d ($p<0.05$). Next we investigated GR protein concentration, and we found that levels decreased throughout EW (mainly at 18 d) ($p<0.05$), either when detected by immunoblot or immunohistochemistry. However, EW did not alter the tissue distribution of GR, as immunostained cells were observed along the gastric gland, as described for S group. At last, we studied GR distribution on subcellular compartments by using immunoblot. In S rats, GR was more concentrated in the cytoplasm, mainly at 16 and 18 d ($p<0.05$). In EW pups, this pattern was found only at 16 d, and interestingly, at 17 and 18 d, GR concentration was similarly distributed between the compartments, indicating a reduction in the cytoplasm ($p<0.05$) in parallel with a slight increment in the nucleus. Therefore, we identified GR in the gastric mucosa during the 3rd postnatal week and demonstrated that although its concentration decreased during early weaning, activity might be maintained due to the equilibrium between the cellular compartments, as noted at the end of treatment. We suggest that modifications of feeding program during early weaning changed an essential element of corticosterone cascade, and such alteration might be important in the coordination of gastric mucosa growth.

Keywords: Gastric mucosa. Suckling. Early weaning. Glucocorticoid receptor. Postnatal development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da ação do GR nos compartimentos intracelulares	31
Figura 2 – Curva de <i>melting</i> dos iniciadores para os genes de GR e β -actina	39
Figura 3 – Esquema dos pontos de coleta das amostras	43
Figura 4 – Massa corporal dos grupos experimentais	44
Figura 5 – Perfil de expressão de RNAm para GR dos grupos experimentais.....	46
Figura 6 – Efeito do desmame precoce sobre o nível protéico total e subcelular de GR dos grupos experimentais	49
Figura 7 – Efeito do desmame precoce sobre a imuno-marcação para GR dos grupos experimentais.....	51
Figura 8 – Esquema dos principais resultados obtidos no estudo	60
Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nos RT-PCR e qPCR	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	“Adrenocorticotropic hormone”
AF-1	“Activation function-1”
AMP-18	“Antrum mucosal protein – 18”
AP-1	“Activator protein-1”
CBG	“Corticosterone binding globulin”
cDNA	“Complementary deoxyribonucleic acid”
CRH	“Corticotropin-releasing hormone”
DAB	“3,3' diaminobenzidine “
DBD	“DNA-binding domain”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
DEPC	“Diethylpyrocarbonate”
dNTP	“Deoxynucleotide triphosphate”
DTT	“Dithiothreitol”
ECL	“Enterochromaffin-like cells”
EDTA	“Ethylene Diamine Tetraacetic Acid”
EGF	“Epidermal growth factor”
EGFR	“Epidermal growth factor receptor”
ERK	“Extracellular Signal-Regulated Kinase”
GCs	Glicocorticoides
GH-RF	“Growth-hormone-releasing factor”
GR	“Glucocorticoid receptor”
GRE	“Glucocorticoid responsive element”
HB-EGF	“Heparin binding- Epidermal growth factor”
HPA	“Hypothalamic-pituitary-adrenal”
HSP	“Heat shock protein”
IBD	“Inflammatory Bowel Disease”
IL-6	“Interleukin-6”
IM	Índice de marcação
IOD	“Integrated optical densitometry”
i.p.	Intraperitoneal
LBD	“Ligand binding domain”
LDL	“Low Density Lipoproteins”

LHRH	“Luteinizing Hormone-Releasing Hormone”
MMP13	“Matrix Metalloproteinase 13”
MR	“Mineralocorticoid receptor”
NGF	“Nerve growth factor”
nGRE	“Negative Glucocorticoid Response Element”
NFκB	“Nuclear factor-KappaB”
ODC	“Ornithine decarboxylase”
PEPCK	“Phosphoenolpyruvate carboxykinase”
pGRE	“Positive Glucocorticoid Response Element”
PMSF	“Phenylmethylsulfonyl fluoride”
qPCR	“Real-time polymerase chain reaction”
RNA	“Ribonucleic acid”
RNA _m	“Messenger Ribonucleic acid”
RT-PCR	“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”
SDS	“Sodium dodecyl sulfate”
SHRP	“Stress-hyporesponsive period”
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
Src	“Steroid receptor coactivator”
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato 40 mM - EDTA 1 mM
TAT	“Tyrosine aminotransferase”
TBS	“Tris-buffered saline”
TGF	“Transforming growth factor”
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	“Tumor necrosis factor-alpha”
TPR	“Tetratricopeptide repeat”
TRH	“Thyrotropin-releasing hormone”
TSH	“Thyroid-stimulating hormone”
TTBS	Tween 20 0,1% em TBS 0,02 M
UNICEF	“United Nations Children's Fund”
UV	“Ultraviolet”
WHO	“World Health Organization”
11β-HSD	“11β-Hydroxysteroid dehydrogenase”

LISTA DE SÍMBOLOS

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Leite, amamentação e desmame precoce	23
1.2 Estômago	26
1.3 Glicocorticoides e receptores	27
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais e desmame precoce	35
4.2 Coleta de amostras	35
4.2.1 Coleta do estômago para análises moleculares	35
4.2.2 Coleta do estômago para análise histológica	36
4.3 RT-PCR e PCR em tempo real para GR	36
4.3.1 Extração de RNA	36
4.3.2 Síntese de cDNA	37
4.3.3 Amplificação do DNA – Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)	37
4.3.4 Amplificação do DNA – PCR em tempo real	38
4.4 Avaliação dos níveis proteicos de GR	39
4.4.1 Extração protéica	39
4.4.1.1 Extração de proteína total	39
4.4.1.2 Extração de proteínas para fracionamento citoplasmático e nuclear	40
4.4.2 Western blot e Immunoblot para GR	40
4.5 Imuno-histoquímica para GR	41
4.5.1 Quantificação das células imuno-marcadas para GR	42
4.6 Resumo dos procedimentos realizados	42
4.7 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Massa corpórea dos animais	44
5.2 Perfil de expressão gênica do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica de animais em amamentação e em desmame precoce	45
5.3 Efeito do desmame precoce sobre o nível proteico do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica	46

5.4 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição do receptor de glicocorticoide nas frações celulares na mucosa gástrica	47
5.4 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição tecidual do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica.....	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leite, amamentação e desmame precoce

O leite materno representa para os filhotes uma fonte de nutrientes ideal para a fase inicial de crescimento, e também fornece hormônios e peptídeos biologicamente ativos, como fatores de crescimento capazes de proteger e estimular a ontogênese de diferentes sistemas, dentre eles, o trato gastrointestinal (TGI) (Donovan, Odle, 1994; Koldovský, 1989; Koldovský et al., 1995; Xu, 1996, Walker, 2010). Dentre as moléculas presentes no leite, destacam-se alguns hormônios como glicocorticoides, prolactina, insulina, somatostatina, hormônio estimulador e liberador do hormônio tireoideano (TSH e TRH), fator liberador do hormônio de crescimento (GH-RF), hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), além do fator de crescimento transformante β (TGF β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento neural (NGF), entre outros, os quais são determinantes para o crescimento e maturação do estômago (De Andrade Sá et al., 2008; Donovan, Odle, 1994; Gama, Alvares, 1996; Koldovský, 1989; Koldovský et al., 1995; Penttilä et al., 1998; Smith, Ojeda, 1984; Tucker, Schwalm, 1977; Xu, 1996; Yeh, 1984). Logo, a interação materno-infantil (caracterizada pelo aleitamento) é extremamente importante até que o filhote seja capaz de sintetizar seus próprios hormônios e fatores de crescimento em concentrações adequadas para sustentação de seu metabolismo (De Andrade Sá et al., 2008; Gama, Alvares, 1996; Penttilä et al., 1998; Smith, Ojeda, 1984).

É indiscutível a importância do leite materno para a saúde da criança nos primeiros meses de vida, uma vez que é considerado um alimento completo, pois possui uma composição de proteínas, carboidratos e lípidos que acompanha as necessidades infantis durante o desenvolvimento. O leite também é uma fonte de água e fatores de proteção contra infecções, sendo isento de contaminação e perfeitamente adaptado ao metabolismo da criança (Ctenas, Vitolo, 2002; Ministério da Saúde, 2002, World Health Organization, 2002a).

Evidências crescentes sugerem que os benefícios providos pelo leite materno podem perdurar até a vida adulta. Crianças em amamentação exclusiva nos primeiros meses de vida apresentam menor predisposição à obesidade, aos altos níveis de LDL, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, dentre outras doenças e co-morbidades (WHO, 2007). Do mesmo modo, crianças alimentadas com leite materno têm melhor desenvolvimento e maturação do sistema nervoso em relação às que receberam fórmulas no primeiro ano de vida (Khedr et al., 2004). O que pode ser relevante para esta questão é que o leite materno contém os ácidos graxos

poliinsaturados docosaheptaenóico e aracdônico, fundamentais para este sistema, enquanto as fórmulas possuem apenas este último (Heird, Lapillonne, 2005). Além disto, sabe-se que a alimentação com fórmulas infantis nos primeiros meses de vida pode aumentar a vulnerabilidade ao surgimento de infecções, principalmente as que acometem o trato digestório, como as diarreias infecciosas (Walker, 2010). A amamentação provê ainda benefícios para a saúde materna; esta prática está associada à menor prevalência de hipertensão arterial, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares em mulheres lactantes no primeiro ano de vida da criança (Schwarz et al., 2009).

Apesar dos inúmeros benefícios mencionados acima, o Brasil apresenta dados preocupantes, como a duração média do aleitamento materno exclusivo que em menores de 6 meses é de apenas 54,1 dias (1,8 meses). Portanto, a questão do desmame representa um tema bastante atual e tem destaque nas políticas de desenvolvimento nacional (Ministério da Saúde, 2009).

O período de desmame representa uma fase de alimentação mista, na qual ocorre a substituição gradativa do leite pela ingestão de alimento sólido. A Organização Mundial de Saúde (WHO) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) preconizam o aleitamento materno exclusivo durante os primeiros seis meses de vida; após este período, é indicada a introdução de alimentos complementares. Esta fase pode se estender até os 2 anos, idade na qual o desmame completo é realizado (Ministério da Saúde, 2002; WHO, 2002b). Já em roedores, o desmame natural ocorre entre a terceira e quarta semana de vida pós-natal e é concomitante aos outros processos fisiológicos relacionados à alteração do padrão de dieta. Para fins experimentais, o desmame de ratos em biotério é realizado aos 21 dias. Assim, no período de transição ocorre uma mudança na proporção de macronutrientes ingeridos, com aumento no consumo de carboidratos e decréscimo da quantidade de lípidos, em paralelo a alterações no padrão enzimático do TGI (Henning, Sims, 1979).

Dentre as mudanças que caracterizam a fase de desmame em roedores, destacam-se o desenvolvimento do paladar, a maturação morfológica da língua, a abertura dos olhos, das orelhas, a regulação termogênica e a capacidade de urinar e defecar sem o auxílio materno (Henning, 1981; Koldovský, 1985). Em contrapartida, o desmame precoce é distinguido pela substituição abrupta do aleitamento materno pelo alimento sólido, aliada à separação materna, que em conjunto causam uma forte perturbação para os filhotes e têm efeitos sobre diferentes sistemas.

Alguns estudos mostram que o desmame precoce tem impacto sobre o crescimento e maturação do TGI. No estômago, a mudança antecipada da dieta aos 15 dias de vida leva à

diferenciação precoce das células mucosas do colo, consideradas marcadoras da maturação do epitélio gástrico, bem como a ativação das vias de sinalização de TGF α /EGFR, ERK 1/2 e Src, envolvidas em proliferação e diferenciação celular (Osaki et al., 2010, 2011); há elevação da atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC), fundamental para a proliferação celular do tecido, e ocorre aumento da atividade do pepsinogênio, secretado pelas células zimogênicas, localizadas na base da glândula gástrica (Lin et al., 2001). O desmame precoce também modifica a resposta proliferativa do epitélio gástrico a estímulos como o jejum alimentar, de forma que em filhotes desmamados precocemente, o jejum causa inibição mitótica, resposta encontrada em adultos (Gama, Alvares, 2000). Assim, sob o ponto de vista de crescimento e maturação fisiológica, o desmame precoce induz o aparecimento prematuro de características presentes em ratos adultos.

A mudança drástica de padrão alimentar causa também outras perturbações nos animais, como a maior incidência de erosões gástricas (Ackerman et al., 1978), e de susceptibilidade à ocorrência de lesões ulcerativas profundas (Glavin, Pare, 1985). No intestino delgado, o desmame precoce induz o aumento prematuro da atividade da enzima sacarase-isomaltase (Boyle, Koldovský, 1980), causa a disfunção e malformação da barreira intestinal (Smith et al., 2010), e leva à redução da expressão de fosfatase alcalina (Lackeyram et al., 2010).

