PRISCILA MOREIRA FIGUEIREDO

**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 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
2010

PRISCILA MOREIRA FIGUEIREDO

**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 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: Profa. Dra. Patrícia Gama

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Figueiredo, Priscila Moreira.

Papel da interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento na regulação da proliferação celular do epitélio gástrico de ratos em desenvolvimento pós-natal / Priscila Moreira Figueiredo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: 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 Digestivo

Versão do título para o inglês: Role of the interaction among diet pattern, corticosterone and growth factor on the regulation of cell proliferation in gastric epithelium of developing rats.

Descritores: 1. Corticosterona 2. Fatores de crescimento 3. Estômago 4. Proliferação celular 5. Desenvolvimento pós-natal 6. Ratos I. Gama, Patrícia II. Universidade de São Paulo. Instituto de ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0210/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Moreira Figueiredo.

Título da Dissertação: Papel da interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento na regulação da proliferação celular do epitélio gástrico de ratos em desenvolvimento pós-natal .

Orientador(a): 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. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 86 nas fls. 60 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Patrícia Gama, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Mecanismo de regulação do crescimento gástrico: interação entre padrão alimentar, corticosterona e fatores de crescimento"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Priscila Moreira Figueiredo, Marco Aurélio Fauni Curi, Daniela Ogias, Luciana Harumi Osaka** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa) em **18.09.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 19 de setembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Núcleo de Radioproteção

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que PRISCILA MOREIRA FIGUEIREDO foi aprovado no Curso de Proteção Radiológica, promovido pelo Núcleo de Radioproteção do ICB/USP, no período de 14/07 a 18/07/2008 com carga horária de 15 horas.

São Paulo, 11 de Agosto de 2008.

Prof. Dr. BENY SPIRA

NUCLEO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
que não mediram esforços para a minha formação,
e ao meu irmão e amigo, pelo carinho e incentivo.*

*Obrigada pela compreensão, cumplicidade,
apoio e amor irrestritos.*

Vocês são a minha maior conquista!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora, Dra. Patrícia Gama, atribuo o mérito desta conquista e agradeço imensamente a sua dedicada orientação, com qualidades que vão além da esfera profissional. Você é um exemplo não apenas de docente e pesquisadora competentes, mas também de uma pessoa sensível, atenciosa e carinhosa com todos aqueles que a cercam.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, essencial para a condução deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana Parisi Alvares, que apesar do pouco convívio, transmitiu valiosos ensinamentos, que contribuíram para a minha formação.

À Profa. Dra. Estela M. Bevilacqua, pela gentileza em permitir o livre acesso ao seu laboratório e o uso de equipamentos.

À Profa. Dra. Maria Inês Borella, pelas preciosas dicas em práticas de ensino e por disponibilizar tão gentilmente os equipamentos de seu laboratório.

À Profa. Alison Colquhoun e ao Prof. Ruy G. Jaeger, pelas sugestões e observações feitas durante o exame de qualificação, que despertaram valiosas e excitantes discussões dentro do nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof. Angelo Rafael Carpinelli, pela disponibilização das dependências de seu laboratório e equipamentos, e à Marlene dos Santos da Rocha pelo apoio técnico na realização dos experimentos de radioimunoensaio.

À Luciana, minha querida e eterna co-orientadora de bondade e atenção desmedidas, por todos os ensinamentos, ajuda e amizade.

À Natália, que, com sua singular delicadeza e carinho, me ajudou e me confortou em momentos difíceis desta jornada.

À Heloísa, pelo amparo e sempre boa companhia, preenchendo as longas horas passadas no laboratório com boas risadas e brincadeiras.

À Juliana, pela generosidade e carinho. É muito bom tê-la conosco!

Às minhas queridas amigas Ariane, Eunice e Daniela, pelos ensinamentos e ajuda nas etapas iniciais desse projeto. E aos meus colegas de iniciação científica: Larissa, Marco e Maria Helena. Vocês deixaram muita saudade!

Ao Cruz Alberto Mendoza Rigonati (Junior), pelo suporte técnico, essencial para a concretização desse trabalho.

Ao Daniel, que me inspira e me completa. Seu incentivo e apoio constantes foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Às minhas amigas de graduação, Aline e Estela, que mesmo com as minhas frequentes ausências nunca se esqueceram de mim.

Aos meus colegas de pós-graduação, com quem compartilhei as angústias e alegrias deste caminho.

Às secretárias do departamento, Celiana, Eloise, Beth e Ana Lúcia, pela atenção que sempre me dedicaram quando precisei.

Aos funcionários do biotério, Fernando, Cláudio, Marley e Braz, pelo carinho e cuidado com que tratam os nossos animais.

Aos funcionários da biblioteca, pela atenção, simpatia e presteza com as quais sempre me atenderam na busca de artigos e livros, e na formatação dessa dissertação.

RESUMO

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. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O leite materno constitui uma rica fonte de nutrientes e peptídeos reguladores biologicamente ativos, incluindo hormônios, anticorpos e fatores de crescimento. O desmame precoce (DP), caracterizado pela retirada antecipada do leite materno, leva a alterações no crescimento e desenvolvimento do estômago, como o aumento da proliferação celular no epitélio gástrico. A corticosterona é o hormônio produzido durante o estresse, e pode ter papel no controle dessas mudanças diretamente ou indiretamente, através da modulação da atividade de fatores de crescimento. No presente estudo, investigamos a interação entre o padrão alimentar, a corticosterona e os fatores de crescimento na regulação da proliferação celular na mucosa gástrica durante o desenvolvimento pós-natal. Avaliamos inicialmente as variações diárias dos níveis plasmáticos do hormônio ao longo do desmame precoce por RIA, e então analisamos o papel da corticosterona sobre a proliferação celular e a expressão de TGF α /EGFR, TGF β 1 e TGF β 3. Para tanto, utilizamos o antagonista do receptor de glicocorticoides RU486, e após tratamento examinamos a imunomarcação para BrdU, o índice mitótico e os níveis proteicos dos fatores de crescimento por “*Western blot*”. Por último, estudamos a influência da corticosterona sobre a ativação da sinalização intracelular de TGF α e TGF β . Ratos da linhagem Wistar foram separados em 4 grupos experimentais no 15º dia de vida pós-natal: amamentados (A), amamentados tratados com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). O desmame precoce elevou os níveis de corticosterona nos dias 16, 17 e 18, aumentou a concentração de TGF α e reduziu a de TGF β 1 no epitélio gástrico ($p < 0,05$). O tratamento com RU486 estimulou a proliferação celular gástrica em animais amamentados e submetidos ao desmame precoce ($p < 0,05$), no entanto não alterou os níveis proteicos de TGF α /EGFR, TGF β 1 e TGF β 3. Com relação à sinalização dos fatores de crescimento, observamos que a administração de RU486 reduziu a fosforilação de ERK1/2 nos animais desmamados precocemente ($p < 0,05$), sugerindo a participação da corticosterona liberada durante o estresse do desmame precoce na ativação dessa via. No entanto,

o tratamento não modificou os níveis de Smad2 fosforilada. Concluímos que a corticosterona circulante possui efeito antiproliferativo sobre a mucosa gástrica de ratos, independente do tipo de dieta consumida. Contudo, sua ação parece não ocorrer por meio da regulação dos níveis de TGF α e TGF β , que estão subordinados à dieta. Portanto, sugerimos que o efeito da corticosterona sobre a proliferação celular do epitélio gástrico durante o desenvolvimento pós-natal pode estar mais relacionado à sua função direta, dependente de disponibilidade e sensibilidade.

Palavras-chave: Estômago. Corticosterona. Fatores de crescimento. Desenvolvimento pós-natal. Estresse.

ABSTRACT

Figueiredo PM. Role of the interaction among diet pattern, corticosterone, and growth factors on the regulation of cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Milk is a source of nutrients and biologically active regulatory peptides, including hormones, antibodies and growth factors. Early weaning (EW), characterized by anticipated interruption of suckling, leads to alterations in growth and development of stomach, as increased cell proliferation in gastric mucosa. Corticosterone is the hormone produced during stress and it can have a role in the control of these changes directly or indirectly through the regulation of growth factors. In the present study we investigated the interaction among diet pattern, corticosterone, and growth factors on the regulation of cell proliferation in gastric mucosa. We first evaluated daily variations on hormone levels throughout early weaning by RIA, and then we analyzed corticosterone role on gastric cell proliferation and TGF α /EGFR, TGF β 1, and TGF β 3 expression. To that we used the antagonist of glucocorticoid receptor RU486, and after treatment we examined BrdU immunolabeling, mitotic index and the transforming growth factors levels by Western blot. At last, we studied corticosterone influence on TGF α and TGF β signaling pathways activation. Wistar rats were separated into four groups on the 15th postnatal d: suckling (S), suckling treated with RU486 (SRU), early weaning (EW) and early weaning treated with RU486 (EWRU). Early weaning increased total corticosterone levels at 16, 17 and 18 days, augmented TGF α protein levels and decreased TGF β 1 concentration in gastric epithelium ($P < 0.05$). RU486 administration stimulated gastric cell proliferation in suckling and early-weaned animals ($P < 0.05$), but it did not change TGF α /EGFR, TGF β 1, and TGF β 3 expression. As for growth factors pathways, we observed that RU486 administration reduced ERK1/2 phosphorylation in early-weaned rats ($P < 0.05$), suggesting that corticosterone released during early weaning stress takes part in the activation of this signaling pathway. In contrast, treatment did not modify Smad2P protein levels. We conclude that circulating corticosterone has an antiproliferative effect on gastric mucosa in both dietary patterns. However, its mechanism of action might not involve the regulation of TGF α and TGF β , which are subordinated to the diet. Therefore, we suggest that the function of corticosterone in

the gastric epithelium of rats during postnatal development might be more correlated to a direct role, which in turn depends on availability and sensitivity.

Key Words: Stomach. Corticosterone. Growth factors. Postnatal development. Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos mecanismos de ação do GR	26
Figura 2. Esquema das vias de sinalização ativadas pelo EGFR.....	32
Figura 3. Esquema da via das Smads.....	35
Figura 4. Esquema da hipótese do estudo	38
Figura 5. Esquema dos pontos de coleta de amostras.....	47
Figura 6. Massa corpórea dos grupos experimentais.....	49
Figura 7. Concentração plasmática de corticosterona.....	51
Figura 8. Avaliação da proliferação celular após tratamento com RU486	54
Figura 9. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF α	57
Figura 10. Expressão de EGFR na mucosa gástrica.....	59
Figura 11. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF β 1	61
Figura 12. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF β 3	63
Figura 13. Efeito do RU486 sobre a ativação de ERK1/2.....	65
Figura 14. Efeito do RU486 sobre a ativação de Smad2.....	66
Figura 15. Esquema dos resultados obtidos nesse estudo	75
Figura 16. Proposta de vias de regulação da proliferação celular do epitélio gástrico durante o desmame precoce.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados para “ <i>immunoblot</i> ”	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AG1478	Tirfostina 4-(3-cloroanilino)-6,7-, quinazolina altamente seletiva para o EGFR
Akt	ou PKB, “Protein Kinase” B
AP-1	“Activator Protein” 1
Bcl-2	“B-Cell Lymphoma” 2
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	“Bovine Serum Albumine”
CBG	“Corticosterone Binding Globulin”
cdk4	“Cyclin-Dependent Kinase” 4
c-myc	fator de transcrição oncogênico
DAB	3,3´tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina
ECL	“Enterochromaffin-Like Cells”
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ERKs	“Extracellular Signal-Regulated Kinases”
FGFb	“Basic Fibroblast Growth Factor”
FoxG1	“Forkhead box protein G1”
GH	“Growth Hormone”
GR	“Glucocorticoid Receptor”
Grb2	“Growth Factor Receptor-Bound Protein” 2
GRE	“Glucocorticoid Responsive Element”

Hsp	“Heat Shock Protein”
I ¹²⁵	radioisótopo do iodo
IEC-18	Linhagem celular não transformada, proveniente de intestino de rato
IGF-I	“Insulin-Like Growth Factor” I
IM	Índice Mitótico
IOD	“Integrated optical densitometry”
IS	Índice de síntese de DNA
JAK2	“Janus Activating Kinase” 2
LAP	“Latency-Associated Protein”
LHRH	“Luteinizing Hormone- Releasing Hormone”
LTBP	“Latent Transforming Growth Factor β Binding Protein”
MAPK	“Mitogen-Activated Kinases”
NF κ B	“Nuclear Factor-KappaB”
ODC	“Ornithine decarboxylase”
PBS	“Phosphate-buffered saline”
PI3K	“Phosphoinositide 3-kinase”
PMSF	“Phenylmethanesulfonylfluoride”
Raf	Serina/Treonina quinase
Ras	Proteína G de baixo peso molecular
RU486	ou mifepristona, derivado de 11 β -dimetil-amino-fenil da noretindrona, com alta afinidade por GR
Smad	“Sma Mad Related Protein”
Smurf	“Smad Ubiquitination Regulatory Factor Protein”
Sos	“Son of sevenless homolog”