Além do sistema digestório, o desmame precoce também tem impacto sobre outros tecidos e sistemas, e as consequências podem ser observadas na vida adulta. Quando animais são desmamados precocemente aos 18 dias, porém sem que haja separação materna, há aumento nas taxas de triglicerídeos, LDL-colesterol, obesidade, resistência a leptina e hiperleptinemia (Lima et al., 2011), além de hiperfagia (Oliveira et al., 2011), sugerindo uma reprogramação metabólica na vida adulta. A falta dos cuidados maternos tem seus efeitos bem descritos também no sistema nervoso central (SNC). Sabe-se que a falta desses cuidados nas primeiras semanas de vida pode modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o principal sistema de resposta ao estresse (Daniels et al., 2009; Faturi et al., 2010; Guijarro et al., 2007; Schmidt et al., 2002a).

Assim, observando-se os efeitos desencadeados pelo desmame precoce, é notório que o leite materno tem um papel preponderante para o desenvolvimento pós-natal dos diferentes órgãos. Portanto parece haver uma forte ligação entre o tipo de alimento consumido (leite ou ração), hormônios circulantes e os níveis teciduais de fatores de crescimento que regulam respostas celulares, inclusive aquelas que ocorrem no trato gastrointestinal.

1.2 Estômago

O estômago corresponde a uma dilatação em forma de saco do tubo digestório, e está localizado entre o esôfago e o intestino delgado. Nos ratos, o estômago está estruturado em três regiões com características histológicas distintas: córnea, corpo e antro. A porção córnea, contínua ao esôfago, tem epitélio estratificado e queratinizado, ao passo que corpo e o antro são regiões em que o epitélio está organizado em glândulas tubulares na mucosa gástrica (Lee et al., 1982).

O corpo gástrico é a região maior e mediana, e apresenta mucosa espessa formada por longas glândulas tubulares que se abrem em pequenas fossetas, através das quais os produtos secretados chegam ao lúmen. Cada unidade glandular pode ser dividida em três segmentos, denominados istmo, colo e base, por onde estão distribuídas as diferentes linhagens celulares. O istmo é composto principalmente por células parietais que determinam o limite entre a região glandular e a fosseta gástrica. As células parietais são responsáveis pelo bombeamento de íons, que no lúmen formam o HCl. A atividade dessas células facilita a digestão de proteínas, a absorção de minerais e vitaminas, bem como previne o crescimento bacteriano e o surgimento de infecções. Além disto, as células parietais secretam fatores de crescimento, como o TGF α , amphiregulina, HB-EGF, entre outros (Schubert, 2009). A região do colo apresenta células parietais e mucosas do colo, enquanto na base predominam as células zimogênicas, secretoras de pepsinogênio (Helander, 1981; Johnson, 1985). Na base também estão presentes as células enteroendócrinas que sintetizam hormônios (Ekelund et al., 1985), como a ghrelina (células “X/A-like”) (Kojima et al., 1999), e as células *enterochromaffin-like* (ECL) que produzem histamina, essencial no controle da secreção ácida das células parietais (Chen et al., 2006).

A região do antro gástrico também possui glândulas, porém mais curtas e enoveladas que se abrem em fossetas muito profundas. As unidades glandulares são compostas predominantemente por células mucosas e enteroendócrinas, como as produtoras de gastrina (células G), hormônio que também participa do controle do crescimento e da função das células epiteliais gástricas (Jain, Samuelson, 2006), e somatostatina (células D) (Helander, 1981).

O processo de desenvolvimento e diferenciação da mucosa gástrica é complexo, e isso se deve ao fato de que o estômago é derivado de dois folhetos embrionários, o endoderma e o mesoderma. O folheto endodérmico é responsável por formar o epitélio gástrico em si, ao passo que o mesodérmico forma o músculo liso, miofibroblastos, células do sistema

imunológico, bem como células endoteliais e algumas moléculas presentes na matriz extracelular; estruturas que em conjunto contribuem ativamente para a formação do órgão durante o período fetal (Khurana, Mills, 2010; McLin et al., 2009). Entre os dias 17 e 19 de vida intra-uterina, o epitélio pseudo-estratificado presente no estômago adquire as características de um epitélio colunar simples. A partir daí, ocorre uma intensa reorganização, com a presença de invaginações, que acabam por formar fossetas e glândulas gástricas rudimentares (Alvares, 1994). Durante o desenvolvimento pós-natal (três primeiras semanas de vida) as glândulas crescem e passam por um período de diferenciação (Keeley, Samuelson, 2010), de forma que ao final do primeiro mês a mucosa está funcionalmente amadurecida.

Ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal do estômago, diversos fatores interagem e favorecem o crescimento do epitélio, controlando proliferação, migração, diferenciação e morte celular. Dentre esses fatores têm destaque o programa genético, o estado nutricional, tipo de alimento consumido, microbiota luminal, além de hormônios e fatores de crescimento, que também são fornecidos pelo leite materno. Logo, modificações no padrão alimentar podem causar prejuízos para o desenvolvimento deste sistema (De Andrade Sá et al., 2008; Lee, Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al., 2005; Ogias et al., 2010a).

1.3 Glicocorticoides e receptores

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroides produzidos e secretados pelas células do córtex da glândula adrenal, sendo que o principal GC em roedores é a corticosterona, e em primatas, o cortisol. Estas moléculas medeiam processos, como metabolismo, inflamação, regulação cardiovascular, desenvolvimento e reprodução (Heitzer et al., 2007; Sheppard, Auteliano, 2002; Silva et al., 2010).

O aumento dos níveis plasmáticos dos GCs se dá com a ativação do eixo HPA, o principal sistema endócrino responsivo ao estresse. Quando há uma situação de perturbação da homeostase no organismo, o sistema nervoso simpático (SNS) é ativado, e incita a liberação das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina. Estes hormônios ativam o eixo HPA, promovendo a secreção hipotalâmica do hormônio liberador de corticotropina (CRH) na microcirculação da hipófise. O CRH, por sua vez, dispara a secreção hipofisária de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula as células do córtex da glândula adrenal a secretarem os hormônios glicocorticoides (Axelrod, Reisine, 1984, Sorrells et al., 2009; Ulrich-Lai, Herman, 2009).

Em ratos, a secreção de corticosterona passa por acentuadas mudanças durante o desenvolvimento pós-natal, as quais são concomitantes ao amadurecimento de órgãos e sistemas, como o TGI. A partir no 14º dia de vida pós-natal, é evidenciado um aumento significativo na secreção de corticosterona (Henning, 1978). Pode-se dizer que esta idade representa um marco na maturação do animal, uma vez que, neste período ocorre a abertura dos olhos, maturação da língua e do paladar, funções que permitem ao animal explorar o ambiente e procurar alimento (Henning, 1978, 1981; Koldovský, 1985). No 24º dia de vida, ocorre o segundo pico de secreção hormonal, período próximo ao desmame natural (28 dias), porém em biotério, como acima citado, o desmame é realizado aos 21 dias (Henning 1978, 1981).

Assim, sabe-se que durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, o nível de corticosterona circulante é baixo, sendo esta fase conhecida como “período hipo-responsivo ao estresse” (SHRP). Durante esta etapa é constatada uma relativa inatividade do eixo HPA frente a estímulos estressantes, o que pode indicar uma função adaptativa e protetora para garantir o crescimento adequado (Sapolsky, Meaney, 1986). No entanto, após este período, os animais tornam-se susceptíveis ao estresse. Mostrou-se que quando filhotes em fase de desmame são submetidos a choque nas patas há aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona (Takahashi, Kalin, 1991). A separação materna durante este período também ocasiona a ativação do eixo HPA, e consequentemente há elevação de corticosterona no plasma (Levine et al., 1991; Schmidt et al., 2002b; Suchecki et al., 1993). Além disso, sabe-se que os efeitos desse estresse persistem e afetam o comportamento na vida adulta (Guijarro et al., 2007; Makena et al., 2012; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2012), evidenciando a importância da interação entre mães e filhotes durante o desenvolvimento.

Modificações no padrão alimentar também representam uma perturbação para os animais. Filhotes submetidos ao desmame precoce apresentam uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos animais em amamentação, e essa resposta perdura por até 48 horas após a mudança da dieta (Figueiredo, 2010; Lin et al., 1998; Kikusui et al., 2009).

Os níveis circulantes dos GCs são regulados por diversos fatores, tais como as moléculas mediadoras da função do eixo HPA, as enzimas 11- β -hidroxiesteroide desidrogenases (11 β -HSD1 e 2), a globulina ligante de corticosterona (CBG) e seus receptores (MR e GR).

As enzimas 11 β -HSD1 e 2 são moléculas intracelulares chave no metabolismo dos GCs. A 11 β -HSD2, por exemplo, transforma o cortisol e a corticosterona nas formas inertes

de cortisona e 11-dehidrocorticosterona, respectivamente, limitando o acesso do hormônio aos seus receptores. As 11 β -HSD estão presentes em vários tecidos e o papel protetor que estas moléculas proporcionam é fundamental durante o desenvolvimento fetal, uma vez que também são expressas na placenta e protegem o feto nos momentos em que há um aumento de GCs no organismo materno (Jamieson et al., 1999; Seckl, 2004; Seckl et al. 2000; Speirs et al., 2004)

A CBG é uma glicoproteína produzida pelo fígado, a qual se liga com alta afinidade aos hormônios GCs no plasma, tornando-os indisponíveis aos tecidos. Desta forma, a CBG proporciona um mecanismo de proteção em situações onde há altas concentrações hormonais, além de servir como um reservatório quando ocorre uma baixa síntese hormonal (Breuner, Orchinik, 2002; Hammond, 1990; Henning, 1978).

Os glicocorticoides podem se ligar a dois tipos de receptores presentes no citoplasma das células, o receptor mineralocorticoide (MR) e o receptor de glicocorticoide (GR). Estas proteínas são membros de uma superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligante. A expressão de MR é bem descrita em diferentes órgãos, dentre os quais se destacam os rins, duodeno, íleo e cólon, glândulas salivares e sudoríparas, nos quais o epitélio é responsável pelo transporte de íons Na⁺ e de água (Hirasawa et al., 1999; Sheppard et al., 1999; Petrelli et al., 1997; Zennaro et al., 1997). No estômago, a aldosterona regula o transporte de eletrólitos associado à secreção ácida, logo, a expressão de MR na mucosa gástrica humana está restrita às células parietais (Kato et al., 1999).

O receptor de glicocorticoide (GR) é uma proteína intracitoplasmática que teve sua estrutura elucidada em 1968 pelos estudos de Munck e Brinck-Johnsen em linfócitos no timo, tem 777 aminoácidos e seu peso molecular é de aproximadamente 94 KDa. Em ratos, o receptor teve sua estrutura clonada por Hollenberg et al. (1985).

Por ser um receptor de esteroide, o GR está localizado preferencialmente no citoplasma como parte de um complexo multiproteico que contém HSP90 e HSP70 (*heat shock proteins*), uma molécula de p23 e TPR (*tetratricopeptide repeat*). Esta associação é fundamental para a manutenção da conformação do receptor, para impedir sua degradação pela via ubiquitina/proteassoma ou ainda que migre para o núcleo na ausência de ligante (DeFranco, 2000; Heitzer et al., 2007; Wallace, Cidlowski, 2001).

Em roedores, estudos recentes têm evidenciado a existência das isoformas α e β para o GR. Hinds et al. (2010) mostraram a presença da isoforma β em tecidos de camundongos, a partir do *splicing* alternativo do *intron* 8 localizado no cromossomo 18. Este estudo

demonstrou ainda que, assim como ocorre para o receptor humano, a isoforma β não tem a capacidade de se ligar diretamente ao hormônio, e atua como um inibidor de GR α , produzindo um estado de resistência a glicocorticoides (Revollo, Cidlowski, 2009; Schaaf, Cidlowski). Em ratos, esta descrição foi feita por Ju et al. (2009) que observaram a presença de GR α e GR β em diversos tecidos.