Src	Tirosina quinase de membrana
STAT	“Signal Transducers and Activators of Transcription Protein”
TBS	“Tris-buffered saline”
TFE3	“Transcription factor E3”
TGF	“Transforming Growth Factor”
TRH	“Thyrotropin-releasing hormone”
TSH	“Thyroid-stimulating hormone”
TTBS	Tween 20 0,1% em TBS 0,02 M
TβR	“Transforming Growth Factor Beta Receptor”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Estômago	22
1.2 Desmame precoce.....	24
1.3 Corticosterona.....	25
1.4 Mifepristona	29
1.5 Fator de crescimento transformante α (TGFα) e receptor do fator de crescimento epidermal	30
1.6 Fator de crescimento transformante β (TGFβ)	33
1.7 Interação entre padrão alimentar, glicocorticoides e fatores de crescimento ...	36
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Desmame precoce.....	40
4.2 Tratamento com RU486	40
4.3 Coleta de material	41
<i>4.3.1 Coleta de sangue para dosagem de corticosterona total</i>	<i>41</i>
<i>4.3.2 Coleta de estômago para imuno-histoquímica e coloração em HE.....</i>	<i>42</i>
<i>4.3.3 Coleta da mucosa gástrica para “Western blot”</i>	<i>42</i>
4.4 Ensaio para dosagem de corticosterona plasmática	42
4.5 Índices proliferativos	43
<i>4.5.1 Imuno-histoquímica para BrdU e determinação do índice de síntese de DNA (IS). 43</i>	
<i>4.5.2 Índice mitótico (IM)</i>	<i>44</i>
4.6 Imuno-histoquímica para EGFR.....	44
4.7 “Western blot”	45
<i>4.7.1 “Immunoblot”</i>	<i>46</i>

4.8 Resumo dos procedimentos	47
4.9. Análise estatística	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Animais	49
5.2 Efeito do desmame precoce sobre os níveis plasmáticos de corticosterona	51
5.3 Efeito da corticosterona sobre a proliferação celular da mucosa gástrica .	52
5.4 Papel da corticosterona na regulação da expressão protéica de fatores de crescimento na mucosa gástrica.....	55
<i>5.4.1 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGFα</i>	<i>56</i>
<i>5.4.2 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos e distribuição de EGFR</i>	<i>58</i>
<i>5.4.3 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGFβ1</i>	<i>60</i>
<i>5.4.4 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGFβ3</i>	<i>62</i>
5.5 Papel da corticosterona na ativação das vias de sinalização de TGFα/EGFR e TGFβ.....	64
<i>5.5.1 Efeito da corticosterona sobre a via de sinalização intracelular de TGFα</i>	<i>65</i>
<i>5.5.1 Efeito da corticosterona sobre a via de sinalização intracelular de TGFβ</i>	<i>66</i>
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estômago

O estômago é uma dilatação do tubo digestório, em forma de saco, situado entre o esôfago e o intestino delgado. Nos ratos, o estômago apresenta-se estruturado em três regiões histologicamente distintas denominadas córnea, corpo e antro. A porção córnea tem epitélio estratificado e queratinizado, enquanto corpo e antro correspondem às duas regiões glandulares da mucosa gástrica (Lee et al., 1982).

O corpo, região mediana do estômago, apresenta uma mucosa espessa formada por longas glândulas tubulares que se abrem em pequenas fossetas, através das quais os produtos de secreção chegam à luz gástrica. Cada unidade glandular pode ser subdividida em três segmentos: istmo, colo e base, os quais são compostos por diferentes populações celulares. O istmo, porção adjacente à fosseta, é formado principalmente por células parietais, responsáveis pela secreção de íons cloro e hidrogênio que, combinados no lúmen gástrico, originam o ácido clorídrico. A região do colo apresenta, além de células parietais, células mucosas do colo que produzem, junto com as células mucosas superficiais que revestem as fossetas e a superfície luminal, muco para a proteção do tecido. Restritas à base glandular, estão as células zimogênicas, secretoras de pepsinogênio, o qual é convertido em pepsina na luz do estômago pela ação do pH ácido (Ekelund et al., 1985; Helander, 1981). Além das células epiteliais supracitadas, ainda estão presentes células enteroendócrinas, produtoras de hormônios como a gastrina, somatostatina, histamina, leptina e ghrelina (Bado et al., 1998; Björkqvist et al., 2002; Date et al., 2000; Johnson, 1985).

Ao contrário do corpo gástrico, a região do antro possui glândulas curtas e enoveladas, com fossetas muito profundas, compostas predominantemente por células mucosas e enteroendócrinas (Helander, 1981).

A formação e a maturação das glândulas gástricas no rato são processos tardios, que ocorrem a partir do final da fase fetal até a terceira semana de vida pós-natal, quando advém o desmame. Fetos de 17 dias ainda apresentam o corpo gástrico formado por um epitélio pseudo-estratificado, constituído por um único tipo celular. Apenas entre o 19º e 20º dia de vida intra-uterina, ocorre a reorganização do

epitélio, que se torna simples e colunar, e tem-se início seu dobramento, o qual culmina com a formação das fossetas e glândulas gástricas (Alvares, 1994).

O completo amadurecimento funcional das células epiteliais gástricas acontece apenas ao longo da terceira semana de vida pós-natal (Zhu et al., 2009), período no qual ocorre o desmame. As células do epitélio gástrico se originam de células-tronco, localizadas na interface istmo-colo da glândula (Brittan e Wright, 2004; Karam e Leblond, 1993). Essas células produzem três outros tipos celulares: células pré-mucosas, pré-parietais e pré-mucosas do colo. As células pré-mucosas migram em direção à fosseta e se diferenciam em células mucosas superficiais, enquanto as células pré-parietais apresentam migração bi-direcional e originam as células parietais, as quais estão dispersas por toda a extensão da glândula gástrica. As células pré-mucosas do colo produzem dois tipos celulares, as células mucosas do colo e as células zimogênicas. Inicialmente, as células progenitoras migram em direção ao colo da glândula, onde se diferenciam em células mucosas do colo, que por sua vez, continuam migrando em direção à base glandular e originam as células pré-zimogênicas e zimogênicas (Ramsey et al., 2007; Zhu et al., 2009).

O desenvolvimento da mucosa gástrica está subordinado à influência de diversos elementos, incluindo o programa genético, o estado nutricional, a dieta, a microbiota luminal, hormônios e fatores de crescimento (De Andrade Sá et al., 2008; Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al., 2005). Tais elementos interagem para controlar a proliferação e a diferenciação celular no epitélio gástrico, e garantir deste modo o crescimento adequado do órgão. Neste contexto, o leite materno possui papel preponderante, uma vez que provê ao filhote recém-nascido nutrientes e peptídeos biologicamente ativos, que incluem prolactina, somatostatina, insulina, hormônio estimulador e de liberação do hormônio tireoideano (TSH e TRH), hormônio de liberação do hormônio luteinizante (LHRH), bombesina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); fator de crescimento transformante β (TGF β), fator de crescimento epidermal (EGF), entre outros (Baram et al., 1977; Beardmore e Richards, 1983; Chen et al., 1999; Donovan e Odle, 1994; Jahnke e Lazarus, 1984; Koldovský, 1989; Koldovský et al., 1995; Letterio et al., 1994; Xu, 1996; Penttila et al., 1998; Shanks e Lightman, 2001).

1.2 Desmame precoce

O desmame representa um processo lento de substituição do aleitamento materno pela ingestão de alimento sólido (Henning, 1981), e ocorre naturalmente da terceira para a quarta semana de vida pós-natal do rato. Entretanto, para fins experimentais, o desmame é normalmente realizado no 21º dia de vida pós-natal em biotérios. Em contrapartida, o desmame precoce se caracteriza pela abrupta separação materna e retirada antecipada do leite e de todos os seus fatores no 15º dia. Tal condição, além de causar um forte estresse, provoca uma série de alterações nas funções digestivas, como o aumento prematuro da atividade da enzima sacarase-isomaltase no intestino delgado (Boyle e Koldovský, 1980), que reflete a mudança drástica tanto da composição da dieta, quanto da natureza dos carboidratos que constituem a ração (Lin et al., 1998). Outras implicações do desmame precoce sobre o intestino compreendem o aumento da permeabilidade da barreira (Moeser et al., 2007; Smith et al., 2010) e a redução da expressão da fosfatase alcalina, enzima-chave na diferenciação de enterócitos (Lackeyram et al., 2010).

No estômago, o desmame precoce altera a resposta proliferativa do epitélio gástrico ao estímulo do jejum. Filhotes submetidos ao desmame precoce respondem à privação alimentar com a inibição da proliferação celular (Gama e Alvares, 2000), resposta semelhante à de um animal adulto e oposta à de animais amamentados, nos quais ocorre um aumento da proliferação no epitélio gástrico (Alvares, 1992; Alvares e Gama, 1993). Em outras palavras, o desmame precoce promove a antecipação da resposta típica de um animal adulto frente ao jejum. Lin et al. (2001) verificaram que, sob essa condição alimentar, ocorre indução da atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) no estômago, a qual está envolvida na síntese e acúmulo de poliaminas, necessárias para o rápido crescimento celular. Esses autores sugeriram que o aumento da atividade da enzima ODC está associado ao crescimento da mucosa gástrica promovido pelo desmame precoce. Osaki et al. (2010) observaram ainda que essa condição desencadeia a diferenciação de células mucosas do colo e a síntese de componentes do muco, que asseguram proteção e adequada função do epitélio gástrico. Ademais, esses resultados demonstram que o desmame precoce induz maturação acelerada da mucosa gástrica, além de seus efeitos fisiológicos. Em conjunto, essas informações

evidenciam que a retirada antecipada do leite materno provoca mudanças no desenvolvimento normal do trato gastrointestinal da prole, alterando sua morfologia e função, e sugerem que o leite por meio de suas moléculas possua papel modulador do crescimento e da renovação da mucosa gástrica e intestinal (De Andrade Sá et al., 2008; Osaki et al., 2010).

De acordo com alguns grupos, os efeitos desencadeados pelo desmame precoce no trato gastrointestinal podem estar relacionados a um aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides (Boyle e Koldovský, 1980; Lin et al., 1998; Peitsch et al., 1981; Takeushi et al., 1981; Yeh et al., 1986), sugerindo a existência de um elo entre o tipo de dieta, a condição alimentar, o comportamento e o estresse.

1.3 Corticosterona

Os glicocorticoides são hormônios esteroidais, produzidos e secretados pelo córtex da glândula supra-renal. Suas funções no organismo incluem a mediação de diversos efeitos fisiológicos e a adaptação a situações de estresse. Por sua ação sobre o sistema imunológico, os glicocorticoides são amplamente utilizados como anti-inflamatórios e imunossupressores no tratamento de reações alérgicas e doenças auto-imunes. Endogenamente, os níveis circulantes são regulados por diversos fatores, tais como: a concentração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que induz a liberação de corticosteróide; a disponibilidade e afinidade por sua proteína carreadora, a globulina ligante de corticosterona (CBG), e a ligação aos receptores de glicocorticoides (GR) (Breuner e Orchinik, 2002; Fleshner et al., 1995; Woodward et al., 1991; Yudt e Cidlowski, 2002).

Nos ratos, o principal glicocorticoide é a corticosterona, cujos níveis plasmáticos sofrem acentuadas alterações ao longo do desenvolvimento. Durante a fase pré-natal, ocorre o primeiro pico de secreção hormonal, entre o 18º e 20º dia de vida fetal, antecedendo o término da gestação (Holt e Oliver, 1968). Após o nascimento, há um aumento gradual da concentração plasmática de corticosterona entre o 14º e 24º dia de vida pós-natal, em paralelo ao complexo quadro de maturação do animal (Henning, 1978). Por seu perfil de secreção, os glicocorticoides são considerados potenciais reguladores do processo de crescimento do animal (Tseng e Johnson, 1986).

Os efeitos biológicos da corticosterona são mediados pelo GR, um membro da superfamília de receptores esteroidais intracelulares que atuam como fatores de transcrição mediados por ligante (Akritopoulou-Zanze, 2004). No estômago, o GR está preferencialmente localizado no istmo e na base das glândulas gástricas, e encontra-se distribuído pelo citoplasma e núcleo das células epiteliais (Ogias et al., 2010b). Na ausência do ligante, o GR encontra-se em estado inativo no citoplasma, associado a um complexo multiproteico formado pelas chaperonas *heat shock* 70 e 90 (Hsp70 e Hsp90). A ligação do glicocorticoide ao GR promove dissociação do complexo e ativação do receptor, que se transloca para o núcleo, onde regula a transcrição de genes-alvo. O GR é capaz de modular a expressão gênica por pelo menos dois mecanismos distintos. A via clássica envolve a dimerização de dois receptores ativos, que após translocação para o núcleo, se associam a seqüências específicas de DNA, denominadas GREs (elementos responsivos aos glicocorticoides), e que estão presentes na região promotora dos genes-alvo (Figura 1). O outro mecanismo de ação do GR é independente de GRE. Nesse caso, o receptor sob a forma de um monômero interage com outros fatores de transcrição ligados ao DNA, como AP-1 e NF- κ B, regulando a transcrição gênica indiretamente (Akritopoulou-Zanze et al., 2004; Li et al., 2003) (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrando os mecanismos de ação do GR
Fonte: Bittencourt (2010).

No estômago, a administração de glicocorticoides induz a diferenciação de células zimogênicas, levando à síntese precoce de pepsinogênio (Kumegawa et al., 1978; Tseng e Johnson, 1986; Tsukada et al., 1998). A ação hormonal também promove alterações morfológicas nas células parietais e o estímulo à atividade da bomba $H^+K^+/ATPase$, aumentando a secreção ácida (Tseng et al., 1987 ; Wang et al., 1996). Em ratos adultos, foi observado que os glicocorticoides reduzem a migração celular e retardam a regeneração da mucosa gástrica após lesão (Eastwood et al., 1981; Kuwayama e Eastwood, 1988).

Gunin e Nikolaev (1999) demonstraram que o tratamento crônico com glicocorticoides induz aumento na proliferação celular no esôfago e intestino delgado. Miyata et al. (2008) confirmaram esse efeito no epitélio intestinal ao mostrarem que a adrenalectomia provoca diminuição na proliferação celular nas criptas e retardo do crescimento intestinal. Não obstante, Gama e Alvares (1998) e Gama et al. (2000) observaram que os glicocorticoides tem efeito contrário sobre a proliferação celular no estômago, e demonstraram que a administração de hidro cortisona a animais em fase de amamentação reduz a taxa proliferativa e induz a apoptose na mucosa gástrica. No entanto, o jejum, condição que representa a privação de alimento e promove aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, desencadeia efeito estimulatório sobre a proliferação celular do epitélio gástrico somente durante o período de amamentação (Alvares e Gama, 1993). Essa aparente contradição da ação dos glicocorticoides sobre a cinética celular na mucosa gástrica traz à luz as diferenças entre a administração hormonal e o aumento dos níveis endógenos de corticosterona desencadeado pelo estresse.

A atividade da corticosterona é modulada pela CBG, uma glicoproteína carreadora de 52 kDa. A CBG se liga à corticosterona com alta afinidade e regula a sua disponibilidade aos tecidos, comportando-se como um agente tamponador, uma vez que apenas a fração livre de corticosterona, não-ligada à CBG, é biologicamente ativa. Por outro lado, a CBG pode também atuar como um reservatório de corticosterona no plasma, e ainda direcionar a ação hormonal a um tipo celular específico por meio dos receptores de CBG (Breuner e Orchinik, 2002; Lewis et al., 2005). Entretanto, após a administração, os glicocorticoides esquivam-se dessa modulação e devido à alta concentração de hormônio livre no plasma, eles podem ser mais eficazes, quando se considera o tratamento de doenças inflamatórias, porém se tornam potencialmente deletérios para muitos tecidos.

Ogias et al. (2010b) demonstraram que o estresse induzido pelo jejum ativa diferentes mecanismos de ação da corticosterona em filhotes e ratos adultos. Embora ocorra aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em ambas as idades, apenas nos filhotes esse efeito é acompanhado por uma elevação da capacidade de ligação da CBG e, consequente redução da disponibilidade de corticosterona aos tecidos. Além disso, ocorre também menor translocação de GR ao núcleo, levando a uma redução da resposta ao hormônio. Por outro lado, nos adultos, a maior disponibilidade e atividade da corticosterona levam à inibição da proliferação celular no epitélio gástrico. Esse mecanismo de controle da disponibilidade da corticosterona contribui para a elucidação da razão pela qual o jejum promove efeitos opostos sobre a proliferação celular na mucosa gástrica de acordo com a fase de desenvolvimento do animal. Assim, pode-se dizer que nos filhotes, a ação da corticosterona induzida pelo estresse fica “bloqueada”, o que permite o crescimento do estômago mesmo durante condições nutricionais adversas.

A adrenalectomia, por sua vez, leva tanto ao estímulo da proliferação celular na mucosa gástrica em ratos adultos, quanto à supressão da expressão de catepsina E e mucina, consideradas marcadoras da diferenciação do estômago. Entretanto, a administração de hidrocortisona é capaz de restaurar esses dois parâmetros, reforçando o papel dos glicocorticoides como reguladores morfofuncionais do estômago (Tsukada et al., 1994).

Filaretova et al. (2007) observaram que o aumento plasmático de glicocorticoides induzido pelo estresse promove ação protetora sobre o epitélio gástrico, contrariamente ao que era proposto. Tais efeitos são mediados por múltiplas ações, incluindo a manutenção do fluxo sangüíneo, produção de muco e atenuação da motilidade e permeabilidade da mucosa gástrica. Em contrapartida, os glicocorticoides de origem exógena, administrados em doses farmacológicas, apresentam um alto potencial ulcerativo.

Desse modo, diferentes estudos discutem o papel dos glicocorticoides e sua função em relação à sua origem, se exógena ou endógena. Quanto à sua ação, a corticosterona pode atuar sobre a mucosa gástrica de forma direta, por meio do GR, como mencionado, ou indiretamente, via fatores de crescimento.

1.4 Mifepristona

A mifepristona (RU486) é um esteroide análogo, desenvolvido pela companhia farmacêutica francesa Roussel-Uclaf (Romainville, França), em meados de 1980, como parte de um projeto de pesquisa para a concepção de compostos antiglicocorticoides (Johanssen e Allolio, 2007; Mahajan e London, 1997). Secundariamente, descobriu-se que o RU486 também possuía uma ação antiprogestágena, e sua combinação com prostaglandina, como o sintético misoprostol, resulta em aborto a uma taxa de sucesso próxima a 100%. A mifepristona apresenta três principais efeitos farmacológicos: o endometrial, o gonadotrófico e o adrenocortical. Por seu amplo potencial, pesquisadores têm testado a aplicação do RU486 no tratamento de outros casos clínicos, como o câncer de mama e próstata, endometriose, leiomiomatose e a síndrome de Cushing (Goldberg et al., 1998).

A ação antiglicocorticoide da mifepristona é assegurada por três mecanismos distintos. No meio extracelular, o RU486 compete com a corticosterona pela ligação ao GR, com uma afinidade de três a quatro vezes superior a da dexametasona. Ao ligar-se ao GR, a mifepristona estabiliza a interação entre o receptor e o complexo multiproteico, impedindo sua dissociação, e assim evitando a translocação do GR para o núcleo. Alguns receptores mesmo complexados ainda são capazes de se translocar para o núcleo da célula, no entanto, apresentam uma atividade transcricional significativamente reduzida devido a uma baixa afinidade pelo DNA (Beck, 1993; Mahajan e London, 1997). O RU486 desencadeia seu efeito antiglicocorticoide de modo dose-dependente, e sua meia-vida plasmática é longa, podendo atingir 90 horas (Johanssen e Allolio, 2007). Apesar de esse composto possuir afinidade aos receptores de progesterona, a sua reduzida distribuição no epitélio gástrico assegura que os efeitos desencadeados pela mifepristona no estômago são majoritariamente devido à sua ação antiglicocorticoide (Mahajan e London, 1997; Saqui-Salces et al., 2008).

A mifepristona possui ação central e periférica. No sistema nervoso central, o RU486 bloqueia os receptores de glicocorticoides presentes no hipotálamo, interferindo no mecanismo de *feedback* negativo que regula a secreção hormonal. Como consequência, ocorre um aumento dos níveis plasmáticos tanto de ACTH quanto de corticosterona (Goldberg et al., 1998). No estômago, a ação da

mifepristona é específica, uma vez que o antagonista não se liga aos receptores de mineralocorticóides (Cadepond et al., 1997; Pecci et al., 2009), e os GRs são preferencialmente ocupados pelo RU486 (Filaretova et al., 2002).

1.5 Fator de crescimento transformante α (TGF α) e receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR)

O fator de crescimento transformante α (TGF α) é membro da família do EGF, com o qual compartilha, além do receptor, 35% de homologia (Hormi et al., 1995). Esse fator de crescimento é sintetizado sob a forma de uma molécula precursora ligada à membrana plasmática, na qual estão presentes: um peptídeo sinal, uma sequência de 50 aminoácidos relativa à molécula madura, uma região transmembrana e uma região intracelular.

O TGF α não está presente no leite materno de ratos (Dvorak e Koldovský, 1994). No entanto, diversos estudos apontam que, após sua síntese no tecido epitelial, sua atividade é regulada pelo EGF proveniente da placenta, saliva e leite (Dvorak et al., 2000; Kelly et al., 1997; Milani e Calabro, 2001). Na mucosa gástrica, a expressão de TGF α ocorre nas células mucosas superficiais, mucosas do colo e células parietais (Hormi et al., 1995; Konturek et al., 1996; Osaki et al., 2010), e inicia-se durante a fase fetal (Hormi et al., 1995; Kelly et al., 1997), aumentando ao longo do desenvolvimento pós-natal do animal. Sua ação pode ocorrer de modo autócrino e/ou parácrino. Todavia, as moléculas precursoras de TGF α , presas à membrana plasmática, também podem desencadear atividade biológica, caracterizando um modo justácrino de ação desse fator de crescimento (Kumar et al., 1995; Massagué, 1990).

Dentre os efeitos fisiológicos mediados pelo TGF α no trato gastrintestinal, destacam-se a inibição da secreção ácida estimulada pela histamina (Rhodes et al., 1986), o retardo do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal (Shinohara et al., 2001), e a proteção e aceleração da regeneração da mucosa gástrica após um processo ulcerativo (Konturek et al., 1996; Milani e Calabro, 2001; Romano et al., 1992). Em termos de regulação de processos celulares, o TGF α estimula a proliferação, migração e diferenciação celular na mucosa gástrica (Bluth et al., 1995; Nakajima e Kuwayama, 1995; Osaki et al., 2010), e é capaz de inibir a apoptose em

células mucosas superficiais através da ativação da família Bcl-2 (Kanai et al., 2001). Sukhotnik et al. (2008) observaram que TGF α estimula de modo dose-dependente a proliferação de enterócitos *in vivo* e *in vitro*, além de promover a regeneração intestinal no quadro de mucosite induzida por agente quimioterápico.

O TGF α desencadeia seus efeitos biológicos por meio do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 170 kDa com atividade tirosina-quinase. O EGFR é expresso no epitélio gástrico pelas células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas (Beauchamp et al., 1989; Osaki et al., 2010), e sua ativação envolve a formação de homodímeros ou heterodímeros com outros receptores de sua família, presentes na membrana plasmática da célula. Após dimerização, os receptores são ativados por autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina, ou por transfosforilação por outras quinases, como Src e JAK-2. A ativação de EGFR pode, direta ou indiretamente, desencadear diversas cascatas de sinalização intracelular, incluindo Ras/MAPK (quinase ativada por mitógeno), via envolvida na proliferação celular em células intestinais e gástricas mantidas em cultura (Citri e Yarden, 2006; Göke et al., 1998; Jorissen et al., 2003; Xiao e Majumdar, 2001). O acionamento de Ras depende da proteína adaptadora Grb2, na qual se liga o fator Sos, que promove a troca de GDP por GTP em Ras, e sua consequente ativação. Ras, por sua vez, ativa Raf, que, por uma série de quinases intermediárias, fosforila e aciona ERK1/2, as quais se translocam para o núcleo e ativam fatores de transcrição (Figura 2). Xiao et al. (2003) observaram que na mucosa gástrica TGF α induz a ativação de AP-1, um fator de transcrição envolvido na regulação da proliferação celular, de maneira dependente de ERK1/2. Outras vias envolvidas na resposta ao EGFR são as STATs, fatores de transcrição inativos que, quando acionados por Src, se translocam para o núcleo, e as vias de fosfolipídios, como a fosfolipase C γ e a PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase) (Jorissen et al., 2003).

Figura 2. Esquema ilustrando as vias de sinalização intracelular ativadas por EGFR.