O GR está constituído por três regiões que contêm os domínios funcionais da molécula: a porção C-terminal, chamada de domínio ligação ao hormônio (LBD), essencial para a ligação aos GCs, e também para a dimerização do receptor; a porção central representa o domínio de ligação com o DNA (DBD) com estruturas chamadas de dedos de zinco, que garantem a alta afinidade da ligação do receptor às regiões específicas do DNA. Por fim, a porção N-terminal é chamada de domínio de ativação de função (AF-1), e contém a maior parte dos resíduos de serina/treonina onde ocorre a fosforilação, mecanismo que modula a atividade do receptor, bem como suas propriedades de estabilidade e meia-vida (Gallagher-Beckley, Cidlowski, 2009; Webster et al., 1997; Yudt, Cidlowski, 2002)

Por apresentarem características lipofílicas, os GCs se difundem facilmente pela membrana plasmática e chegam ao citoplasma onde o receptor está localizado. Conforme ilustrado na Figura 1, no citoplasma ocorre a ligação do hormônio ao domínio LBD do receptor; este se desliga do complexo multiproteico e se dimeriza, de forma que em seguida todo este complexo é levado rapidamente para o núcleo ($t_{1/2}$ = 5-10 min) (Qi et al., 1989) por meio de uma rede de microtúbulos (Galigian et al., 1998). Uma vez no núcleo, o domínio DBD do GR se liga aos sítios de genes-alvo, onde atua como fator de transcrição em regiões do DNA conhecidas como elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs) (Lu, Cidlowski, 2006; Yudt, Cidlowski, 2002) (Figura 1).

Os GREs podem ser positivos (pGRE) ou negativos (nGRE), e esta diferença de ação relaciona-se à ligação dos pGRE aos dímeros de GR. Esta é a via de ação clássica, e envolve a associação a cofatores, como as proteínas p160 (van der Laan, Meijer, 2008). Os principais genes ativados por GR/pGRE estão envolvidos na regulação metabólica, como as enzimas hepáticas tirosina aminotransferase (TAT) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), elementos-chave da gliconeogênese. Já a ligação aos nGRE ocorre por meio de monômeros de GR, os quais no núcleo interagem com outros fatores de transcrição e moléculas co-repressoras, como NF κ B e AP-1, de modo a reduzir ou impedir a transcrição de moléculas mediadoras de processos inflamatórios (IL-6, MMP13, TNF- α) e componentes da ativação do eixo HPA (CRH e ACTH) (Bamberger et al., 1997; Barnes, 2006; De Bosscher et al., 2003; Heitzer et al., 2007; Oakley, Cidlowski, 2011; Reichardt et al., 2012).

figura 1 - Esquema da ação do Gr nos compartimentos intracelulares

FONTE: Figueiredo (2010).

Dentre outros sistemas, o GR também está localizado no trato gastrintestinal e é, juntamente com os glicocorticoides, fundamental para o desenvolvimento no período pós-natal (Costa et al., 1996; Henning et al., 1994; Speirs et al., 2004; Tsukada et al., 1998). No estômago, a presença do receptor foi detectada primeiramente em células parietais (Kanemasa et al., 1999) e posteriormente nos diferentes tipos celulares do epitélio gástrico (Ogias et al., 2010b). Neste órgão, a função de GR pode estar associada aos processos celulares de proliferação (Gama et al., 2000; Luo et al., 2007; Ogias et al., 2010b) e diferenciação (Wang et al., 1996), bem como à atividade de algumas moléculas (Petri, Lee, 2005; Tanaka et al., 2001). Já no intestino, a presença do receptor foi identificada desde o período pré-natal; porém durante esta fase, a presença do GR parece não ser fundamental para o desenvolvimento (Costa et al., 1996; Gartner et al., 2002). No intestino adulto, o GR está presente nas células epiteliais que recobrem a porção média e final das vilosidades (Miyata et al., 2008).

O estímulo estressor que é capaz de aumentar os níveis de corticosterona no plasma pode modificar a síntese, os níveis e a atividade do GR em diversos tipos celulares em roedores. Animais que passaram por situações de estresse por meio de imobilização, choque

térmico e perturbação social apresentam um aumento na expressão gênica e no nível proteico do receptor em diferentes tecidos (Al-Mohaisen et al., 2000; de Kloet et al., 2009; Soleimani et al., 2011; Spencer et al., 1996). No SNC de camundongos, o desmame precoce a partir do 14º dia eleva a expressão de GR no hipocampo (Kikusui et al., 2006).

Recentemente, um estudo de nosso laboratório mostrou que o jejum alimentar aumenta a expressão e os níveis de GR na mucosa gástrica de ratos lactentes e adultos, porém regula diferencialmente o trânsito intracelular do receptor nas diferentes idades (Ogias et al., 2010b). Outros autores também avaliaram a translocação de GR e mostraram um trânsito maior do citoplasma ao núcleo em animais que passaram por estresse e têm níveis altos de corticosterona circulante (Adzic et al., 2009; Noguchi et al., 2010). Uma vez que a corticosterona pode regular o GR e que o desmame precoce eleva o nível plasmático do hormônio, a mudança antecipada da dieta pode ter implicações sobre a distribuição do receptor na mucosa gástrica, podendo modular a ação hormonal durante o desenvolvimento pós-natal dos animais.

2 JUSTIFICATIVA

O crescimento e a maturação do epitélio gástrico ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal de ratos, e estes processos dependem da complexa interação entre elementos como o leite materno, o estado nutricional, fatores de crescimento e hormônios, como a corticosterona (De Andrade Sá et al., 2008; Donovan, Odle, 1994; Gama, Alvares, 1996; Koldovský et al., 1995; Xu, 1996). Logo, modificações no padrão alimentar durante este período podem acarretar diferentes consequências para a mucosa gástrica. O desmame precoce é caracterizado pela substituição abrupta do aleitamento pela ingestão de alimento sólido, e esta perturbação eleva os níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes (Figueiredo, 2010; Kikusui et al., 2009; Lin et al., 1998), que por sua vez pode ter sua atividade no epitélio gástrico regulada por meio de seu receptor (Ogias et al., 2010b).

Vale ressaltar que na 3ª semana de vida pós-natal, os processos responsáveis pela maturação gástrica se intensificam e estes podem ser afetados pela corticosterona. Dessa forma, este estudo tornou-se importante, pois é preciso conhecer a distribuição e concentração de GR no epitélio gástrico durante um período do desenvolvimento pós-natal para que se possa avaliar a função da corticosterona no crescimento do órgão. Esta investigação é fundamental tanto em animais em amamentação como em filhotes em desmame precoce. Assim a caracterização da expressão e o mapeamento de GR no epitélio gástrico são essenciais para se compreender como a corticosterona pode participar da regulação do crescimento e da maturação gástrica durante o desmame precoce.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão e a distribuição do receptor de glicocorticoide (GR) na mucosa gástrica de ratos em amamentação e submetidos ao desmame precoce. Assim sendo, nossos objetivos específicos foram:

- verificar o perfil de expressão gênica do GR na mucosa gástrica durante a 3ª semana de desenvolvimento de ratos em amamentação e submetidos ao desmame precoce;
- avaliar o nível proteico total e mapear a distribuição tecidual do GR na mucosa gástrica ao longo do desmame precoce;
- verificar como o desmame precoce afeta a distribuição do GR nas frações celulares (citoplasmática e nuclear) na mucosa gástrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e desmame precoce

Para os estudos realizados, foram utilizadas fêmeas de ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), as quais foram acasaladas e mantidas em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP). Os animais permaneceram sob condições ambientais normais do biotério, com acesso à ração e água *ad libitum*, sob um ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, com temperatura e exatidão controladas. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (CEUA antiga CEEA 86/08).

O dia do nascimento foi anotado como zero, e no 3º dia de vida pós-natal, as ninhadas foram reduzidas para 8-9 animais e permaneceram com suas mães até o 15º dia de vida pós-natal. Nesta idade, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: desmame precoce (DP) e controle (C). Os animais do grupo C permaneceram com as mães com acesso livre ao leite e aos cuidados maternos até o momento da eutanásia, ao passo que os animais do grupo DP foram separados de suas mães e mantidos em outra gaiola, na qual a dieta passou a ser uma pasta de ração *ad libitum* (Gama, Alvares, 2000). Além disto, duas vezes ao dia, os filhotes em DP também receberam alimento e água por meio de pipeta descartável e foram massageados na região abdominal, para facilitar a excreção de urina e fezes.

4.2 Coleta de amostras

4.2.1 Coleta do estômago para análises moleculares

A eutanásia dos animais ocorreu nos dias 15, 16, 17 e 18, sendo que cada grupo de estudo (C e DP) foi composto por 3-4 animais para cada idade. A massa corpórea dos filhotes foi anotada a cada coleta.

A retirada do estômago foi feita sob anestesia com injeção i.p. de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Vetbrands, São Paulo, Brasil) em dose excessiva (1:1, dose de 0,5 ml/100g de massa corpórea), sempre às 10h00. Para os ensaios de RT-PCR, qPCR e de *immunoblot* para as frações celulares, o estômago foi aberto pela menor curvatura e submetido à raspagem da mucosa gástrica sob microscópio estereoscópico (Nikon, Japão), e o

material obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C até o momento da extração. Já para as análises de *immunoblot* a partir da extração proteica total, o material obtido da raspagem gástrica foi conservado em PMSF 0,1 M diluído em TBS 0,02 M e armazenado em freezer -80 °C até o processamento.

4.2.2 Coleta do estômago para análise histológica

Assim como para as análises moleculares, o estômago dos animais de ambos os grupos foi coletado nos dias 15, 16, 17 e 18, sob anestesia acima descrita, aberto pela menor curvatura, esticado em cortiça e fixado em formaldeído 10% para avaliação por imunohistoquímica. Após 4 horas de fixação, o estômago foi retirado da cortiça, separado em 3 fragmentos, cada um contendo as regiões de córnea, corpo e antro e estes foram colocados em um cassete plástico entre duas esponjas para manter a orientação do órgão por mais 4 horas de fixação. Feito isto, os fragmentos foram transferidos para álcool 70° para inclusão em parafina e obtenção dos cortes histológicos.

4.3 RT-PCR e PCR quantitativa para GR

4.3.1 Extração de RNA

A extração de RNA total das amostras obtidas pela raspagem da mucosa gástrica foi realizada com TRIzol (Invitrogen, Carlsberg, CA, EUA). O tecido foi macerado em 1 mL de TRIzol com homogeneizador elétrico durante 5 minutos em gelo. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e após agitação em vórtex por 15 segundos, as amostras permaneceram por 3 minutos em gelo. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.

A partir da formação de três fases, a fase aquosa superior foi retirada, e 500 µL de isopropanol (Merck) foram adicionados, incubando-se em gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas 12.000 g (4 °C, 15 minutos), a fim de precipitar o RNA. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75 % (Merck) em água DEPC (Invitrogen); em seguida foi centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente desprezado, e foi conduzida então a secagem do precipitado à temperatura ambiente (TA) sob fluxo laminar, que posteriormente, foi ressuspendido em água DEPC 0,1%.

A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria com caminho óptico de 0,2 mm (NanoVue – GE Healthcare) (Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto – Prof^ª. Dr^ª. Estela M. A. F. Bevilacqua). A integridade do RNA foi testada em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo em tampão TAE (Tris acetato 40 mM - EDTA 1 mM) através da observação das bandas correspondentes as subunidades 30 S e 50 S do RNA ribossomal em trans-iluminação com luz UV (G-Box, Syngene, Frederick, MD, EUA).

4.3.2 Síntese de cDNA

A partir de amostras de RNA, foi realizada a síntese de cDNA pela reação da transcriptase reversa (RT). Para tal, foi utilizado 1 µg de RNA em 0,5 µL de Tampão DNase I 10X, 0,5 µL de DNase I e água DEPC em quantidade suficiente para 8,5 µL, sendo esta mistura incubada a TA por 15 minutos.

Em seguida, foi adicionado 0,5 µL de EDTA 25 mM (pH 8,0) e incubado em termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, 1 µL de Oligo (dT) Primer foi adicionado com 2 µL de água DEPC para incubação por 10 minutos a 70 °C. A cada um dos tubos foram adicionados 6 µL de mistura contendo 3 µL de Tampão *First-Strand* 5X (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de dNTP 10 mM e incubados por 5 minutos a 42 °C. Em seguida, 1 µL de enzima SuperScript II RT (200 U/µL - Invitrogen) foi adicionado e incubado a 42 °C por 50 minutos e posteriormente a 70 °C por 15 minutos. Por fim, foi adicionado 1 µL de RNase H (2 U/µL) com incubação a 37 °C por 20 minutos. As amostras foram mantidas em freezer -20°C.

A fim de confirmar a eficiência da síntese de cDNA, as alíquotas de 1µL foram diluídas em tampão de amostra *Blue Juice* 5X, as quais foram aquecidas a 70 °C por 10 minutos. O cDNA foi separado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (90V, 50 minutos) e verificado o arrasto, o qual indica que a síntese foi eficaz.

4.3.3 Amplificação do DNA – Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)

Para realização da RT-PCR, foram adicionadas alíquotas de 1 µL de cDNA de cada uma das amostras a uma mistura previamente preparada contendo 2,0 µL de Tampão PCR 10X (pH 8,4), 0,4 µL de dNTP 10 mM, 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de iniciador *sense*, 0,5 µL de iniciador *antisense* (Tabela 1) e 14,8 µL de água MilliQ autoclavada. Seguiu-se um aquecimento de 95 °C por 5 minutos. Os iniciadores para GR já haviam sido desenhados em

nosso laboratório, utilizando o programa de domínio público Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) e sintetizados pela empresa IDT (Iowa, EUA, Prodimol, Brasil). Já os iniciadores para β -actina foram sintetizados pela Invitrogen e utilizados como controle interno das reações de PCR. Em continuidade, foram adicionados 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L à mistura, que, por condições anteriormente estabelecidas (Ogias et al., 2010b), foi incubada a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e por fim, ocorreu a extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e qPCR

	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>
GR	5'-TTCCTGCAGCATTACACAG-3'	5'-AGCAGGGTCATTTGGTCATC-3'
β -actina	5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT-3'	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-3'

FONTE: Ghizoni (2012)

Após diluição em 5 μ L de Tampão de Corrida *Blue Juice* 5X (Invitrogen), 10 μ L de cada uma das amostras foram corridos em gel de agarose 1% em TAE. Os géis foram analisados por meio de trans-iluminação com luz UV (G-Box, Syngene, Frederick, MD, EUA) (Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto – Prof^a. Dr^a. Estela M. A. F. Bevilacqua) e as bandas correspondentes foram analisadas utilizando o programa de domínio público Image J (1.37v, National Institute of Health, EUA). Os resultados foram apresentados relacionando a IOD dos animais tratados em relação aos respectivos controles.

4.3.4 Amplificação do DNA – PCR quantitativa

Para a PCR quantitativa, as mesmas amostras de cDNA utilizadas na RT-PCR foram diluídas para uma concentração final de 200 ng em água MilliQ autoclavada. A partir das amostras diluídas, 1 μ L de cDNA foi adicionado a uma mistura de reagentes contendo 5 μ L de tampão (5X *colorless goTaq flexi buffer* – Promega, U.K.), 4 μ L de MgCl₂ (25mM), 1 μ L de dNTP a 10 mM, 1 μ L dos iniciadores *sense* e *anti-sense* de GR e β -actina acima descritos, 0,2 μ L de Taq DNA polymerase (5 U/ μ L, Promega), 1 μ L de SYBR green® (Promega) e água MilliQ. As reações foram conduzidas no termociclador Rotor Gene 6000 Cyclor (Corbett Life Science, Concord, Austrália) (Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Machado-Santelli) para um volume final de 25 μ L, em triplicatas. O cDNA foi

aqui amplificado sob as mesmas condições de tempo e temperatura acima descritas por 40 ciclos seguida pela curva de *melting* (Figura 2). A fluorescência emitida pelo anelamento das amostras aos iniciadores foi medida a um comprimento de onda de 470 nm, utilizando o método do $\Delta\Delta C_t$.

Figura 2 - Curva de *melting* representativa mostrando a eficiência dos iniciadores para os genes da β -actina

Curva de *melting* representativa mostrando a eficiência dos iniciadores para os genes da β -actina primeiro pico), tomado como controle interno, e GR (segundo pico) utilizados para as reações de PCR quantitativa em animais dos grupos C e DP nos dias 15, 17 e 18 de vida pós-natal.

FONTE: Ghizoni (2012)

4.4 Avaliação dos níveis proteicos de GR

4.4.1 Extração proteica

4.4.1.1 Extração de proteína total

Para obtenção de extrato proteico total das amostras obtidas pela raspagem da mucosa gástrica, utilizou-se tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; deoxicolato de sódio 1%) contendo um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 0,1 M, benzamidina 15 mg/mL, leupeptina 100 µg/mL, aprotinina 100 µg/mL) e fosfatases (ortovanadato de sódio 5 mM) e a lise foi feita com homogeneizador elétrico por 3 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante retirado e utilizado para a quantificação em espectrofotômetro com filtro 595 nm, de acordo com método de Bradford (1976). As alíquotas foram separadas para estocagem em freezer -80 °C.

4.4.1.2 Extração de proteínas para fracionamento citoplasmático e nuclear

A extração fracionada foi realizada de acordo com instruções do Kit NE-PER (Pierce, Rockford, IL, EUA) com algumas modificações (Ogias et al., 2010b). Para a obtenção do extrato fracionado, as amostras foram homogeneizadas em tampão CER I (volume igual a 10X o peso da amostra) contendo um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 0,1 M, benzamidina 15 mg/mL, leupeptina 100 µg/mL, aprotinina 100 µg/mL) e fosfatases (ortovanadato de sódio 5 mM), agitadas em vórtex e incubadas por 10 minutos em gelo. Foi adicionado o tampão CER II às amostras e as mesmas foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi separado (fração proteica citoplasmática), transferido imediatamente para um tubo pré-resfriado e estocado em freezer -80 °C. O precipitado (conteúdo nuclear) foi re-suspendido em tampão NER mantido em gelo por 40 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos em vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g a 4 °C, e o sobrenadante (fração protéica nuclear) foi transferido imediatamente para um tubo pré-resfriado e estocado em freezer -80 °C. Posteriormente, as duas frações foram quantificadas por meio do método BCA (Kit BCA, Pierce), de acordo com as indicações do fabricante.

4.4.2 Western blot e Immunoblot para GR

Após a extração proteica e quantificação, 30 µg de proteínas totais, 15 µg de proteínas citoplasmáticas ou 5 µg de proteínas nucleares foram diluídos em tampão de amostra (Tris 0,5 M, glicerol 17%, SDS 1,7%, *Bromophenol Blue* 0,04%), acrescido de 1% de β-mercaptoetanol. Após aquecimento (5 minutos, 100 °C), as amostras foram distribuídas nos poços de gel de poliacrilamida-SDS 12% para eletroforese (2 horas e 40 minutos, 100 V).

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20% em água) por 2 horas (4 °C e 200 mA). As membranas foram coradas em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos, a fim de se verificar a eficácia deste processo. Feito isto, as membranas com as amostras foram submetidas ao *immunoblot*, lavadas com TBS 0,02 M por 10 minutos, incubadas com tampão de bloqueio contendo TBS 0,02 M, leite desnatado em pó 5% e Tween 20 0,05% (1 hora, TA, sob agitação), lavadas com TTBS (TBS 0,02 M e Tween 20 0,1%) (10 minutos, TA, sob agitação) e incubadas (*overnight*, 4 °C) com anticorpo anti-GR (1µg/mL) (M20, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Para o controle interno das amostras de extrato

total, foi utilizado anticorpo monoclonal para β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (0,7 μ g/mL), ao passo que anti- α -tubulina (0,8 μ g/mL) (Santa Cruz Biotechnology) e anti-lamina B1 (0,7 μ g/mL) (ABCAM, Cambridge, MA, EUA) foram utilizados como controle da fração citoplasmática e nuclear, respectivamente. Além disto, a fim de se verificar a qualidade da separação das frações celulares, 5 μ L das amostras de citoplasma foram submetidos ao *immunoblot* para lamina B1 (proteína nuclear) e 5 μ L das amostras de núcleo submetidos ao *immunoblot* para α -tubulina (proteína citoplasmática). As amostras que apresentavam α -tubulina no núcleo e lamina B1 no citoplasma não foram consideradas apropriadas para os ensaios de *immunoblot*.

Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS sob agitação, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1:1000) ou anti-camundongo (1:500) conjugados com peroxidase (GE Healthcare) em tampão de bloqueio (1 hora, TA, sob agitação). Feito isto, após lavagens com TBS e TTBS, as membranas foram reveladas com kit ECL (GE Health Care), detectadas em filme radiográfico (Kodak®).

As bandas foram analisadas utilizando o programa de domínio público *Image J*. Para a análise de proteína total e do fracionamento celular, a densidade óptica integrada (IOD) de cada banda foi normalizada com a respectiva leitura para o controle interno com β -actina, α -tubulina (citoplasma) ou lamina B1 (núcleo), respectivamente e avaliada em relação ao início do tratamento (15º dia de vida pós-natal).

4.5 Imuno-histoquímica para GR

Cortes histológicos não-seriados de 6 μ m foram desparafinizados e hidratados em TBS (50 mM – pH 7,4)- Triton 0,3% por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com TBS, submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com metanol-H₂O₂ 3% e posteriormente submetidos à recuperação antigênica com ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0) em banho-maria em micro-ondas (5 minutos em potência alta – 600W e 5 minutos em potência média – 300W). As ligações não específicas foram bloqueadas com soro de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a 10% em TBS por 30 minutos (TA).

Os cortes histológicos foram incubados com anti-GR policlonal M-20 (1 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology) *overnight* a 4 °C. Após sucessivas lavagens em TBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado de cabra anti-coelho (13 μ g/mL, Jackson ImmunoResearch Laboratories) em TBS por 2 horas (TA), seguido de complexo estreptavidina biotina por 1 hora (TA) e revelação com 0,05% 3,3'-diaminobenzidina (DAB)

(10 µg/mL, Dako, Carpinteria, CA). Posteriormente, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer 0,1%, diferenciados em solução saturada de carbonato de lítio e montados em Goma de Damar. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário pelo soro de cabra.

4.5.1 Quantificação das células imuno-marcadas para GR

Por meio da contagem das células imuno-marcadas para GR presentes na mucosa da região do corpo do estômago foi obtido o índice de marcação (IM) para os cortes do estômago de animais dos grupos C e DP.

O IM foi determinado pela contagem de cerca de 2.500 células epiteliais marcadas e não marcadas ao longo da extensão da glândula sob microscópio de luz (Nikon, Japão) em imersão (100X) e auxílio de uma ocular integradora (8x, Kpl 1, Zeiss), que apresenta um retículo com linhas que dividem o campo (região quadrangular com 0,52 mm²) em quatro espaços idênticos. Foram considerados na contagem apenas os campos com glândulas orientadas. Os resultados foram expressos pelo número de células marcadas/total de células contadas X 100. Para representação dos resultados, as imagens foram adquiridas com utilização do pacote Image-Pro® Plus (versão 5.1.2) instalado no microscópio Olympus (BX51).

4.6 Resumo dos procedimentos realizados

A Figura 3 resume os procedimentos realizados, nos dias, horários e grupos utilizados para os estudos do GR em animais dos grupos C e DP.

Figura 3 – Esquema dos pontos de coleta das amostras

FONTE: Ghizoni (2012)

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism. Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com 1 ou 2 critérios, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey e Bonferroni, respectivamente. O nível de significância foi estipulado em $p < 0,05$ em todas as comparações realizadas.

5 RESULTADOS

5.1 Massa corpórea dos animais

A massa corpórea dos animais foi monitorada ao longo de todos os dias de tratamento, uma vez que já é sabido que o desmame precoce altera o ganho de massa (Gama e Alvares, 2000; Ogias et al., 2010a; Osaki et al., 2010), os animais que ficaram fora da variação estabelecida não foram utilizados. Além disto, o número de filhotes em amamentação (grupo C) também foi monitorado, de forma a mantermos cerca de 6 animais/mãe, para que não houvesse ingestão excessiva de leite, o que poderia fazer com que os animais deste grupo apresentassem um ganho de massa maior que o esperado para idade.

Notamos que os animais do grupo DP apresentaram um perfil de ganho de massa diferente quando comparado ao grupo C. Enquanto que os animais do grupo C apresentaram um ganho diário, os animais do grupo DP tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos dias 17 e 18 de vida pós-natal (Figura 4).

Figura 4 – Massa corporal dos grupos experimentais

Massa corpórea de animais dos grupos controle (C) e desmame precoce (DP) aos 15, 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal. Cada barra corresponde à média $\pm$ desvio padrão ($n=4$ filhotes/idade/grupo). Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle de mesma idade.

FONTE: Ghizoni (2012)

5.2 Perfil de expressão gênica do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica de animais em amamentação e em desmame precoce

Tendo em vista que a maior parte dos processos celulares responsáveis pelo crescimento e a maturação do epitélio gástrico em roedores ocorrem apenas no período pós-natal (Keeley, Samuelson, 2010) e se intensificam na 3ª semana de vida, estudamos o perfil de expressão gênica do receptor de glicocorticoide (GR) durante este último período, tanto nos animais em amamentação como em desmame precoce.

Primeiramente, analisamos este parâmetro pela RT-PCR do 15º ao 18º dia, uma vez que era necessário fazer a detecção da expressão durante essa fase específica do desenvolvimento. Para ambas as condições, observamos que o GR foi expresso em todos os dias avaliados (Figuras 5A e B). Nos animais do grupo C, a expressão não foi alterada, porém no 17º dia foi notado um aumento, embora não significativo. Já no desmame precoce, verificamos que nos dias 16 e 17 os níveis se mantêm inalterados, ao passo que do 17º para o 18º ocorreu um aumento importante na expressão ($p < 0,05$), sendo este valor maior também em relação aos animais em amamentação ($p < 0,05$).