Troyer et al. (2001) demonstraram que camundongos triplo *null* para EGF, anfirregulina e TGF α apresentam retardo no crescimento e defeitos na morfologia do íleo durante a terceira semana de vida pós-natal. E embora esses animais não apresentem diferenças fenotípicas no intestino a longo prazo, constatou-se que tanto neonatos quanto adultos apresentam resposta citoprotetora defeituosa e são propensos ao aparecimento espontâneo de úlceras. Esses resultados ratificam a relevância dos ligantes de EGFR, provenientes do leite e endógenos, no desenvolvimento e manutenção da mucosa intestinal.

Osaki et al. (2010) observaram que a alteração do padrão alimentar por meio do desmame precoce leva a um aumento dos níveis de TGF α e EGFR na mucosa gástrica. No entanto, a inibição da fosforilação do EGFR pela administração de AG1478 impede o aumento da proliferação celular e da diferenciação de células mucosas do colo, demonstrando que o EGFR está envolvido no controle da cinética celular na mucosa gástrica (Osaki et al., no prelo). Além disso, o aumento da proliferação desencadeado por EGFR pode estar relacionado à indução da fosforilação das vias de MAPK e Src pelo desmame precoce.

1.6 Fator de crescimento transformante β (TGF β)

O fator de crescimento transformante β (TGF β) é membro de uma superfamília de fatores caracterizada em meados de 1980 (Massagué, 1987; Sporn et al., 1987; Sporn e Roberts, 1992). O TGF β é um polipeptídeo pleiotrófico de 25 kDa que atua sobre diversos tipos celulares durante o desenvolvimento e na homeostase tecidual em adultos. Os mamíferos expressam três isoformas de TGF β (TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3), os quais são codificados por diferentes genes e compartilham de 64-85% de homologia (Kingsley, 1994; Koli et al., 2001; Tanigawa et al., 2005).

O TGF β também está presente no leite materno de mamíferos (Letterio et al., 1994; Penttinen et al., 1998), sugerindo seu papel na manutenção da homeostase intestinal e no desenvolvimento à tolerância oral dos neonatos (Penttinen, 2010). A isoforma de TGF β predominante no leite de ratos é a β 2, cujas concentrações decrescem ao longo do período de amamentação, com o concomitante incremento da produção endógena (Penttinen et al., 1998). Na mucosa gástrica, a expressão das isoformas de TGF β e seus receptores aumentam gradativamente ao longo da terceira semana de vida pós-natal, em paralelo ao processo de dispersão de sua distribuição entre os diversos tipos celulares em diferenciação (De Andrade Sá et al., 2003).

Os efeitos biológicos de TGF β incluem a regulação da proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose, e a modulação da inflamação e alergia (Booth et al., 2000; Ciacci et al., 1993; Fujisawa et al., 2004; Penttinen, 2010; Rokutan et al., 1998; Tsutsumi et al., 2002). O TGF β pode ainda regular o reparo de lesões por meio do recrutamento de fibroblastos e o estímulo à síntese e deposição de matriz extracelular. Playford et al. (1999) demonstraram que a administração de TGF β 1 *in vivo* induz a cicatrização de úlceras na mucosa gástrica causada pelo tratamento com indometacina. Entretanto, é fundamental que a expressão de TGF β ocorra de forma equilibrada, uma vez que seu excesso pode levar ao surgimento de tecido fibrótico (Wahl, 1994). Por sua ação sobre a proliferação celular, credita-se ao TGF β o papel de manter o equilíbrio de crescimento de um tecido, e atuar como um agente supressor de tumores. No entanto, a elevada expressão desse fator de crescimento pelo tecido tumoral contribui para a sua progressão devido à potente ação

imunossupressora e angiogênica do TGF β sobre o hospedeiro (Derynck e Zhang, 2003; Hartsough e Mulder, 1997; Parekh et al., 2002).

O TGF β é secretado sob a forma de uma molécula precursora latente, que pode ser de pelo menos dois tipos. O primeiro deles é o TGF β -LAP (*Latency Associated Transforming Growth Factor-Beta*), no qual o homodímero de TGF β maduro está ligado a duas sequências associadas à latência. O outro tipo envolve a interação do complexo TGF β -LAP à glicoproteína LTBP (*Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein*), a qual tem papel relevante na síntese e deposição de matriz extracelular (Gleizes et al., 1997; Lack et al., 2003; Miyazono et al., 1991; Olofsson et al., 1992; Taipale et al., 1994). O TGF β desencadeia sua atividade celular por meio de dois receptores de membrana com atividade quinase serina/treonina, conhecidos como T β RI e T β RII.

Embora o conhecimento dos mecanismos fisiológicos de ativação de TGF β seja ainda restrito, sabe-se que tal processo envolve a ação de proteases furina e *like-furina* (Dubois et al., 1995; Leitlein et al., 2001). A furina está presente no epitélio gástrico (Fujisawa et al., 2004; Kamimura et al., 1999) e seus níveis aumentam significativamente em paralelo ao aumento da concentração de TGF β (Blanchette et al., 1997). Após ativação, o TGF β se liga a T β RII, que por sua vez recruta e fosforila o receptor T β RI, induzindo a formação de um complexo (Attisano et al., 1993; Kingsley, 1994; Koli et al., 2001; Massagué, 1996). Os mediadores intracelulares da sinalização de TGF β são as Smads, que direcionam o sinal de TGF β da membrana celular para o núcleo. As Smads são funcionalmente categorizadas em três grupos: as R-Smads, que são reguladas pelo receptor; as mediadoras comuns, Co-Smads, que associadas às primeiras permitem a progressão da sinalização; e, finalmente, as I-Smads, que atuam como proteínas inibitórias da via (Mehra e Wrana, 2002). O receptor T β RI ativo reconhece e fosforila as Smad2 e 3, as quais formam com a Smad4, uma Co-Smad, um complexo que se transloca para o núcleo e participa da regulação da transcrição gênica, comumente em associação com outros fatores de transcrição. Embora Smad3 seja capaz de se ligar diretamente ao DNA, contrariamente à Smad2, essa interação é fraca e pouco seletiva, requerendo a intermediação de outros fatores de transcrição, tais como os membros da família AP-1, TFE3 e FoxG1 (Inman, 2005). Existe ainda um terceiro receptor de TGF β , o T β RIII, formado por uma proteoglicana e uma glicoproteína, conhecidas como

betaglicana e endogлина. No entanto, esse último tipo apenas medeia a ligação entre TGF β 2 e os receptores do tipo I e II, sem uma participação na transdução do sinal (Mehra e Wrana, 2002; Tanigawa et al., 2005).

A I-Smad, Smad7, inibe a sinalização dos membros da família de TGF β por meio de sua interação com T β RI e evita assim o recrutamento e a ativação de R-Smads. A Smad7 reside no núcleo e se transporta para o citoplasma mediante o estímulo pelo ligante (Itóh et al., 1998). Essa proteína pode ainda interagir com as Smad2 e 3 ativas, impedindo a formação do complexo R-Smad/Smad4 e seu fluxo para o núcleo e, além disso, recrutar Smurfs, proteínas da classe ligases E3 que catalisam a degradação dos receptores T β RI. A expressão de I-Smads é induzida por TGF β , caracterizando um mecanismo de *feedback* negativo, que permite a regulação tempo-espacial de sua sinalização (Derynck e Zhang, 2003; Itóh et al., 1998; Mehra e Wrana, 2002) (Figura 3). A sinalização de TGF β é ainda regulada por diferentes modificações traducionais, que incluem ubiquitinização, processo no qual as Smurfs participam, SUMOilação e acetilação (Liu e Feng, 2010).

A intensidade da atividade de TGF β é determinada pela força do sinal que chega ao núcleo da célula, e não pela concentração extracelular do fator de crescimento, aspecto que reforça o papel dos receptores como mediadores da sinalização de TGF β (Monteleone et al., 2001). Embora existam outras vias de sinalização para TGF β , a via das Smads é a mais estudada e melhor caracterizada.

Figura 3. Sinalização de TGF β pela via das Smads.
Fonte: Adaptado de Pinzani e Marra (2001).

Camundongos *null* para TGF β 1 apresentam uma alta taxa de mortalidade intra-uterina. Contudo, nascem e se desenvolvem normalmente até o término da segunda semana de vida pós-natal, quando ocorre o estabelecimento de uma aguda síndrome degenerativa. Esses animais apresentam uma acentuada resposta inflamatória sistêmica, gerando complicações cardiopulmonares que, em última instância, os leva à morte precoce, entre a terceira e quinta semana de vida (Kulkarni e Karlsson, 1993). De Andrade Sá et al. (2008) demonstraram que a administração de TGF β 1 a animais em amamentação induz, por meio da ativação da sinalização de Smads, a inibição da proliferação celular e o estímulo à apoptose na mucosa gástrica, sugerindo um potencial papel de TGF β 1 na regulação do crescimento pós-natal do estômago.

1.7 Interação entre padrão alimentar, glicocorticoides e fatores de crescimento

A interação entre glicocorticoides e fatores de crescimento tem sido investigada em diversos sistemas biológicos. Raja et al. (1991) demonstraram que a transcrição gênica de TGF α é responsiva aos glicocorticoides e corregulada pela expressão de EGFR. Schaeffer et al. (2006) ratificaram esses resultados usando um modelo *in vitro*, e mostraram que o tratamento com hidrocortisona induz o aumento de RNAm para TGF α em células intestinais da linhagem IEC-18.

Quanto ao TGF β , Pierce et al. (1989) demonstraram que ratos tratados com glicocorticoide sintético apresentam menor taxa de cicatrização de feridas dérmicas. No entanto, a administração de TGF β é capaz de reverter esse quadro inibitório por meio do aumento do influxo de fibroblastos e síntese de pró-colágeno do tipo I no local da ferida. Em termos imunológicos, o efeito imunossupressor dos glicocorticoides se deve à sua capacidade de evitar a ativação de células T por múltiplos mecanismos, dentre eles o estímulo à expressão de TGF β (Almawi e Irani-Hakime, 1998). Entretanto, TGF β é igualmente capaz de promover o recrutamento e ativação de leucócitos tendo, portanto, um papel dual sobre as células do sistema imunológico (Wahl, 1994).

Em relação à expressão de fatores de crescimento na mucosa gástrica, Ogias et al. (2006) demonstraram que o tratamento com hidrocortisona administrado a

animais em amamentação aumenta a expressão protéica de TGF β 1 e sua sinalização, enquanto reduz TGF β 2.

O padrão alimentar é também um regulador da expressão dessas moléculas no estômago. Filhotes submetidos ao jejum têm reduzida distribuição de TGF β 3 na mucosa gástrica, enquanto animais adultos apresentam um aumento dessa isoforma (Alvares et al., 2007). No entanto, o desmame precoce é capaz de modificar essa resposta, uma vez que filhotes desmamados precocemente apresentam elevada expressão de TGF β 3 e T β RI quando sujeitos à privação alimentar (Ogias et al., 2010a), mimetizando o que ocorre na fase adulta. Além da regulação sobre o TGF β , o desmame precoce também aumenta a expressão de TGF α e EGFR no epitélio gástrico, e esse efeito está associado ao estímulo à proliferação e diferenciação celular observados nessa condição alimentar.

Em conjunto, esses e outros estudos sugerem uma interação entre a presença e o tipo de alimento com a regulação dos níveis circulantes de corticosterona e a expressão de fatores de crescimento.

2 JUSTIFICATIVA

A dieta, hormônios e fatores de crescimento são elementos reguladores da cinética celular no epitélio gástrico. Sabe-se que o desmame precoce induz aumento da proliferação celular e o crescimento da mucosa gástrica de ratos (Gama e Alvares, 2000), e esse efeito pode estar associado à maior expressão de $TGF\alpha$ e EGFR (Osaki et al., 2010, no prelo) e à modificação na concentração de $TGF\beta$ no tecido epitelial (Ogias et al., 2010a). Ademais, o desmame precoce caracteriza-se como uma condição de estresse ao animal em desenvolvimento, a qual pode induzir o aumento dos níveis circulantes de corticosterona. É, portanto, possível que as modificações observadas no epitélio sejam desencadeadas pelos glicocorticoides, cuja ação pode ainda envolver a regulação da expressão local de fatores de crescimento. Neste sentido, já foi demonstrado que o tratamento com hidrocortisona eleva os níveis de $TGF\beta$ e sua sinalização (Ogias et al., 2006).

Ante o exposto, construímos a hipótese de que, no desmame precoce, $TGF\alpha$ e $TGF\beta$ participem da regulação da proliferação celular na mucosa gástrica, e que a expressão e atividade desses fatores de crescimento estejam sob a influência da corticosterona (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo da ação hipotética da corticosterona sobre a proliferação celular na mucosa gástrica mediada pelos fatores de crescimento $TGF\alpha$ e $TGF\beta$ dentro do modelo do desmame precoce.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi investigar a influência da corticosterona sobre a proliferação celular, bem como seus efeitos sobre a expressão e sinalização de $TGF\alpha$ e $TGF\beta$ na mucosa gástrica, usando como modelo o desmame precoce. Assim, nossos objetivos específicos foram:

- 1) Caracterizar os níveis plasmáticos de corticosterona ao longo do período de desmame precoce em filhotes de ratos, determinando as variações diárias;
- 2) Avaliar o efeito do bloqueio da ação da corticosterona sobre a proliferação celular do epitélio gástrico;
- 3) Estudar os efeitos da corticosterona sobre os níveis proteicos de $TGF\alpha/EGFR$ e de $TGF\beta1$ e $\beta3$, e a ativação de suas vias de sinalização intracelular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desmame precoce

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob condições normais, com ciclo de 12h claro/ 12h escuro, temperatura e exatidão controladas. O protocolo empregado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA 86/08).

As fêmeas foram acasaladas e alojadas em gaiolas individuais em virtude do nascimento das ninhadas, designado dia 0 (zero). No terceiro dia, todas as ninhadas tiveram seu tamanho ajustado para 8-9 filhotes por fêmea, os quais foram amamentados normalmente até o 14º dia de vida pós-natal. Animais de ambos os sexos foram utilizados no estudo.

No 15º dia de vida pós-natal, às 10h, os filhotes foram divididos em dois grupos: amamentado controle (A) e desmame precoce (DP). Os filhotes do grupo controle permaneceram com a mãe e foram amamentados até o momento do sacrifício, enquanto os filhotes do grupo DP foram separados, alojados em uma gaiola de dimensões menores e alimentados com uma pasta de ração (Nuvilab CR-1, Nuvital Nutrientes AS, Colombo, PR, Brasil), disponível todo tempo (Gama e Alvares, 2000). Ademais, esses animais receberam, duas vezes ao dia, alimento e água por meio de uma pipeta Pasteur descartável e foram massageados na região abdominal a fim de facilitar a eliminação de urina e fezes. O tratamento foi estendido até o 18º dia de vida pós-natal e a massa corpórea dos animais foi monitorada até o momento da eutanásia.

4.2 Tratamento com RU486

Com a finalidade de bloquear a ação da corticosterona e investigar seu papel na regulação da proliferação celular da mucosa gástrica em ratos, utilizamos um antagonista do receptor de glicocorticoides (GR). A mifepristona, também conhecida pela sigla RU486, é um esteroide análogo que compete com o hormônio pelo sítio de ligação ao GR. Ao se ligar ao receptor, o RU486 reforça a interação do GR ao

complexo multiproteico a ele associado, impedindo sua ativação e consequente ação como fator de transcrição (Mahajan e London, 1997).

No 15º dia de vida pós-natal, os filhotes foram divididos em quatro grupos: amamentado controle (A), amamentado tratado (ARU), desmame precoce controle (DP) e desmame precoce tratado (DPRU), inicialmente subdividido em dois grupos como descrito a seguir. Os animais submetidos ao tratamento com RU486 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) receberam uma dose de 10 mg/kg, administrada por injeção i.p. às 17h. A fim de avaliar o efeito do tratamento de duas doses, o outro subgrupo de DPRU recebeu uma dose adicional no 17º dia de vida pós-natal, no mesmo horário. Foi utilizado como veículo de diluição o óleo de milho na concentração de 2,5 mg/mL. Os animais dos grupos controle receberam dose idêntica do veículo nos mesmos dias e horário do tratamento administrado aos grupos RU.

4.3 Coleta de material

4.3.1 Coleta de sangue para dosagem de corticosterona total

Aos 15, 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal, filhotes dos grupos A e DP foram submetidos à eutanásia após anestesia por inalação de gás isoflurano (Isoflurine® Cristália, Itapira, SP). Para evitar variações circadianas, a coleta foi realizada sempre às 17h. Cada animal foi retirado rapidamente da gaiola e colocado em uma caixa plástica que continha em sua base algodão embebido em isoflurano. Após anestesia, os animais foram removidos da caixa e mantidos sedados por meio de uma máscara inalatória, igualmente provida da substância anestésica. Amostras de sangue foram coletadas por punção da aorta abdominal em seringas heparinizadas (5000UI, Liquemine ROCHE®, Basiléia, Suíça). A duração desses procedimentos não ultrapassou 3 minutos, evitando-se dessa forma o aumento nos níveis de corticosterona devido à manipulação do animal (Ramaley, 1972). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 20 minutos e a fração plasmática foi isolada e mantida em *freezer* a -20 °C até a realização dos ensaios. A massa corpórea dos animais foi avaliada no momento da eutanásia.

4.3.2 Coleta de estômago para imuno-histoquímica e coloração em HE

No 18º dia de vida pós-natal, filhotes dos grupos A, ARU, DP e DPRU foram anestesiados com injeção i.p. de xilazina e ketamina (1:1; 0,5 mL/100 g de massa corpórea; Dopalen e Anasedan, Vetbrands®, Jacareí, Brasil) às 10h. Uma hora antes da eutanásia, os filhotes receberam uma dose i.p. de BrdU (Sigma-Aldrich, 100 mg/kg) para marcação das células em síntese de DNA. Os estômagos foram retirados, abertos pela menor curvatura, esticados em cortiça e fixados em formol 10%. Após 4 horas de fixação, o estômago foi rapidamente retirado da cortiça e seccionado em três fragmentos, abrangendo as regiões córnea, corpo e antro. Esses fragmentos foram transferidos para um cassete plástico, dispostos entre duas esponjas, onde permaneceram por mais 4 horas no processo de fixação. Em seguida, as amostras foram transferidas para álcool 70º para posterior inclusão em parafina.

4.3.3 Coleta de mucosa gástrica para “Western blot”

Aos 17 e 18 dias de vida pós-natal, os filhotes foram anestesiados com Dopalen e Anasedan, como descrito acima, às 10h. Os estômagos foram retirados, abertos pela menor curvatura e esticados em cortiça. Sob lupa, a mucosa do corpo gástrico foi raspada e conservada em PMSF 0,1 M 10% diluído em solução salina tamponada com Tris (TBS) 0,02 M. Imediatamente após a coleta, as amostras foram processadas para extração protéica e mantidas em freezer a -80 °C até a realização dos ensaios de “Western blot”.

4.4 Ensaio para dosagem de corticosterona plasmática

A dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona foi realizada por radioimunoensaio utilizando-se um kit comercial (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EUA). O ensaio foi conduzido segundo recomendações do fabricante. As amostras foram inicialmente diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo gelatina e γ globulina de coelho (1:200). Em tubos de vidro, foram adicionados sucessivamente 100 μ L de amostra, 200 μ L de corticosterona- I^{125} e 200

μ L de anticorpo anti-corticosterona. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, 500 μ L de solução precipitante contendo anti- γ globulina de coelho foram acrescentados. Após centrifugação a 2.300 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi decantado e a leitura do precipitado foi efetuada em contador gama (Wizard Automatic Gamma Counter, PerkinElmer, Waltham, MA). Os valores de concentração de corticosterona em cada amostra foram determinados a partir de uma curva-padrão (25-1000 ng/mL) preparada seguindo as mesmas etapas descritas acima e com o uso de soluções-padrão fornecidas pelo kit. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli, e supervisionados pela técnica Marlene dos Santos da Rocha.

4.5 Índices proliferativos

4.5.1 Imuno-histoquímica para BrdU e determinação do índice de síntese de DNA (IS)

Cortes semi-seriados de 6 μ m, dispostos em lâminas cobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), foram desparafinizados e reidratados em PBS (0,05 M pH 7,4). Em seguida, o material foi tratado com metanol- H_2O_2 3% por 10 minutos para inativação da peroxidase endógena e submetido a um pré-tratamento com pepsina 0,1% diluída em HCl 0,1 N a 37 °C, por 20 minutos. Os cortes foram então incubados, *overnight* a 4 °C, com anticorpo monoclonal anti-BrdU (1:100, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) diluído em nuclease e PBS 0,05 M (1:1). Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, EUA) e diluído em PBS 0,05 M (1:40) por 2 horas à temperatura ambiente. A revelação foi realizada com solução de diaminobenzidina (DAB) 0,05% com H_2O_2 0,15% por 10 minutos, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Mayer 0,1% e diferenciação em solução saturada de carbonato de lítio. Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

O índice de síntese de DNA (IS) foi determinado dentro do compartimento proliferativo, que nos filhotes de 18 dias de vida pós-natal ocupa toda a extensão

das glândulas gástricas (Alvares e Gama, 1993). Foram contados núcleos de células epiteliais marcados e não marcados pelo anticorpo anti-BrdU, totalizando 2000-2500 células por animal (Aherne et al., 1977). Foram utilizadas apenas áreas nas quais a mucosa gástrica apresentava-se perpendicularmente orientada. A análise foi realizada em microscópio de luz com o auxílio de ocular integradora Zeiss nº 2 (8x) e objetiva de imersão (100x). O IS foi calculado pela fórmula abaixo:

$$IS = \frac{\text{número de células marcadas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

4.5.2 Índice mitótico (IM)

Cortes semi-seriados de 5 µm, dispostos em lâminas cobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), foram desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina para posterior análise em microscopia de luz.

O índice mitótico foi determinado de forma similar ao cálculo do IS. Células epiteliais em mitose e em intérfase foram contadas, totalizando aproximadamente 2.500 células por animal. O IM foi calculado pela fórmula abaixo:

$$IM = \frac{\text{número de células em mitose}}{\text{número total de células}} \times 100$$

4.6 Imuno-histoquímica para EGFR

Cortes semi-seriados de 6 µm, dispostos em lâminas cobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), foram desparafinizados e reidratados em PBS (0,05 M pH 7,4)-Triton x-100 0,3%. Em seguida, o material foi tratado com metanol-H₂O₂ 0,3% por 10 minutos para inativação da peroxidase endógena. A marcação inespecífica do anticorpo para EGFR foi bloqueada com soro de cabra a 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories) por 20 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação *overnight* a 4 °C com anticorpo policlonal para EGFR (10 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology). Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado de cabra anti-coelho diluído em PBS (1:50), por 2 horas à TA e, em seguida, incubação com complexo estreptavidina biotina (10

$\mu\text{g/mL}$, Jackson ImmunoResearch Laboratories) por 1 hora, também à TA. Por fim, a reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (DAB) 0,05% com H_2O_2 0,15% por 10 minutos, e os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer 0,1% e diferenciados em solução saturada de carbonato de lítio. Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. A imunomarcação foi analisada qualitativamente em microscópio de luz.

4.7 “Western blot”

A extração protéica para execução do “Western blot” foi realizada por homogeneização das amostras em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; deoxicolato de sódio 1%) acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (100 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de aprotinina, 15 mg/mL de benzamidina, ortovanadato de sódio 5mM e PMSF 0,1 M). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi isolado e mantido a -80 °C para posterior quantificação de proteínas segundo método de Bradford (1976).

As amostras foram diluídas em tampão (Tris 1 M, DTT 0,1 M, glicerol 17%, SDS 0,1% e Bromophenol Blue 0,4% e β -mercaptoetanol 1%) e submetidas a aquecimento por 5 minutos a 100 °C para linearização das proteínas. O fracionamento proteico foi realizado em gel de poliacrilamida em gradiente (5-20%)-SDS, preparado no Gradient Maker SG30 (Hoefer, Holliston, MA, EUA). Trinta μg de proteína foram acrescidas a cada poço do gel e submetidos à eletroforese por aproximadamente 3 horas, a 100 V e 50 mA.

As proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) em tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20% em água) a 4 °C, por 2 horas a 100 V, com exceção das membranas destinadas à detecção de EGFR, para as quais foi realizada transferência *overnight* a 25 V. Após esse procedimento, as membranas foram coradas em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos, apenas para confirmação do sucesso da transferência, e posteriormente lavadas em TBS 0,02 M por 10 minutos. Após lavagem, as membranas, com exceção daquelas destinadas à detecção de p-Smad2, foram incubadas sob agitação com TBS 0,02 M contendo

leite desnatado em pó 5% (Molico, Nestlé, Brasil) e Tween 20 0,05% por 1 hora à temperatura ambiente para bloqueio de ligações inespecíficas.