Uma vez visto que a expressão do receptor diferiu de acordo com a dieta (amamentação ou desmame precoce) – houve uma interação entre dieta e os últimos dias analisados ($p < 0,05$), nos 17º e 18º dias, respectivamente, – partimos para a análise da expressão gênica de GR por PCR quantitativa. O resultado aqui encontrado mostrou uma variação entre as idades estudadas, principalmente em animais do grupo C (Figura 5C) aos 17 dias em relação ao início do tratamento (15º dia, também utilizado como normalizador da reação) ($p < 0,05$). Além disto, mostramos novamente que aos 17 dias, os animais do grupo C apresentam níveis maiores de RNAm para GR em relação ao 18º dia. Porém para os animais em DP, a expressão do receptor foi semelhante quando comparamos o 17º e o 18º dia de vida pós-natal.

Figura 5 – Perfil de expressão de RNAm para GR dos grupos experimentais

Expressão gênica do receptor de glicocorticoide (GR) na mucosa gástrica de ratos filhotes em amamentação (controle) (barras em cinza) e em desmame precoce (DP) (barras em preto) de 15, 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal. (A) Bandas representativas de GR e β -actina para cada condição e idade por RT-PCR. (B) A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada em relação à concentração de β -actina, e o início do tratamento (15º dia) foi tomado como referência (IOD=1). Cada barra corresponde à média $\pm$ desvio padrão. $n = 3$ animais/idade/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle de mesma idade. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP do dia anterior. (C) Expressão gênica relativa de GR avaliada por qPCR normalizada pela expressão de β -actina, tomando o 15º dia de vida pós-natal como parâmetro comparativo. Cada barra corresponde à média $\pm$ desvio padrão. $n = 3$ animais/idade/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C aos 15 dias.

FONTE: Ghizoni (2012)

5.3 Efeito do desmame precoce sobre o nível proteico do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica

Após detectarmos a expressão gênica de GR durante a 3ª semana de vida pós-natal, investigamos a influência da dieta sobre o nível proteico do receptor na mucosa gástrica de ratos do 15º ao 18º dia de vida pós-natal.

Quando analisamos os resultados obtidos (Figura 6A e B), observamos que nos animais em amamentação (C), não foram detectadas mudanças na concentração de GR; os níveis permanecem muito semelhantes ao longo dos dias estudados. Porém durante o desmame precoce, foi possível notar um decaimento da concentração de GR desde o segundo dia de tratamento, que se intensificou no último dia de análise (18º dia) ($p < 0,05$). Aos 18 dias, os níveis do receptor na mucosa gástrica atingiram praticamente a metade dos níveis encontrados nos animais do grupo C (Figura 6B).

5.4 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição do receptor de glicocorticoide nas frações celulares na mucosa gástrica

Como mencionado anteriormente, o GR pertence a uma superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição; quando não ligado ao hormônio, localiza-se preferencialmente no citoplasma, enquanto que o GR ligado ao esteroide é levado rapidamente por translocação para o núcleo onde exerce sua função (Heitzer et al., 2007).

Uma vez observado que o desmame precoce é capaz de modular o nível proteico de GR na mucosa gástrica durante a 3ª semana de desenvolvimento pós-natal, e sabendo que condições estressantes também podem modular a concentração de GR nos compartimentos celulares, citoplasma e núcleo (Ogias et al., 2010b), investigamos o GR nas frações celulares.

Para tal análise, amostras da mucosa de animais dos grupos C e DP de 15, 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal foram fracionadas e processadas para *immunoblot*. Para representar os resultados encontrados de forma mais clara, as frações foram apresentadas separadamente, com os respectivos controles internos e de isolamento (Figura 6C). A avaliação do nível de GR nas frações celulares mostrou que nos animais em amamentação (grupo C), o GR localizou-se preferencialmente no citoplasma em todos os dias analisados (Figura 6C e D), e principalmente aos 16 e 18 dias ($p < 0,05$). Por outro lado, quando analisamos os animais em DP, este perfil foi encontrado apenas no 16º dia de vida ($p < 0,05$). Já no 17º dia, notamos que no DP, a concentração de GR nos compartimentos celulares começou a se tornar semelhante,

e ocorreu diminuição da fração citoplasmática, concomitante a um sutil aumento da fração nuclear (Figura 6C e D) ($p < 0.05$). Assim, durante o DP, observamos que aos 17 dias de vida pós-natal, ou seja, 48 h após o início do tratamento teve início uma modificação da concentração de GR nas frações celulares, de forma que aos 18 dias, verificamos que a mudança da dieta causou a diminuição de GR no citoplasma (Figura 6B).

Níveis proteicos do receptor de glicocorticoide (GR) total e nos compartimentos citoplasmático e nuclear na mucosa gástrica de ratos filhotes dos grupos controle (C) (barras em cinza) e desmame precoce (DP) (barras em preto) do 15º ao 18º dia de vida pós-natal. Amostras obtidas pela raspagem da mucosa gástrica, sendo 30 µg de proteínas totais, 15 µg de proteínas citoplasmáticas e 5 µg de proteínas nucleares foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%, transferidas e processadas para revelação em ECL. (A) *Immunoblot* representativo da concentração proteica total de GR para cada condição e idade. (B) A densidade óptica integrada (IOD) foi normalizada com a concentração de β-actina e analisada em relação ao início do tratamento (15º dia). Cada barra corresponde à média ± desvio padrão (*n*) de animais indicado. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle de mesma idade. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP aos 16 dias. (C) *Immunoblot* representativo de GR após o fracionamento celular. (D) IOD foi normalizada com a concentração de α-tubulina para a fração citoplasmática e lamina B1 para a fração nuclear. A separação apropriada das frações celulares foi verificada pela presença de α-tubulina no núcleo e de lamina B1 no citoplasma. Os níveis proteicos de GR estão representados no citoplasma (barras claras) e no núcleo (barras hachuradas) em relação ao 15º dia de vida pós-natal. Cada barra corresponde à média ± desvio padrão. $n = 3$ animais/idade/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao citoplasma da mesma idade. # $p < 0,05$ quando comparado ao citoplasma do grupo C aos 18 dias de vida pós-natal.

FONTE: Ghizoni (2012)

Figura 6 – Efeito do desmame precoce sobre o nível proteico total e subcelular de GR dos grupos experimentais

5.4 Efeito do desmame precoce sobre a distribuição tecidual do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica

Após identificarmos a presença de GR na mucosa gástrica por *immunoblot*, investigamos o efeito da mudança do alimento sobre a distribuição tecidual do receptor em filhotes do 15º ao 18º dia de vida pós-natal. As reações de imuno-histoquímica para GR dos animais dos grupos C e DP mostraram que o receptor está distribuído ao longo de toda glândula gástrica (Figura 7A-H). Observamos que a marcação está presente nas diferentes linhagens celulares da glândula, desde as células mucosas superficiais na região da fosseta, as células parietais na interface istmo/colo até as células zimogênicas presentes na região da base, marcadas em sua maioria em ambos os compartimentos celulares.

O índice de marcação (IM) revelou que nos filhotes do grupo C houve um aumento importante de GR em relação ao primeiro dia de análise (15º dia) para os demais dias estudados ($p < 0,05$) (Figura 7I). A partir do 15º, o IM permaneceu inalterado entre os dias 16-18 de vida pós-natal nos animais em amamentação. Já no DP, desde o segundo dia de manipulação, encontramos uma diminuição no número de células de marcadas, e isto ficou evidente no 18º dia de vida pós-natal, onde o DP desencadeou um IM cerca de 20% menor em relação ao nos animais do grupo C ($p < 0,05$) (Figura 7I).

Distribuição do receptor de glicocorticoide (GR) na mucosa gástrica de ratos filhotes dos grupos controle (C) e desmame precoce (DP). A-H) Fotomicrografias da reação imuno-histoquímica nos dias 15, 16, 17 e 18 de vida pós-natal. A) Imuno-marcação para GR aos 15 dias; B) 16 dias do grupo C; C) 16 dias do grupo DP; D) Controle negativo da reação, obtido pela substituição do anticorpo primário por soro; E) 17 dias do grupo C; F) 17 dias do grupo DP; G) 18 dias do grupo C, detalhe mostra uma célula parietal marcada em ambos os compartimentos celulares (citoplasma e núcleo); H) 18 dias do grupo DP, detalhe mostra células parietais marcadas no citoplasma e região perinuclear. Os cortes histológicos foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer. Aumento original (A-H) 10X e detalhes (G-H) 50X. I) Índice de células imuno-marcadas para GR na mucosa gástrica de filhotes dos grupos C e DP do 15º ao 18º dia de vida pós-natal. Cada barra corresponde à média $\pm$ desvio padrão. $n= 3-4$ animais/idade/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle de mesma idade. # $p<0,05$ quando comparado ao 15º dia de vida pós-natal.

FONTE: Ghizoni (2012)

Figura 7 – Efeito do desmame precoce sobre imuno-marcação para GR dos grupos experimentais

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e a maturação fisiológica completa do epitélio gástrico dos roedores são processos tardios e ocorrem ao fim da terceira semana de vida pós-natal, período em que o animal também passa por uma mudança importante no padrão alimentar. Logo, a substituição prematura do leite (fonte de moléculas capazes de controlar esses processos) pelo alimento sólido pode modificar o crescimento e a maturação do epitélio gástrico. Podemos considerar também que o desmame precoce é uma situação perturbadora para os filhotes, uma vez que além da mudança alimentar ocorre privação dos cuidados maternos, e em conjunto ambos são fundamentais para o desenvolvimento dos animais. Devemos mencionar ainda que diferentes modelos experimentais de manipulação da dieta, como o jejum alimentar, restrição de nutrientes e minerais e o próprio desmame precoce têm em comum a ativação de respostas de estresse, que levam à indução da ativação do eixo HPA e, consequentemente, à liberação de corticosterona no plasma (Barreto-Medeiros et al, 2007; Caddell et al, 1991; Lin et al, 1998; Rosene et al, 2004; Ogias et al, 2010b). Entretanto, estes efeitos dependem da duração do estímulo e, principalmente da idade na qual houve a mudança da dieta. Uma vez notado que os animais submetidos ao desmame precoce apresentam níveis plasmáticos de corticosterona mais altos, e que este estímulo perdura por até 48 horas após a substituição da dieta (Figueiredo, 2010 Lin et al., 1998; Kikusui et al., 2009), no presente estudo investigamos a expressão e a distribuição tecidual e subcelular do receptor de glicocorticoide (GR) na mucosa gástrica, a fim de avaliarmos como a atividade do hormônio pode ser regulada durante o desmame precoce.

Durante o curso dos experimentos, um dos parâmetros analisados foi a variação da massa corpórea dos animais em amamentação e dos submetidos ao desmame precoce. Observamos que aos 17 dias de vida pós-natal, os filhotes desmamados precocemente apresentaram uma redução da massa corporal em relação aos ratos lactentes, e essa perda de peso é um reflexo direto da mudança do padrão alimentar. No início do tratamento, aos 15 dias de vida pós-natal, os ratos desmamados não se alimentavam sozinhos de imediato, embora a pasta de ração fosse aceita no momento da administração. Nós observamos que progressivamente, a partir do 16º dia, eles começaram a se alimentar, não apenas nos momentos em que a pasta e a água eram ofertadas, mas também com o alimento deixado na gaiola. Devido a este tempo de adaptação, o desmame precoce provocou uma perda de peso inicial, e este efeito começou a ser revertido no 18º dia, quando observamos um pequeno aumento na massa corpórea dos animais. Este perfil está de acordo com estudos prévios do

nosso laboratório e de outros grupos, que demonstram a perda de peso imediata em animais submetidos ao desmame precoce (Lin et al., 1998; Ogias et al., 2010a; Osaki et al., 2010). Gama e Alvares (2000) evidenciaram que aos 22 dias (1 semana após o início da nova dieta) os filhotes desmamados precocemente já apresentam uma massa corpórea considerada normal para a idade.

No período em que ocorre o desmame dos filhotes, durante a 3ª semana de vida pós-natal, também é verificado um aumento gradual nos níveis plasmáticos de corticosterona, inerente ao desenvolvimento, sendo este concomitante à maturação funcional do trato gastrointestinal (Agbemaflé et al., 2005; Henning, 1981; Henning et al., 1994; Kanemasa et al., 1999). Neste contexto, a corticosterona e o receptor de glicocorticoide (GR) são importantes para que estes processos ocorram. Um estudo detalhado da ontogênese embrionária de GR em camundongos conduzido por Speirs et al. (2004) revelou que a expressão do receptor no TGI é baixa nas primeiras duas semanas de gestação, sendo que um aumento progressivo é visto a partir do 13º dia de vida intra-uterina. Costa et al. (1996) mapearam a distribuição de GR em diferentes tecidos de embriões humanos e mostraram, dentre outros sistemas, sua presença no epitélio do estômago já a partir da 8ª semana gestacional. Além da localização, a função de GR durante o desenvolvimento também tem sido explorada. Gartner et al. (2002) avaliaram a proliferação e diferenciação no epitélio intestinal no fim do período fetal em animais selvagens e *knockouts* para GR, e detectaram a expressão do receptor no intestino em desenvolvimento de animais não-manipulados geneticamente. A deleção do receptor não causou prejuízo sobre os parâmetros analisados, dando indícios que a atividade da corticosterona no período pré-natal seria menos preponderante em relação ao período pós-natal (Gartner et al., 2002). Cabe ressaltar, que estudos com animais *knockouts* para GR são conduzidos apenas na fase fetal, uma vez que desenvolvimento pós-natal é inviável, principalmente porque os glicocorticoides medeiam a produção do surfactante pulmonar, fundamental para a formação e maturação dos alvéolos. Além disso, a deleção completa de GR também está relacionada à redução de enzimas hepáticas, hipertrofia e hiperplasia das glândulas adrenais e ausência de apoptose, processo essencial para o desenvolvimento do timo (Berger et al., 1996).

Apesar da literatura mencionada acima ter contribuído muito para o entendimento das funções da corticosterona sobre o crescimento, uma caracterização detalhada da expressão e localização pós-natal de GR no estômago ainda permanece incompleta. Logo, o primeiro objetivo deste estudo foi o de investigar a expressão do receptor na mucosa gástrica de filhotes em amamentação e em desmame precoce entre os dias 15 a 18 de vida pós-natal.

Nossos resultados indicaram que o GR é expresso durante este período para os animais em ambos os perfis de alimentação. Primeiramente, avaliamos a expressão do receptor por PCR semi-quantitativa e esta mostrou um aumento de RNAm para GR, principalmente nos animais em DP, do 17º dia para o último dia de análise. Em seguida, avaliamos a expressão de GR por PCR quantitativa nos dois últimos dias de análise (17º e 18º dias de vida) para os animais de ambos os grupos. Neste último, os animais lactentes mostraram um aumento na expressão aos 17 dias, porém para os animais em DP, não constatamos variações entre os dias estudados. Uma vez que a partir da 2ª semana pós-natal os níveis de corticosterona gradativamente aumentam, a maior expressão do receptor visto aos 17 dias nos animais em amamentação pode ser em decorrência deste fato. Esta resposta possibilita o epitélio gástrico a responder ao hormônio, que em concentrações adequadas, é importante para o desenvolvimento deste sistema. Em contrapartida, sabemos que os animais em DP apresentam níveis mais altos de corticosterona, e se o hormônio estiver disponível para agir sobre a mucosa e pode causar efeitos deletérios para o seu desenvolvimento. Logo, a diminuição de RNAm para GR observada nos dois primeiros dias de vida pós-natal poderia ser um mecanismo para atenuar a ação do hormônio que está aumentado após 48 horas de manipulação da dieta. Esta diminuição que pode ser oriunda de degradação da molécula, pela ação de microRNAs, por exemplo. Entretanto, aos 18 dias, o desmame precoce leva a um aumento importante na expressão do receptor; talvez a partir deste ponto, a proteção até então encontrada esteja perdida nestes filhotes.

A expressão e função do GR já foram investigadas em situações nas quais mudanças na dieta são empregadas com o objetivo de se estudar as respostas ao estresse. Nosso laboratório vem estudando a interação entre o padrão alimentar, o crescimento e maturação da mucosa gástrica. Já demonstramos que o jejum, por exemplo, aumenta a expressão gênica de GR na mucosa gástrica de ratos filhotes após 3 horas e em adultos após 12 horas do início da privação alimentar (Ogias et al., 2010b). Kikusi et al. (2006) estudaram animais desmamados precocemente e revelaram uma maior expressão de GR no hipocampo, área do SNC envolvida no mecanismo de *feedback* negativo exercido pela corticosterona. *In vitro*, a depleção de nutrientes também altera a atividade de GR, e em células cultivadas em meio com privação de glicose ocorre a hiper-fosforilação em um resíduo de GR diferente do sítio usual (Gallagher-Beckley et al., 2011).

A atividade do GR depende da sua expressão, síntese e degradação (Heitzer et al., 2007), sendo que estes processos podem ser regulados pelos níveis GCs em diferentes órgãos, dentre eles o estômago (Ogias et al., 2010b). Após detectarmos a presença de RNAm para o

receptor na terceira semana de vida pós-natal, avaliamos o nível proteico bem como a distribuição do receptor na mucosa gástrica de filhotes amamentados e em desmame precoce. Nos animais em amamentação, observamos que a concentração do receptor se manteve constante ao longo do período estudado. No entanto, nos filhotes desmamados precocemente, o nível do GR foi decaindo ao longo dos dias e se tornou quase a metade do valor inicial aos 18 dias. Um perfil semelhante foi encontrado na avaliação do número das células imuno-marcadas para GR na mucosa gástrica, com a qual verificamos que o índice de marcação aumentou de 45% no 15º dia para 68% no 16º dia nos animais amamentados, sendo que a partir daí, o IM manteve-se constante. Nos filhotes em desmame precoce, notamos uma propensão a diminuição da presença de GR na mucosa gástrica e aos 18 dias, evidenciamos a menor densidade de marcação. Dessa forma, assim como mostrado por *immunoblot*, o desmame precoce promoveu a diminuição do conteúdo de GR na mucosa gástrica dos filhotes. No entanto, o desmame precoce não alterou a distribuição de GR em termos de populações celulares, uma vez que detectamos células imuno-marcadas por toda extensão da glândula gástrica, logo, isto indica que todas as células epiteliais têm capacidade de responder a corticosterona circulante. A primeira descrição da presença de GR no epitélio gástrico foi feita por Kanemasa et al. (1999) que mostraram a marcação do núcleo de células parietais em animais adultos. Mais recentemente, Ogias et al. (2010b) evidenciaram a presença do receptor nas diferentes populações celulares ao longo de toda glândula gástrica em filhotes lactentes, e uma maior concentração nas porções de istmo e base da glândula em animais adultos.

Em cultura de células, a exposição a concentrações elevadas de GCs leva à redução de GR, e conseqüentemente, há a diminuição da sensibilidade ao hormônio (Burnstein et al., 1991), e sabe-se também que em células tratadas com dexametasona, os níveis de GR decaem conforme o tempo de exposição (Silva et al., 1994). Em células de ovário, o tratamento por 5 horas com dexametasona leva à diminuição de 50% do nível intracelular do receptor, e após 24 horas, a imunorreatividade para GR é ausente no citoplasma e no núcleo dessas células (Bellingham et al., 1992). Efeito semelhante foi reportado após o tratamento com corticosteroides usados na terapêutica da asma, no qual ocorre diminuição do nível total de GR nas células do epitélio brônquico (Korn et al., 1997) e resposta similar foi descrita em células pulmonares expostas a dexametasona por até 8 horas (Hirasawa et al., 2009). Em modelos de estresse, nos quais os tecidos estão expostos às variações de GCs, diferentes estudos também sugerem a modulação de GR. Assim, em animais submetidos ao estresse pós-traumático e à imobilização, há diminuição de GR no citoplasma e no núcleo de células do hipocampo, e musculares, respectivamente (Sato et al., 2011; Zhe et al., 2008). Efeito

semelhante foi observado na hipóxia que leva a queda no nível do receptor em células de epitélio alveolar (Huang et al., 2009). Portanto, a diminuição da concentração tecidual de GR pode ser oriunda da administração de GCs bem como do aumento hormonal em situações de estresse.

O GR atua como um fator de transcrição, ou seja, sua atividade está marcada pelo seu trânsito do citoplasma em direção ao núcleo, onde o receptor ativa diretamente transcrição gênica. Uma vez detectada a presença do GR na mucosa gástrica, nosso próximo passo foi analisar sua localização subcelular, bem como verificar se o desmame precoce poderia alterá-la. Para tanto, estudamos a concentração do receptor nas frações citoplasmática e nuclear por *immunoblot* em animais de ambos os grupos experimentais. Com o intuito de assegurar a confiabilidade dos resultados, o primeiro cuidado foi analisar se as proteínas presentes nos compartimentos celulares haviam sido adequadamente isoladas. Dessa forma, o extrato da fração citoplasmática foi submetido ao *immunoblot* para lamina B1, enquanto o extrato nuclear foi testado para α -tubulina. As amostras que apresentaram nenhum ou níveis muito baixos de contaminação cruzada foram consideradas adequadas.

Em condições fisiológicas, o GR localiza-se preferencialmente no citoplasma, no qual faz parte de um complexo multiproteico que se desacopla do receptor após a ligação com o hormônio, evento que permite sua translocação para o núcleo (Heitzer et al., 2007; Pratt et al., 2004). Nossa análise da distribuição do GR nos compartimentos celulares mostrou que nos filhotes em amamentação, o GR estava mais concentrado no citoplasma em relação ao núcleo durante todos os dias estudados. No entanto, este mesmo perfil só foi encontrado aos 16 dias de vida nos animais do grupo desmame precoce. Aos 17 e 18 dias de vida pós-natal, detectamos uma redução na concentração de GR na fração citoplasmática, concomitante a um sutil aumento na fração nuclear, o que levou a um equilíbrio na concentração do receptor entre os compartimentos celulares. Esta observação sugere que durante o desmame precoce, apesar do nível total do receptor ser menor, sua densidade no citoplasma está reduzida, ao passo que discretamente aumenta no núcleo. Alguns estudos apontam que a translocação do GR do citoplasma para o compartimento nuclear ocorre em situações nas quais os níveis circulantes de corticosterona estão elevados, marcando assim a ação molecular do receptor. Adzic et al. (2009) observaram que o estresse agudo causado por 30 minutos de imobilização diminui o nível de GR citoplasmático, concomitante ao aumento na fração nuclear em células hipotalâmicas e do córtex pré-frontal. Entretanto, durante o estresse crônico, os níveis de GR nas frações celulares permanecem semelhantes quando comparados aos de animais não estressados, porém o grau de fosforilação do receptor é modificado, sugerindo que essa

regulação não depende somente do nível hormonal (Adzic et al. 2009). Noguchi et al. (2010) também mostraram que na hipófise e no hipotálamo, o estresse causado pela imobilização simples e repetida causa um aumento no nível de corticosterona e aumenta o trânsito do receptor do citoplasma para o núcleo. Além disso, a elevação do nível plasmático de corticosterona durante a noite (fase escura do ritmo circadiano de roedores) aumenta o GR nuclear, bem como a sua capacidade de ligação aos GREs em animais adultos (Kitchener et al., 2004). No entanto, em relação às respostas induzidas por alterações alimentares, Yaktine et al. (1998) observaram que em animais submetidos à dieta hipocalórica, o aumento da corticosterona elevou os níveis de GR em células da epiderme, porém sem alterar a localização subcelular do receptor. Durante o jejum, uma maior translocação do receptor para o núcleo de células epiteliais gástricas, ocorre apenas em ratos adultos, sendo que este efeito não é detectado em filhotes lactentes, pois o GR permanece mais concentrado no citoplasma (Ogias et al. 2010b). Nossos resultados apontam uma diminuição na fração citoplasmática e um aumento sutil da fração nuclear após 72 horas do início do desmame precoce, e consideramos que a partir daí poderia ter início a antecipação da resposta descrita em animais adultos. Podemos sugerir que o estresse induzido pela abrupta mudança da dieta e pela falta dos cuidados maternos poderia regular o receptor de glicocorticoide de maneira diferente dos estudos acima mencionados, uma vez que mesmo diante de níveis de GR diminuídos no desmame precoce, observamos que sua entrada no núcleo foi levemente aumentada.