4.7.1 “Immunoblot”

Após bloqueio, as membranas foram incubadas, *overnight* a 4 °C, com anticorpos primários relacionados na Tabela 1, com exceção das membranas destinadas à detecção de p-Smad2, as quais não foram bloqueadas. Posteriormente, as amostras foram lavadas sucessivas vezes com TBS 0,02 M e TTBS (Tween 20 0,1% em TBS 0,02 M), e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-coelho (1:1000) ou anti-camundongo (1:500) conjugados a peroxidase (GE Healthcare) e diluídos em TBS 0,02 M contendo leite desnatado em pó 5% e Tween 20 0,05%. Excepcionalmente para a detecção de TGF α e p-Smad2, as membranas foram incubadas com os anticorpos apenas por 10 minutos à temperatura ambiente com o uso do equipamento SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore, Billerica, MA). Após seguidas lavagens, as reações foram reveladas com kit ECL (GE Healthcare) em filmes radiográficos. Estes filmes foram digitalizados e a densidade óptica integrada (IOD) das bandas foi analisada com o uso do programa de domínio público Image J (1.37v Software, National Institute of Mental Health, NIH, EUA). As proteínas β -actina e ERK 1/2 foram utilizadas como controle interno de carregamento do gel e os resultados de IOD obtidos para cada molécula estudada foram expressos em relação ao IOD obtido para β -actina ou ERK1/2.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados no “immunoblot”.

Anticorpo	Fabricante	Concentração
TGF α	Oncogene-Calbiochem (San Diego, CA, EUA)	1 μ g/mL
TGF β_1	R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA)	2 μ g/mL
TGF β_3	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)	1 μ g/mL
EGFR	Santa Cruz Biotechnology	2 μ g/mL
p-ERK	Santa Cruz Biotechnology	0,8 μ g/mL
ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology	0,05 μ g/mL
p-Smad2	Oncogene-Calbiochem	0,2 μ g/mL
β -actina	Sigma-Aldrich	0,7 μ g/mL

* os anticorpos foram diluídos em TTBS contendo leite desnatado em pó 5%, com exceção de TGF α e p-Smad2, diluídos em TTBS contendo BSA a 0,5%.

4.8 Resumo dos procedimentos

A Figura 5 resume as coletas realizadas, em dias e horários específicos, e os grupos utilizados em cada técnica empregada nesse estudo.

Figura 5. Esquema dos pontos de coleta de amostras.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos em cada experimento foram agrupados de acordo com o tratamento e avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de comparações múltiplas de Tukey. A significância foi estipulada em $p < 0,05$ para todos os testes realizados.

5 RESULTADOS

5.1 Animais

A massa corpórea dos animais foi monitorada ao longo de todo o tratamento, e os filhotes que apresentaram baixo peso ou perda superior a 20% durante a experimentação foram excluídos das análises, seguindo a determinação de estudos anteriores (Ogias et al., 2010a).

Os animais submetidos ao desmame precoce apresentaram menor massa corpórea em relação aos filhotes em amamentação nos dias 16, 17 e 18 ($p < 0,05$) (Figura 6). Ademais, não houve diferença entre os grupos controle e tratado com RU486 em cada condição alimentar analisada separadamente (amamentados e DP), indicando que o tratamento administrado por si não comprometeu o crescimento dos animais.

Figura 6. Massa corpórea de animais dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU) do 15º ao 18º dia de vida pós-natal. Filhotes DP e DPRU foram submetidos ao desmame precoce no 15º dia, e os animais dos grupos ARU e DPRU foram injetados com RU486 na dose de 10 mg/kg. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão para cada grupo avaliado. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A. (b) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ARU.

A diferença de massa corpórea entre os animais amamentados e submetidos ao desmame precoce pode ser decorrente do número de filhotes que permaneceu

com a mãe para compor os grupos A e ARU (sempre em torno de 4). Isso lhes permitiu ingerir grande quantidade de leite, o que pode ter causado maior ganho de massa corpórea ao longo do estudo. Em contrapartida, os animais submetidos ao desmame precoce apresentaram ligeira perda de massa durante o tratamento, e esses dois processos somados delinearam a diferença existente entre os animais amamentados e submetidos ao desmame precoce.

Os filhotes dos grupos DP e DPRU foram alimentados com uma pasta de ração, disponível *ad libitum* e também ofertada diretamente duas vezes ao dia. Embora aceitassem a oferta, não se alimentaram sozinhos no dia em que foram separados da mãe (15º dia), o que começou a ocorrer apenas a partir do 16º dia. Com isso, sofreram uma perda de massa corpórea nos dois dias consecutivos ao início do tratamento, que foi contornada a partir do 17º dia, quando os animais passaram a roer também os *pellets* de ração presentes na gaiola e conseguiram, deste modo, estabilizar seu peso com um sutil ganho de massa corpórea.

5.2 Efeito do desmame precoce sobre os níveis plasmáticos de corticosterona

O desmame precoce representa uma condição de estresse para os animais em desenvolvimento, uma vez que envolve tanto a separação materna quanto a drástica mudança de dieta. A fim de investigar a resposta diária dos filhotes frente a esse estresse, avaliamos os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais amamentados (grupo A) e submetidos ao desmame precoce (grupo DP) ao longo de toda a experimentação.

Verificamos um aumento dos níveis de corticosterona a partir do segundo dia de experimentação, até o seu término no 18º dia de vida ($p < 0,05$) (Figura 7). Os animais do grupo DP apresentaram concentrações plasmáticas de corticosterona superiores a duas vezes os níveis encontrados para o grupo amamentado nas idades de 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal.

Figura 7. Concentração plasmática de corticosterona (ng/mL) em animais dos grupos amamentado (A) e desmame precoce (DP) de 15, 16, 17 e 18 dias de vida pós-natal avaliada por RIA. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo amamentado e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP no 15º dia.

5.3 Efeito da corticosterona sobre a proliferação celular da mucosa gástrica

Gama e Alvares (2000) demonstraram que o desmame precoce estimula a proliferação celular no epitélio gástrico. No presente estudo, avaliamos a influência da corticosterona nesse processo por meio do bloqueio de sua ação pela administração de RU486, um antagonista dos receptores de glicocorticoides. A avaliação incluiu dois métodos distintos: índice de síntese de DNA por incorporação de BrdU (IS) e índice mitótico (IM).

Em relação à extensão do compartimento proliferativo, observamos que nos animais do grupo DP as células em proliferação estão concentradas na região do istmo-colo (Figura 8B). Já nos filhotes em amamentação o compartimento proliferativo estende-se ao longo de toda a glândula gástrica (Figura 8A), e em conjunto, estas observações corroboram os resultados obtidos por Alvares (1992) e Gama e Alvares (2000). Notamos, no entanto, que os animais submetidos ao desmame precoce e tratados com RU486 (Figura 8C,D) apresentam o mesmo padrão verificado nos filhotes em amamentação, exibindo células em proliferação inclusive na região basal da glândula gástrica.

Em relação aos índices proliferativos, inicialmente, testamos o efeito do tratamento com RU486 administrado em uma (DPRU I) ou duas doses (DPRU II). Os resultados obtidos para o IS mostram que o tratamento aumentou o número de células em síntese de DNA nos animais desmamados precocemente quando comparados ao grupo em amamentação ($p < 0,05$). Essa variação foi muito semelhante nos dois grupos avaliados, DPRU I e DPRU II (Figura 8F), indicando que a dose efetiva foi aquela administrada no 15º dia. Por essa razão, adotamos o protocolo de dose única para o tratamento dos animais nas análises subsequentes, e apresentamos os resultados como um grupo tratado único, denominado DPRU.

De modo semelhante ao que ocorre com os animais submetidos ao desmame precoce, os filhotes em amamentação tratados com RU486 (ARU) também apresentaram aumento de IS quando comparados aos controles ($p < 0,05$) (Figura 8F,G). Além disso, os animais do grupo DP apresentaram um valor de IS superior ao observado no grupo A ($p < 0,05$), corroborando dados obtidos por Gama e Alvares (2000).

Os resultados de IM apoiaram os resultados acima, e revelaram que os animais tratados com RU486 tiveram índices maiores, independente da condição

alimentar, amamentação ou desmame precoce ($p<0,05$) (Figura 8J). Nos dois grupos tratados, ARU e DPRU, encontramos valores de IM muito similares, diferentemente do IS, para o qual o grupo DPRU teve um valor de índice superior ao observado no grupo ARU.

Figura 8. Avaliação da proliferação celular na mucosa gástrica de ratos no 18º dia de vida pós-natal submetidos ou não ao desmame precoce. Fotomicrografias de reações de imuno-histoquímica para BrdU em animais amamentados e injetados com óleo de milho (A) e animais submetidos ao desmame precoce e injetados com óleo de milho (B) ou com RU486 na dose de 10 mg/kg no 15º dia (DPRU I) (C) ou nos 15º e 17º dias de vida pós-natal (DPRU II) (D). (E) controle negativo da reação. Aumento original: 20x. Os destaques indicam células marcadas com BrdU e, portanto na fase S do ciclo celular. Índice de síntese de DNA (IS) na mucosa gástrica de ratos dos grupos A, ARU, DP, DPRU I e DPRU II (F). Posteriormente, os dois grupos foram unidos, formando o grupo DPRU. (G) IS obtido nos grupos A, ARU, DP e DPRU. Fotomicrografias da mucosa gástrica de ratos de 18 dias desmamados precocemente injetados com óleo de milho (H) ou com RU486 (I). Coloração em hematoxilina e eosina (HE). Setas indicam células em mitose e destaques mostram essas células. Aumento original: 50x. Índice mitótico (IM) nas células epiteliais gástricas (J). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A; (c) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A e (d) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP.

5.4 Papel da corticosterona na regulação dos níveis proteicos de fatores de crescimento na mucosa gástrica

Estudamos a influência da corticosterona na expressão do fator de crescimento $TGF\alpha$ e do seu receptor EGFR na mucosa gástrica, visto que Osaki et al. (2010a) demonstraram o aumento da concentração dessas moléculas durante o desmame precoce. Com o intuito de verificar se a elevação de $TGF\alpha$ e EGFR é regulada pela corticosterona, cujas concentrações plasmáticas estão aumentadas durante o desmame precoce, testamos o efeito do bloqueio da ação hormonal (RU486) sobre os níveis dessas moléculas.

Posteriormente, avaliamos a concentração tecidual de $TGF\beta 1$ e $TGF\beta 3$ após o tratamento com RU486, uma vez que já foi descrito que a distribuição de $TGF\beta 1$ é alterada pela administração de hidrocortisona (Ogias et al., 2006), e o desmame precoce é capaz de aumentar a distribuição de $TGF\beta 3$ na mucosa gástrica de ratos submetidos ao jejum (Ogias et al., 2010a), sugerindo que o estresse pode regular os níveis proteicos desses fatores de crescimento.

Paralelamente, avaliamos o bloqueio da ação da corticosterona sobre a concentração dessas mesmas moléculas em animais amamentados a fim de verificar se a resposta ao glicocorticoide é modulada pela condição alimentar.

Em conjunto, essas análises podem contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na ação da corticosterona sobre a proliferação celular da mucosa gástrica durante o desenvolvimento pós-natal. Para tanto, utilizamos animais de duas idades, 17 e 18 dias, sendo que para a primeira idade avaliada, coletamos amostras dos grupos A, ARU, DP e DPRU, enquanto no estudo dos animais de 18 dias, incluímos apenas os grupos A, DP e DPRU.

5.4.1 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGF α

Observamos que os animais do grupo DP apresentaram um aumento dos níveis proteicos de TGF α em relação ao grupo A ($p < 0,05$) em ambas as idades avaliadas (Figura 9), corroborando os resultados obtidos por Osaki et al. (2010). O tratamento com RU486 não alterou a concentração do fator de crescimento, tanto em animais amamentados (ARU) quanto submetidos ao desmame precoce (DPRU) aos 17 dias. No entanto, apesar de não significativa, observamos uma sutil queda nos níveis de TGF α para ambos os grupos tratados (ARU e DPRU) em relação aos respectivos controles (A e DP) (Figura 9A). Além disso, a diferença observada entre as duas condições alimentares (amamentado x desmame precoce) foi mantida mesmo quando os animais foram submetidos ao tratamento com RU486 ($p < 0,05$).

Figura 9. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF α no epitélio gástrico de ratos de 17 (A) e de 18 dias de vida pós-natal (B) dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 μ g de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de ERK1/2 e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A. (b) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ARU.

81

5.4.2 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos e distribuição de EGFR

Avaliamos a concentração protéica de EGFR na mucosa gástrica por “*Western blot*”, e paralelamente verificamos a sua distribuição no tecido por imuno-histoquímica.

A técnica de imuno-histoquímica demonstrou que, nos animais submetidos ao desmame precoce, os tipos celulares que expressam EGFR não se alteram pelo tratamento com RU486, sendo eles: células mucosas superficiais, parietais e zimogênicas (Figura 10C-H).