Em uma análise geral, poderíamos dizer que nossos resultados indicaram um descompasso entre a transcrição de GR e o conteúdo proteico. No entanto, podemos estar diante de mecanismos capazes de regular o GR na mucosa gástrica, como por exemplo, a ativação da via de degradação ubiquitina/proteassoma, que regula a meia-vida e a degradação de GR (Nishi, Kawata, 2006). Estudos *in vitro* em que células são tratadas com agentes inibidores de proteassoma, mostram que ocorre um acúmulo de GR intracelular, o que confirma que a degradação do receptor é mediada por esta via (Deroo et al., 2002; Wallace e Cidlowski, 2001; Wallace et al., 2010). Recentemente, outro estudo sugeriu o envolvimento de microRNAs na redução dos níveis de GR em estruturas cerebrais durante o SHRP (Vreugdenhil et al., 2009), que caracteriza o início do desenvolvimento pós-natal de ratos. Alterações durante este período crítico podem modificar ou reprogramar o crescimento, pois os eventos que ocorrem nesta fase podem ter impacto na etiologia de psicopatologias na vida adulta associadas ao estresse. Nós encontramos uma diminuição significativa do nível total de GR e no compartimento citoplasmático nas células gástricas em filhotes com 18 dias de vida submetidos ao desmame precoce. Esta redução pode ser devida a degradação citoplasmática

do receptor, como parte do mecanismo fisiológico de proteção à ontogênese pós-natal de tecidos, como a mucosa gástrica (Sapolsky et al., 1984; Sapolsky, Meaney, 1986; Ogias et al., 2010b).

No trato gastrintestinal, a atividade de GR tem sido associada ao seu funcionamento adequado, mas também a algumas patologias que acometem esse sistema. No estômago, a função de GR está associada ao aumento ontogênico de AMP-18 (*antrum mucosal protein*), molécula envolvida no crescimento e maturação pós-natal gástrica (Petri, Lee, 2005). O receptor também medeia o controverso efeito protetor que os GCs endógenos podem ter contra lesões ulcerativas na mucosa gástrica (Filaretova, 2006; Filaretova et al., 2002, 2007, 2012), principalmente pelo seu envolvimento na síntese de muco (Tanaka et al., 2001). Além disto, o GR pode participar também de mecanismos celulares que controlam o crescimento e maturação do estômago. Dependendo da fase de desenvolvimento, a proliferação celular gástrica pode ser afetada por níveis elevados de corticosterona, e a inibição observada em ratos adultos pode ser decorrente da alteração da concentração de proteínas envolvidas com a progressão do ciclo celular, como a p21, p27 e ciclina D1 (Ogias et al., 2010b). No desmame precoce, além dos níveis de corticosterona estarem mais elevados (Figueiredo, 2010), resultados do laboratório mostraram que a capacidade de ligação com a CBG também está diminuída, logo, há mais corticosterona livre. Portanto, o estímulo descrito sobre a proliferação e diferenciação do epitélio gástrico (Osaki et al., 2010, 2011) poderia ser em parte mediado pelo GR.

Cabe ressaltar, que a investigação do efeito da corticosterona endógena sobre a mucosa gastrintestinal é mais restrita quando comparada aos inúmeros estudos realizados para observação de respostas aos GCs administrados. Sabe-se que os hormônios sintéticos não estão sujeitos aos mesmos processos de regulação que os esteroides endógenos, como a capacidade de ligação com a CBG, por exemplo (Mickelson, Westphal, 1980). Assim a aplicação de GCs em indivíduos ou sistemas isolados pode ter efeitos mais imediatos quando comparada às respostas promovidas pelo estresse. Sabemos que os GCs sintéticos podem induzir uma diminuição na proliferação de células gástricas *in vitro* e em filhotes lactentes, além causar o aumento do número de células apoptóticas nestes últimos (Gama et al., 2000; Luo et al., 2007). A diferenciação celular também é modificada e induzida no epitélio gástrico após o tratamento com GCs nas fases pré e pós-natal de ratos (Tseng, Johnson, 1986; Tsukada et al., 1998).

O GR foi evidenciado na mucosa gástrica normal, como citamos anteriormente, mas também em tumores gástricos, e nesta situação, a expressão do receptor é mais elevada em

relação à mucosa saudável, e está associada à progressão da doença (Wu et al., 1989). Em humanos, o GR também foi descrito em carcinomas do TGI, sendo que no estômago, as células zimogênicas foram as únicas que apresentaram reatividade (Lien et al., 2008). No intestino, o GR é fundamental para a transcrição de genes envolvidos na maturação do órgão (Agbema et al., 2005). A atividade do receptor tem um papel importante na transcrição e no funcionamento do transportador de glicose Glut5 em filhotes (Suzuki et al., 2011) e em adultos (Reichardt et al., 2012), bem como na atividade de canais de Na^+ presentes nas células epiteliais no cólon (Bergann et al., 2011; Schulz-Baldes et al., 2001). Além disso, o GR é fundamental para manutenção e regulação das junções de oclusão presentes entre os enterócitos, as quais são comprometidas em algumas patologias intestinais (Boivin et al., 2007). Por último, a ativação do receptor está relacionada à patogênese da Síndrome do intestino irritável (IBD), uma vez que o estresse está diretamente envolvido na etiologia da doença (Myers, Greenwood-Van, 2012).

Diante o exposto, no presente estudo nós demonstramos que o desmame precoce é capaz de influenciar a expressão gênica, o nível protéico total e a distribuição de GR nos compartimentos intracelulares na mucosa gástrica de filhotes durante o desenvolvimento pós-natal. A regulação de GR durante o desmame precoce difere das respostas agudas encontradas em outros tipos de manipulação da dieta, como o jejum, um estresse agudo no qual a concentração de corticosterona regula positivamente o GR na mucosa gástrica. Apesar de o nível total de GR estar diminuído, o aumento sutil da concentração nuclear do receptor nos animais em DP pode indicar que a partir deste ponto, ocorre o início de uma resposta que é encontrada nas células do epitélio gástrico de animais adultos, nos quais a translocação do receptor é aumentada após a restrição alimentar (Ogias et al., 2010b). Nossos resultados indicam que a manutenção da lactação é um comportamento fundamental para assegurar o crescimento e maturação da mucosa gástrica, uma vez que alterações nas funções de GR podem ter impactos na 3ª semana de vida, a qual é considerada crucial para o desenvolvimento pós-natal do estômago. No entanto, outros aspectos importantes para regulação e função de GR necessitam ser investigados neste modelo, como o estado de fosforilação do receptor, sua degradação e influência de microRNAs, atividade da enzima 11- β -hidroxisteroide desidrogenase, bem como a relação de GR com a ativação genes-alvo durante o desmame precoce.

Os resultados obtidos neste estudo com animais em amamentação e submetidos ao desmame precoce encontram-se resumidos na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo

FONTE: Ghizoni (2012)

7 CONCLUSÕES

Diante o exposto, os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir:

- a expressão gênica do receptor de glicocorticoide está presente na mucosa gástrica de animais em amamentação e em desmame precoce durante a 3ª semana de vida pós-natal;
- o desmame precoce leva a diminuição no nível total de GR na mucosa gástrica de filhotes;
- a distribuição do receptor nos compartimentos celulares também é afetada pelo desmame precoce, sendo que esta condição provoca a diminuição na fração citoplasmática e um sutil aumento na fração nuclear, tornando a concentração de GR semelhante entre as frações celulares;
- apesar de não alterar os tipos celulares que expressam GR na mucosa gástrica, o desmame precoce causou a diminuição no nível do receptor no epitélio gástrico.

Dessa forma, nós identificamos o GR na mucosa gástrica durante a terceira semana de vida pós-natal e demonstramos que mesmo com a diminuição de sua concentração durante o DP, a atividade do GR pode estar mantida, devido ao equilíbrio entre os compartimentos celulares, observado ao final do tratamento. Nós sugerimos que a mudança do padrão alimentar alterou um elemento essencial na cascata de resposta à corticosterona, e essa modificação pode ser importante na coordenação do crescimento da mucosa gástrica durante o desmame precoce.

REFERÊNCIAS¹

- 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.
- Adzic M, Djordjevic J, Djordjevic A, Niciforovic A, Demonacos C, Radojcic M, Krstic-Demonacos M. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol*. 2009;202(1):87-97.
- Agbemaflle BM, Oesterreicher TJ, Shaw CA, Henning SJ. Immediate early genes of glucocorticoid action on the developing intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G897-906.
- Al-Mohaisen M, Cardounel A, Kalimi M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. *Steroids*. 2000;65(1):8-15.
- Alvares EP. Extensive networks of TMPase positive basal lysosomes are present in fetal rat gastric epithelium before overt differentiation. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1994;26(4):515-23.
- Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. 1984;224(4648):452-9.
- Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Schulte HM. Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;131(2):233-40.
- Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J*. 2006;27(2):413-26.
- Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira E Silva WT, Leandro CG, Deiró TC, Manhaes-de-Castro R, Machado Barbosa de-Castro CM. Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(5):229-334.
- Bellingham DL, Sar M, Cidlowski JA. Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. *Mol Endocrinol*. 1992;6(12):2090-102.
- Bergann T, Fromm A, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD. Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na⁺ channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(5):432-9.
- Berger SA, Cole TJ, Schmid W, Schütz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid and mineralocorticoid signaling in development and physiological processes. *Steroids*. 1996;61(4):236-9.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html [2007 May 22].

- Boivin MA, Ye D, Kennedy JC, Al-Sadi R, Shepela C, Ma TY. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G590-8.
- 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;110(1):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
- Breuner CW, Orchinik M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*. 2002;175(1):99-112.
- Burnstein KL, Bellingham DL, Jewell CM, Powell-Oliver FE, Cidlowski JA. Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids*. 1991;56(2):52-8.
- Caddell JL, Dunn JD. Plasma corticosterone in stressed magnesium-deficient weanling rats. *Magn Trace Elem*. 1991;10(1):40-6.
- Chen D, Aihara T, Zhao CM, Håkanson 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(4):G539-44.
- Costa A, Rocci MP, Arisio R, Benedetto C, Fabris C, Bertino E, Botta G, Marozio L, Mostert M, Urbano D, Emanuel A. Glucocorticoid receptors immunoreactivity in tissue of human embryos. *J Endocrinol Invest*. 1996;19(2):92-8.
- Ctenas MLB, Vitolo MR. *Crescendo com saúde: o guia do crescimento da criança*. 2. ed. São Paulo. C2 Editora; 2002.
- Daniels WM, Fairbairn LR, van Tilburg G, McEvoy CR, Zigmond MJ, Russell VA, Stein DJ. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 1(7) glucocorticoid receptor promoter region. *Metab Brain Dis*. 2009;24(4):615-27.
- De Andrade Sá ER, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. In vivo effects of TGF β -1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. *Regul Pept*. 2008;146(1-3):293-302.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*. 2003;24(4):488-522.
- De Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res*. 2009;1293:129-41.
- DeFranco DB. Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int*. 2000;57(4):1241-9.

Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK. Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol Cell Biol.* 2002;22(12):4113-23.

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

Ekelund M, Håkanson R, Hedenbro J, Rehfeld JF, Sundler F. Endocrine cells and parietal cells in the stomach of the developing rat. *Acta Physiol Scand.* 1985;124(4):483-97.

Encío IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991;266(11):7182-8.

Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(6):821-34

Figueiredo PM. Papel da interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento na regulação da proliferação celular no epitélio gástrico de ratos em desenvolvimento pós-natal. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Filaretova L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. *Auton Neurosci.* 2006;125(1-2):86-93.

Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Bobryshev P, Takeuchi K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. *J Pharmacol Sci.* 2007;104(3):195-201.

Filaretova L, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(5):G1082-9.

Filaretova L, Bagaeva T, Morozova O. Stress and the Stomach: Corticotropin-Releasing Factor May Protect the Gastric Mucosa in Stress Through Involvement of Glucocorticoids. *Cell Mol Neurobiol.* 2012;[Epub ahead of print]

Galigniana 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(12):1903-13.

Gallagher-Beckley AJ, Cidlowski JA. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life.* 2009;61(10):979-86.

Gallagher-Beckley AJ, Williams JG, Cidlowski JA. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2011;31(23):4663-75.

- 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(2-3):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(10):2594-8.
- Gama P, Goldfeder EM, de Moraes JC, Alvares EP. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. *Anat Rec.* 2000;260(3):213-21.
- Gartner H, Graul MC, Oesterreicher TJ, Finegold MJ, Henning SJ. Development of the fetal intestine in mice lacking the glucocorticoid receptor (GR). *J Cell Physiol.* 2003;194(1):80-7.
- Ghizoni H. Distribuição do receptor de glicocorticoide na mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.
- Glavin GB, Pare WP. Early weaning predisposes rats to exacerbated activity-stress ulcer formation. *Physiol Behav.* 1985;34(6):907-9.
- GraphPad Software. GraphPad Prism. 2007. Version 5.1. California: San Diego. Software.
- Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behav Brain Res.* 2007;184(2):101-8.
- Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev.* 1990;11(1):65-79.
- Heird WC; Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annu. Rev. Nutr.* 2005;25:549–71.
- Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(4):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(5):E451-6.
- Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol.* 1981;241(3):G199-214.
- Henning SJ, Sims JM. Delineation of the glucocorticoid-sensitive period of intestinal development in the rat. *Endocrinology.* 1979;104(4):1158-63.
- Henning SJ, Rubin DC, Shulman RJ. Ontogeny of the intestinal mucosa. In: Johnson LR(ed) *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3rd Ed. New York: Raven Press; 1994. p 571-10.