Quanto à concentração tecidual de EGFR, observamos uma sutil redução nos animais DP em relação ao grupo A, tanto aos 17 quanto aos 18 dias (Figura 10A,B). Após o tratamento com RU486, verificamos que aos 17 dias não houve diferença entre os grupos DP e DPRU, os quais apresentaram valores de IOD muito semelhantes (Figura 10A). No entanto, aos 18 dias, o tratamento com o antagonista levou a um ligeiro aumento de EGFR nos animais desmamados precocemente (Figura 10B). Esse efeito foi também observado para os animais amamentados de 17 dias, nos quais o grupo ARU apresentou nível de EGFR sutilmente superior ao observado para o grupo A (Figura 10A). Contudo, nenhuma das diferenças comentadas acima foi significativa de acordo com o teste estatístico.

Figura 10. Expressão de EGFR na mucosa gástrica de ratos submetidos ou não ao desmame precoce e tratados com RU486. “*Western blot*” para EGFR em animais amamentados (A), amamentados tratados com RU486 (ARU), desmamados precocemente (DP) e desmamados precocemente tratados com RU486 (DPRU) no 17º (A) e 18º dias de vida pós-natal (B). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 µg de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de β -actina e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (C-H) Fotomicrografias de reação de imuno-histoquímica para EGFR na mucosa gástrica de ratos com 18 dias submetidos ao desmame precoce e injetados com óleo de milho (C-E) ou com RU486 (F-H). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Aumento original: 20x (C e F) e 50x (D, E, G, H).

A **B**

5.4.3 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGF β 1

Os animais submetidos ao desmame precoce apresentaram um nível tecidual menor de TGF β 1 em relação aos animais amamentados no 17º dia ($p < 0,05$) (Figura 11A). Entretanto, o tratamento com RU486 não alterou significativamente o parâmetro avaliado, e a diferença entre os grupos amamentado e desmame precoce foi também mantida nos animais tratados (ARU x DPRU). Apesar de não ser significativo, houve um aumento dos níveis proteicos de TGF β 1 nos animais ARU em relação ao seu grupo controle (A). Inversamente, o tratamento com RU486 levou a uma discreta redução da expressão de TGF β 1 nos animais DPRU quando comparados aos filhotes do grupo DP.

Quanto aos animais de 18 dias, observamos a mesma resposta, tanto em relação ao desmame precoce quanto ao tratamento com RU486. No entanto, as diferenças não foram significativas (Figura 11B).

Figura 11. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF β 1 no epitélio gástrico de ratos de 17 (A) e de 18 dias de vida pós-natal (B) dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 μ g de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de β -actina e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (a) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A. (b) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ARU.

5.4.4 Efeito da corticosterona sobre os níveis proteicos de TGF β 3

Observamos que a expressão de TGF β 3 não foi alterada pelo desmame precoce em ambas as idades avaliadas (Figura 12). No entanto, os animais de 18 dias do grupo DP apresentaram uma suave redução dos níveis proteicos de TGF β 3 em relação ao grupo amamentado (A) (Figura 12B).

O tratamento com RU486 não alterou a expressão de TGF β 3, tanto em animais amamentados quanto submetidos ao desmame precoce. No entanto, verificamos uma tendência de resposta contrária de acordo com a condição alimentar do animal. Em animais amamentados, o tratamento com RU486 levou a uma redução dos níveis de TGF β 3 (Figura 12A), enquanto que os animais submetidos ao desmame precoce e tratados com RU486 apresentaram um discreto aumento da expressão desse fator de crescimento, que é mais evidente nos filhotes de 18 dias (Figura 12A,B).

Figura 12. Efeito do RU486 sobre os níveis proteicos de TGF β 3 no epitélio gástrico de ratos de 17 (A) e de 18 dias de vida pós-natal (B) dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 μ g de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de β -actina e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey.

A **B**

5.5 Papel da corticosterona na ativação das vias de sinalização de TGF α /EGFR e TGF β

Investigamos a ativação das vias de sinalização de TGF α /EGFR e TGF β , visto que a modulação da atividade dos fatores de crescimento pela corticosterona pode ocorrer pela regulação de sua sinalização, e não apenas pelo controle da concentração dos peptídeos. Para tanto, avaliamos o efeito do bloqueio da ação da corticosterona sobre a fosforilação de ERK1 e 2, proteínas pertencentes à via de Ras/MAPKs, cuja ativação é também mediada pelo EGFR. Posteriormente, analisamos a fosforilação de Smad2, uma das principais proteínas mediadoras da sinalização de TGF β .

O estudo foi realizado apenas em animais de 17 dias, uma vez que a sinalização que conduz às alterações observadas na proliferação celular no 18º dia deve anteceder o evento.

5.5.1 Efeito da corticosterona sobre a via de sinalização intracelular de $TGF\alpha$

Observamos que os animais submetidos ao desmame precoce (DP) apresentaram um acentuado aumento dos níveis de ERK1/2 fosforiladas em relação ao grupo amamentado (A) ($p<0,05$), corroborando os dados obtidos por Osaki et al. (no prelo). O tratamento com RU486 reduziu significativamente a fosforilação dessas moléculas nos animais desmamados precocemente ($p<0,05$) (Figura 13). Quanto aos filhotes em amamentação, o tratamento apresentou efeito inverso, desencadeando um sutil aumento, embora não significativo, da fosforilação de ERK1/2 em relação ao grupo controle (A).

Figura 13. Efeito do RU486 sobre a ativação da via de sinalização de Ras-MAPK. Níveis de fosforilação de ERK1/2 na mucosa gástrica de animais de 17 dias de vida pós-natal dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 μ g de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de ERK1/2 e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. (a) $p<0,05$ quando comparado ao grupo A e (d) $p<0,05$ quando comparado ao grupo DP.

5.5.2 Efeito da corticosterona sobre a via de sinalização intracelular de $TGF\beta$

Não detectamos diferença significativa na fosforilação de Smad2 entre os grupos avaliados (Figura 14). Embora os resultados obtidos sejam muito semelhantes, observamos um discreto aumento dos níveis de Smad2 fosforilada nos animais submetidos ao desmame precoce (DP) em relação ao grupo amamentado (A). O tratamento com RU486, por sua vez, induziu respostas contrárias de acordo com a condição alimentar dos filhotes. Animais amamentados apresentaram um sutil aumento de fosforilação de Smad2 após o tratamento (ARU), enquanto os filhotes submetidos ao desmame precoce mostraram redução nesse parâmetro (DPRU).

Figura 14. Efeito do RU486 sobre a ativação da via de sinalização das Smads. Níveis de fosforilação de Smad2 na mucosa gástrica de animais de 17 dias de vida pós-natal dos grupos amamentado (A), amamentado tratado com RU486 (ARU), desmame precoce (DP) e desmame precoce tratado com RU486 (DPRU). As amostras foram obtidas por raspagem da mucosa gástrica. 30 µg de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (gradiente 5-20%)-SDS, transferidas e processadas para revelação com ECL. A Densidade Óptica Integrada (IOD) foi normalizada com os resultados de β -actina e analisada em relação ao grupo amamentado. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão. (n) representa o número de animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O desmame precoce representa uma condição de estresse aos animais em desenvolvimento pós-natal, devido à separação materna, que priva os filhotes do cuidado da mãe, e causa abrupta mudança de dieta. Em decorrência desse estado adverso, os animais ficam susceptíveis a alterações no crescimento e desenvolvimento. No presente estudo, investigamos as variações dos níveis plasmáticos de corticosterona ao longo do desmame precoce e o papel desse hormônio no controle da proliferação celular no estômago de ratos, do qual podem ainda fazer parte os fatores de crescimento $TGF\alpha$ e $TGF\beta$. Por essa razão, analisamos também a influência da corticosterona sobre a concentração protéica de $TGF\alpha/EGFR$ e de $TGF\beta1$ e $TGF\beta3$ na mucosa gástrica. E, por último, verificamos a ativação das vias de sinalização desses fatores de crescimento.

Dentre as respostas imediatas ao desmame precoce, destaca-se a variação da taxa de crescimento corpóreo, refletida pela massa dos animais. A avaliação diária desse parâmetro revelou que, já a partir do segundo dia de experimentação, os filhotes submetidos ao desmame precoce estavam menores que os animais em amamentação. A redução observada está de acordo com estudos prévios, que demonstraram que durante os primeiros dias da mudança de dieta, o ganho de peso é comprometido e não se equipara ao observado nos animais em amamentação (Lin et al., 1998; Ogias et al., 2010a; Osaki et al., 2010). Entretanto, sabe-se que uma semana após o início da nova dieta, a massa corpórea torna-se semelhante àquela observada em filhotes mantidos com a mãe (Gama e Alvares, 2000). A fim de investigarmos o papel da corticosterona sobre os diversos processos envolvidos no crescimento, administramos a mifepristona (RU486) para bloquear a ação hormonal, e observamos que o tratamento não afetou a massa corpórea dos filhotes em nenhum dos grupos avaliados, sugerindo que esse hormônio pode não ter uma ação direta como fator anorexigênico ou orexigênico. Entretanto, a exclusão da corticosterona não descarta a participação de outros hormônios e moléculas, como GH, ghrelina e IGF-I, na regulação da massa (Kuhn et al., 1990).

Como mencionado acima, o desmame precoce se caracteriza como uma situação de estresse ao animal e, como tal, induz a secreção de corticosterona. Por meio de radioimunoensaio, detectamos que as concentrações plasmáticas desse

hormônio variam em torno de 60 a 80 ng/mL nos filhotes em amamentação, em consonância ao descrito para ratos nessa fase do desenvolvimento pós-natal (Gama e Alvares, 1998; Ogias et al., 2010b; Ramaley, 1972; Tinnikov, 1993). Entretanto, observamos um expressivo aumento dos níveis de corticosterona a partir do segundo dia de desmame precoce, o qual persistiu de maneira uniforme até o fim da experimentação, no 18º dia. Estudos conduzidos por Lee e Lebenthal (1983) e Lin et al. (1998, 2001) também demonstraram que o desmame precoce induz a secreção de corticosterona nos dias subsequentes ao seu início. Contudo, esses últimos autores observaram o restabelecimento dos níveis basais do hormônio no 18º dia, o que não foi constatado em nosso estudo. Além de provocar a secreção de corticosterona, diferentes estudos sugerem que o estresse induzido pela privação do cuidado materno afeta a memória, a cognição e a liberação de outros hormônios (Kuhn et al., 1990; Pohorecky, 1990; Rockman et al., 1987). No entanto, a mudança no padrão alimentar pode caracterizar um agente estressor igualmente importante na regulação funcional de órgãos como o estômago (Gama e Alvares, 1998; Lin et al., 2001; Ogias et al., 2010b).

Sabe-se que o desenvolvimento da mucosa gastrintestinal é controlado por muitos fatores (De Andrade Sá et al. 2008; Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar et al. 2005), que incluem o tipo de dieta (Osaki et al., 2010) e a ação de glicocorticoides (Johnson, 1985, Ogias et al., 2010b). Estes influenciam os eventos da cinética celular que compõe o crescimento, dentre os quais está a proliferação celular. No presente estudo, avaliamos a atividade proliferativa do epitélio gástrico, enquanto outros aspectos como diferenciação e morte celular estão sendo analisados paralelamente em nosso laboratório. Observamos que a manipulação da dieta por meio do desmame precoce estimula a proliferação celular. Este efeito havia sido descrito anteriormente (Gama e Alvares, 2000; Osaki et al., no prelo) e alguns fatores de regulação foram atribuídos a esse tipo de resposta. Dentre eles, podemos citar: a retirada do leite, considerado elemento modulador do crescimento epitelial por conter inúmeras moléculas que tem ação sobre a proliferação celular (Koldovský et al., 1995; Letterio et al., 1994; Playford et al., 1999; Xu, 1996); a diminuição do receptor T β RI (Ogias et al., 2010a), e finalmente o aumento de expressão e atividade do EGFR (Osaki et al., no prelo), receptor relacionado diretamente a condições hiperproliferativas. No entanto, demonstramos que durante o desmame precoce houve um aumento importante na concentração de corticosterona

plasmática, e como este hormônio é considerado um agente fundamental na regulação do desenvolvimento pós-natal de vários órgãos, inclusive do trato gastrointestinal, avaliamos sua ação por meio da administração de RU486, um antagonista de glicocorticoides, como mencionado anteriormente. Além disso, a comparação do efeito do RU486 nas diferentes dietas, amamentação e desmame precoce, nos permitiu aprofundar as observações sobre o papel da interação entre o alimento e a corticosterona no tecido epitelial gástrico.