Hinds TD Jr, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, Sanchez ER. Discovery of glucocorticoid receptor- β in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(9):1715-27.

Hirasawa G, Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Muramatu Y, Fukushima K, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H, Krozowski ZS. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(4):1453-8.

Hirasawa N, Yashima K, Ishihara K. Enhancement of ligand-dependent down-regulation of glucocorticoid receptor by lipopolysaccharide. *Life Sci*. 2009;85(15-16):578-85.

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(6047):635-41.

Huang Y, Zhao JJ, Lv YY, Ding PS, Liu RY. Hypoxia down-regulates glucocorticoid receptor alpha and attenuates the anti-inflammatory actions of dexamethasone in human alveolar epithelial A549 cells. *Life Sci*. 2009;85(3-4):107-12.

Jain RN, Samuelson LC. Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(5):G762-5.

Jamieson PM, Chapman KE, Seckl JR. Tissue- and temporal-specific regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by glucocorticoids in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;68(5-6):245-50.

Johnson LR. Functional development of the stomach. *Annu 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 variant. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(1):109-13.

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(10):2081-7.

Kato K, Sasano H, Ohara S, Sekine H, Mochizuki S, Mune T, Yasuda K, Nagura H, Shimosegawa T, Toyota T, Krozowski Z. Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in human gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2568-73.

Keeley TM, Samuelson LC. Cytodifferentiation of the postnatal mouse stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(6):G1241-51.

Khedr EM, Farghaly WM, Amry Sel-D, Osman AA. Neural maturation of breastfed and formula-fed infants. *Acta Paediatr*. 2004;93(6):734-8.

Khurana S, Mills JC. The gastric mucosa development and differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;96:93-115.

Kikusui T, Nakamura K, Kakuma Y, Mori Y. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res*. 2006;175(1):96-103

Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(5):762-72.

Kitchener P, Di Blasi F, Borrelli E, Piazza PV. Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur J Neurosci*. 2004;19(7):1837-46.

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. Response of the gastrointestinal tract to premature weaning in experimental animals. *Pediatrics*. 1985;75(1 Pt 2):199-206.

Koldovský O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J Nutr*. 1989;119(11):1543-51.

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

Korn SH, Wouters EF, Wesseling G, Arends JW, Thunnissen FB. In vitro and in vivo modulation of alpha- and beta-glucocorticoid-receptor mRNA in human bronchial epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(3):1117-22.

Lackeyram D, Yang C, Archbold T, Swanson KC, Fan MZ. Early weaning reduces small intestinal alkaline phosphatase expression in pigs. *J Nutr*. 2010;140(3):461-8. .

Lee PC, Lebenthal E. Early weanling and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. *Pediatr Res*. 1983;17(8):645-50.

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(3):187-207.

Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol*. 1991;24(8):547-58.

Lien HC, Lu YS, Shun CT, Yao YT, Chang WC, Cheng AL. Differential expression of glucocorticoid receptor in carcinomas of the human digestive system. *Histopathology*. 2008;52(3):314-24.

Lima N da S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic

syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2011;105(9):1405-13.

Lin CH, Correia L, Tolia K, Gesell MS, Tolia V, Lee PC, Luk GD. Early weaning induces jejunal ornithine decarboxylase and cell proliferation in neonatal rats. *J Nutr.* 1998;128(10):1636-42.

Lin CH, Lyons H, Seelbach MS, Tolia V, Vijesurier R. Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. *Digestion.* 2001;63(4):214-9.

Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoformas generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* 2006;16(6):301-7.

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(2):687-94.

Makena N, Bugarith K, Russell VA. Maternal separation enhances object location memory and prevents exercise-induced MAPK/ERK signalling in adult Sprague-Dawley rats. *Metab Brain Dis.* 2012

McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2074-91.

Mickelson KE, Westphal U. Steroid-protein interactions. Influence of steroid structure and temperature on the binding of steroids to guinea pig corticosteroid-binding globulin. *Biochemistry.* 1980;19(3):585-90.

Ministério Da Saúde. 10 passos para uma alimentação saudável. Guia alimentar para crianças menores de 2 anos. Brasília – DF; 2002.

Ministério da Saúde. II Pesquisa de Prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal. Brasília – DF; 2009.

Miyata T, Minai Y, Haga M. Impaired growth of small intestinal epithelium by adrenalectomy in weaning rats. *Acta Histochem Cytochem.* 2008;41(4):83-8.

Munck A, Brinck-Johnsen T. Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro. *J Biol Chem.* 1968;243(21):5556-65.

Myers B, Greenwood-Van Meerveld B. Differential involvement of amygdala corticosteroid receptors in visceral hyperalgesia following acute or repeated stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302(2):G260-6.

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(3):221-32.

Nishi M, Kawata M. Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist*. 2006;12(2):119-33.

Noguchi T, Makino S, Matsumoto R, Nakayama S, Nishiyama M, Terada Y, Hashimoto K. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 2010;151(9):4344-55

Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*. 2011;286(5):3177-84.

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 weanling rats. *Nutrition*. 2010a;26(2):224-9.

Ogias D, de Andrade Sá ER, Kasai A, Moisan MP, Alvares EP, Gama P. Fasting differentially regulates plasma corticosterone-binding globulin, glucocorticoid receptor, and cell cycle in the gastric mucosa of pups and adult rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010b;298(1):G117-25.

Oliveira L dos S, da Silva LP, da Silva AI, Magalhães CP, de Souza SL, de Castro RM. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behav Processes*. 2011;86(1):119-24.

Osaki LH, Curi MA, Alvares EP, Gama P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGF α /EGFR. *Differentiation*. 2010;79(1):48-56.

Osaki LH, Figueiredo PM, Alvares EP, Gama P. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. *Cell Prolif*. 2011;44(2):174-82.

Penttilä IA, van Spriel 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(4):524-31.

Petrelli MD, Lim-Tio SS, Condon J, Hewison M, Stewart PM. Differential expression of nuclear 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mineralocorticoid receptor positive and negative tissues. *Endocrinology*. 1997;138(7):3077-80.

Petri MK, Lee PC. Effects of dexamethasone on antral mucosal protein and gastric development in postnatal rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(4):461-6.

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*. 2004;40:41-58.

Qi M, Hamilton BJ, DeFranco D. v-mos oncoproteins affect the nuclear retention and reutilization of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*. 1989;3(8):1279-88.

Reichardt SD, Föller M, Rexhepaj R, Pathare G, Minnich K, Tuckermann JP, Lang F, Reichardt HM. Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes. *Endocrinology*. 2012;153(4):1783-94.

Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179:167-78.

Rosene DL, Lister JP, Schwagerl AL, Tonkiss J, McCormick CM, Galler JR. Prenatal protein malnutrition in rats alters the c-Fos response of neurons in the anterior cingulate and medial prefrontal region to behavioral stress. *Nutr Neurosci*. 2004;7(5-6):281-9.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*. 1984;114(1):287-92.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res*. 1986;396(1):64-76.

Sato S, Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. *Life Sci*. 2011;89(25-26):962-7.

Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;83(1-5):37-48.

Schmidt M, Okimoto DK, Dent GW, Gordon MK, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the 20-day-old rat: consequences of laboratory weaning. *J Neuroendocrinol*. 2002a;14(6):450-7.

Schmidt MV, Oitzl MS, Levine S, de Kloet ER. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002b;139(1):39-49.

Schubert ML. Gastric exocrine and endocrine secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(6):529-36.

Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, Warth R, Goldschmidt I, Peters J, Schütz G, Greger R, Bleich M. Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflugers Arch*. 2001;443(2):297-305.

Schwarz EB, Ray RM, Stuebe AM, Allison MA, Ness RB, Freiberg MS, Cauley JA. Duration of lactation and risk factors for maternal cardiovascular disease. *Obstet Gynecol*. 2009;113(5):974-82.

Seckl JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. Glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int*. 2000;57(4):1412-7.

- Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.* 2004;151 Suppl 3:U49-62.
- Sheppard KE, Autelitano DJ. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart. *Endocrinology.* 2002;143(1):198-204.
- Sheppard KE, Li KX, Autelitano DJ. Corticosteroid receptors and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in rat intestinal epithelia. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 1):G541-7.
- Silva CM, Powell-Oliver FE, Jewell CM, Sar M, Allgood VE, Cidlowski JA. Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids.* 1994;59(7):436-42.
- Silva EJ, Queirz DB, Honda L, Avellar MC. Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;325(1-2):64-77.
- Smith F, Clark JE, Overman BL, Tozel CC, Huang JH, Rivier JE, Blikslager AT, Moeser AJ. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(3):G352-63.
- 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.
- Soleimani AF, Zulkifli I, Omar AR, Raha AR. Neonatal feed restriction modulates circulating levels of corticosterone and expression of glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 in aged Japanese quail exposed to acute heat stress. *Poult Sci.* 2011;90(7):1427-34.
- Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron.* 2009;15;64(1):33-9 Speirs et al., 2004
- Speirs HJ, Seckl JR, Brown RW. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *J Endocrinol.* 2004;181(1):105-16.
- Spencer RL, Miller AH, Moday H, McEwen BS, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR. Chronic social stress produces reductions in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology.* 1996;21(1):95-109.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993;75(2):185-92.
- Suzuki T, Douard V, Mochizuki K, Goda T, Ferraris RP. Diet-induced epigenetic regulation in vivo of the intestinal fructose transporter Glut5 during development of rat small intestine. *Biochem J.* 2011;435(1):43-53.

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(1):75-8.

Tanaka T, Kobayashi T, Sunaga K, Tani S. Effect of glucocorticoid on expression of rat MUC5AC mRNA in rat gastric mucosa in vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(6):634-7.

Tseng CC, Johnson LR. Does corticosterone affect gastric mucosal cell growth during development? *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 1):G633-8.

Tsukada S, Ichinose M, Yahagi N, Matsubara Y, Yonezawa S, Shiokawa K, Furihata C, Miki K, Fukamachi 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(5):239-47.

Tucker HA, Schwalm JW. Glucocorticoids in mammary tissue and milk. *J Anim Sci.* 1977;45(3):627-34.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(6):397-409.

van der Laan S, Meijer OC. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol.* 2008 13;585(2-3):483-91.

Vreugdenhil E, Verissimo CS, Mariman R, Kamphorst JT, Barbosa JS, Zweers T, Champagne DL, Schouten T, Meijer OC, de Kloet ER, Fitzsimons CP. MicroRNA 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: implications for glucocorticoid responsiveness in the brain. *Endocrinology.* 2009;150(5):2220-8

Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S3-7.

Wallace AD, Cao Y, Chandramouleeswaran S, Cidlowski JA. Lysine 419 targets human glucocorticoid receptor for proteasomal degradation. *Steroids.* 2010;75(12):1016-23.

Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2001;276(46):42714-21.

Wang L, Jiao J, Dulawa SC. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;216(2):207-18.

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

Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9287-93.

World Health Organization. Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. Geneva, Switzerland; 2002a. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241562110.pdf>. [2012 May 10].

World Health Organization. The optimal duration of exclusive breastfeeding – a systematic review. Geneva, Switzerland; 2002b. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.08.pdf. [2012 May 10].

World Health Organization. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. Geneva, Switzerland; 2007. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241595230_eng.pdf. [2012 May 10].

Wu CW, Wang SR, Chang TJ, Lin EC, Chang KL, Huang MH, Lui WY, P'eng FK, Chi CW. Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. *Cancer*. 1989;64(12):2552-6.

Xu RJ. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(1):35-48.

Yaktine AL, Vaughn R, Blackwood D, Duysen E, Birt DF. Dietary energy restriction in the SENCAR mouse: elevation of glucocorticoid hormone levels but no change in distribution of glucocorticoid receptor in epidermal cells. *Mol Carcinog*. 1998;21(1):62-9.

Yeh KY. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallel changes after induced stress. *Endocrinology*. 1984;115(4):1364-70.

Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*. 2002;16(8):1719-26.

Zennaro MC, Farman N, Bonvalet JP, Lombès M. Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1345-52.

Zhang L, Hernández VS, Liu B, Medina MP, Nava-Kopp AT, Irles C, Morales M. Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: Its impact on anxiety in rats. *Neuroscience*. 2012;215:135-48.

Zhe D, Fang H, Yuxiu S. Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta Histochem Cytochem*. 2008;41(4):89-95.