Verificamos que o RU486 induziu o aumento da proliferação celular, tanto em ratos amamentados quanto submetidos ao desmame precoce. Ao considerarmos que por meio do RU486 promovemos o bloqueio e/ou diminuição da ação direta da corticosterona plasmática, esses resultados indicaram que o hormônio circulante tem efeito antiproliferativo sobre o epitélio gástrico sob qualquer dieta. Entretanto, quando avaliamos o grau de amplificação em cada grupo, notamos que o efeito do tratamento foi mais expressivo nos animais em amamentação, os quais apresentaram uma elevação de 81,7% no IS, em comparação aos 44,2% observados após o desmame precoce. Desse modo, durante o desenvolvimento pós-natal, essa variação de amplitude de resposta parece ser de fato dependente do tipo de dieta e poderia refletir as diferenças quanto à disponibilidade da corticosterona. Ogias et al. (2010b) demonstraram que o jejum, ou seja a privação do alimento, causa o aumento na concentração plasmática de corticosterona, porém concomitantemente leva à maior capacidade de ligação da CBG em filhotes, diminuindo a disponibilidade hormonal e o trânsito de GR ao núcleo. Um quadro semelhante poderia estar estabelecido no desmame precoce, se o tomarmos como um agente estressor para o qual encontramos altos níveis plasmáticos de corticosterona. Embora ainda não tenhamos informações sobre a cinética da atividade hormonal no desmame precoce, devemos considerar que, durante o desenvolvimento pós-natal, vários mecanismos são acionados para diminuir ou retardar a ação de glicocorticoides induzidos por estresse numa tentativa de atenuar seus efeitos deletérios (Sapolsky e Meaney, 1986). Por essa razão, o bloqueio da ação do hormônio teve um efeito mais pronunciado nos animais em amamentação, nos quais é possível que a corticosterona, mesmo em menor concentração plasmática, esteja mais ativa que em filhotes desmamados precocemente.

O papel dos glicocorticoides na inibição da proliferação celular gastrointestinal foi bastante estudado em modelos *in vitro* ou com administração de diferentes

esteroides sintéticos a animais de laboratório (Buts et al., 1983; Eastwood et al., 1981; Kuwayama e Eastwood, 1988; Luo et al., 2007). Durante o desenvolvimento pós-natal, demonstrou-se que o tratamento com corticosterona reduz a proliferação celular, aumenta o tempo de duplicação das células, interferindo na cinética epitelial, e induz apoptose na mucosa gástrica de ratos em fase de amamentação (Gama e Alvares, 1998; Gama et al., 2000). Luo et al. (2007) observaram ainda que a dexametasona inibe a proliferação celular promovida por EGF em cultura de células epiteliais gástricas, porém o efeito inibitório é completamente revertido pela administração de RU486. Assim, podemos considerar que o glicocorticoide exógeno, que é livre da regulação por CBG, promove a inibição da proliferação celular no epitélio gástrico, enquanto a corticosterona endógena, sujeita a um controle interno, tem sua ação modulada dependendo da idade e tipo de estresse. Dessa forma, durante a fase de amamentação, a corticosterona, seja aquela produzida pela glândula supra-renal ou aquela oriunda do leite materno (Brummelte et al., 2010; Zhawa et al., 2008), teria também a função de impedir o crescimento descontrolado da mucosa gástrica, mantendo a proliferação celular em taxas normais. Neste quadro, o RU486 limitaria esse efeito, permitindo o aumento dos índices proliferativos.

Outra resposta ao tratamento com RU486 que pode ser indicativa de uma função da corticosterona no crescimento foi detectada na determinação do compartimento proliferativo no epitélio gástrico. Alvares e Gama (1993) relataram a presença de células em proliferação distribuídas ao longo de toda a glândula gástrica durante as primeiras três semanas de vida pós-natal em ratos. Posteriormente, demonstraram que o desmame precoce desloca esse compartimento para a região de istmo/colo, como descrito para a mucosa gástrica de animais adultos (Gama e Alvares, 2000). Nesse estudo, observamos que o tratamento com RU486 alterou o efeito do desmame precoce, ao retardar a organização das células-tronco em direção à região do istmo/colo e permitir a redistribuição das células em proliferação ao longo da extensão da glândula gástrica. Esses resultados sugerem que a corticosterona, além de ter efeito inibitório sobre a proliferação celular, também é capaz de regular o tamanho e a posição do compartimento proliferativo dentro do epitélio gástrico. Estaria o microambiente das células-tronco (Mills et al., 2002) também comprometido?

A ação dos glicocorticoides sobre a proliferação das células epiteliais pode ocorrer via GR (Ogias et al., 2010b) ou de forma indireta, mediada por fatores de crescimento (Miyata et al., 2008; Ogias et al., 2006). O desmame precoce induz um aumento na expressão e distribuição de TGF α e EGFR na mucosa gástrica de ratos, e neste quadro, a inibição da atividade de EGFR reduz o estímulo da proliferação celular, sugerindo uma função direta do receptor sobre a cinética epitelial do estômago (Gama e Alvares, 2000; Osaki et al., no prelo). Em vista desses resultados, investigamos se a ação da corticosterona sobre a proliferação celular durante o desmame precoce poderia ocorrer por meio da regulação da concentração tecidual de TGF α e EGFR. Assim, utilizando o tratamento com RU486, observamos que tanto aos 17 quanto aos 18 dias de vida pós-natal não houve alteração dos níveis desses peptídeos e da distribuição do receptor no epitélio gástrico. É importante ressaltar que, a partir deste ponto, nosso estudo se ateve às duas idades, uma vez que já havíamos demonstrado que as alterações do sistema TGF α /EGFR ocorrem no 17º dia e influenciam a proliferação e a diferenciação no 18º dia (Osaki et al., 2010, no prelo).

Nossos resultados confirmaram que o desmame precoce eleva os níveis proteicos de TGF α , porém esse aumento não é perturbado pelo bloqueio da ação da corticosterona, o que nos sugere que este hormônio não influencia a concentração do peptídeo gástrico. Essa dissociação parece ocorrer de modo independente da dieta, uma vez que também não encontramos modificações nos filhotes amamentados. Em conjunto, podemos sugerir que a expressão de TGF α no epitélio gástrico é regulada pelo tipo de dieta, e a corticosterona não participa diretamente deste processo.

Quanto à concentração protéica de EGFR, não detectamos diferenças entre os grupos, tanto em relação à condição alimentar quanto à ação da corticosterona. Apesar do aparente conflito com as variações detectadas para o TGF α , esse resultado foi também observado por Osaki et al. (2010), que demonstraram o aumento de distribuição desse receptor durante o desmame precoce apenas por meio de imuno-histoquímica. No entanto, é plausível que a sinalização mediada por EGFR seja modificada por sua ativação, e não por sua concentração protéica, como descrito por Scheving et al. (2007).

Na complexa regulação dos eventos envolvidos na cinética celular no epitélio gástrico, a família do TGF β também tem atuação crítica. Em nosso estudo observamos inicialmente que os níveis proteicos de TGF β 1 foram reduzidos no desmame precoce, sendo essa variação significativa apenas no 17º dia de vida pós-natal. Já o TGF β 3 não foi afetado pela manipulação da dieta. Dessa forma, os níveis teciduais de TGF β 1 foram alterados aos 17 dias, enquanto no 18º dia não houve qualquer variação de TGF β 1 ou TGF β 3. Essas observações concordam com a descrição anterior (Ogias et al., 2010a) que demonstrou que a expressão de TGF β 3 é apenas modificada em filhotes em desmame precoce que foram submetidos ao jejum alimentar. De forma semelhante, mostrou-se que alterações na expressão de TGF β no intestino delgado são transitórias durante a fase de desmame (Mei e Xu, 2005). Assim, em conjunto, podemos considerar que a alteração abrupta da dieta afeta a concentração de TGF β 1 nos primeiros dias de tratamento, e que após este período, durante um estresse crônico, somente um agente estressor agudo pode alterar a expressão desse fator de crescimento. Além disso, a variação de magnitude de resposta entre o 17º e o 18º dia pode indicar a mudança no perfil de resposta do epitélio gástrico à dieta.

Ainda neste quadro, a diminuição de TGF β 1 aos 17 dias antecede o aumento dos índices proliferativos, o que pode corroborar a ideia de que as isoformas de TGF β fazem parte do mecanismo de controle da proliferação celular no epitélio gástrico (De Andrade Sá et al., 2008; Ogias et al., 2010a). A função inibitória do TGF β 1 foi bastante explorada anteriormente, e demonstrou-se que esse peptídeo tem papel fundamental no controle do crescimento gastrintestinal (De Andrade Sá et al., 2008; Playford et al., 1999; Rokutan et al., 1998).

A redução da ação da corticosterona por meio do tratamento com RU486 não afetou os níveis de TGF β 1 e TGF β 3, tanto nos animais amamentados quanto submetidos ao desmame precoce. Essa observação reforça a hipótese de que a corticosterona circulante pode não ser um agente determinante na regulação da concentração dos fatores de crescimento na mucosa gástrica, enquanto o tipo de alimento teria um papel decisivo. Almawi e Irani-Hakime (1998) salientaram que os glicocorticoides e o TGF β afetam aspectos da proliferação, diferenciação e função celular. No entanto, os efeitos do hormônio sobre esse fator de crescimento não são uniformes, e a indução, supressão ou falta de efeito dos glicocorticoides sobre o

TGF β depende do tecido estudado e o status de ativação celular. Nesse sentido, pode haver diferença também entre a ação da corticosterona, o hormônio secretado pela supra-renal, e glicocorticoides sintéticos administrados em terapias. Novamente, devemos mencionar a diferença de sensibilidade dos tecidos às duas fontes hormonais. De qualquer forma, a interação entre glicocorticoides e o TGF β existe e é amplamente discutida (Alvares et al., 2007; Ogias et al., 2006; Oursler et al., 1993; Schaeffer et al., 2000). É preciso ainda determinar se a indução da expressão de TGF β é a principal resposta ou apenas um mecanismo secundário pelo qual os glicocorticoides exercem sua ação antiproliferativa.

A última parte desse estudo se voltou à análise da ativação das vias de sinalização de TGF α e TGF β . Scheving et al. (2007) investigaram os mecanismos que medeiam os efeitos da dexametasona sobre a proliferação celular em culturas primárias de hepatócitos, e concluíram que o glicocorticoide modula a expressão e ativação de receptores da família do EGFR, e sua via de sinalização intracelular. Assim, os autores mostraram que por meio da estabilização da expressão dessas proteínas e diminuição de sua ativação, a dexametasona suprime a fosforilação de ERK e Akt. Em uma sequência de experimentos, Luo et al. (2007, 2008) demonstraram que a dexametasona também reduz a sinalização de ERK1/2 induzida por EGF e FGFb. Cabe lembrar que este esteroide sintético fica disponível para as células por mais tempo que os glicocorticoides secretados e circulantes.

Osaki et al. (no prelo) demonstraram que o desmame precoce induz o aumento da fosforilação de ERK1/2 derivado da ativação de EGFR, e essa resposta pode estar relacionada ao estímulo proliferativo encontrado na mucosa gástrica de ratos. Nossos resultados apontaram também para um aumento de p-ERK após o desmame precoce. Como encontramos um aumento de corticosterona circulante durante a mudança de dieta, e os estudos acima relacionam os glicocorticoides, fatores de crescimento e a via de sinalização por ERK1/2, avaliamos sua fosforilação após o tratamento com RU486, a fim de verificarmos se a corticosterona teria alguma participação na regulação de ERK1/2. Observamos que nessa situação há uma redução significativa na fosforilação de ERK1/2. Esses resultados sugerem que a corticosterona liberada durante o estresse causado pelo desmame precoce deve participar da ativação dessa via. Outro estudo mostrou que durante o jejum, no qual ocorre aumento de corticosterona, também há indução de fosforilação de ERK1/2 no

hipotálamo de camundongos (Ueyama et al., 2004). Assim, embora a disponibilidade de corticosterona e a sensibilidade durante o desmame precoce não estejam determinadas, é interessante notar que alterações na dieta ou no padrão alimentar modificam a via de MAPK.

Curiosamente, o tratamento com RU486 induziu um efeito antagônico nos animais em amamentação, os quais apresentaram um aumento, apesar de não significativo, da fosforilação de ERK1/2. Novamente, devemos mencionar que nos animais alimentados normalmente os níveis de corticosterona são basais, e o bloqueio da ação hormonal pode levar a respostas diferentes daquelas observadas após a mudança de dieta.

Outro aspecto relevante a ser discutido é a participação da via Ras-MAPK no controle da proliferação celular da mucosa gástrica no desmame precoce. Como já mencionado, Osaki et al. (no prelo) demonstraram que o bloqueio de EGFR induz redução da fosforilação de ERK1/2, seguida por uma diminuição na proliferação celular no epitélio gástrico. Nesse mesmo estudo, os autores também observaram o possível envolvimento da via de Src no controle desse processo celular. O EGFR ativa uma variedade de cascatas de sinalização intracelular, e é crível que a regulação da proliferação celular no epitélio gástrico não ocorra por uma via exclusiva. A redução da fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com RU486 faz sentido quando consideramos os estudos mencionados acima sobre a relação da corticosterona com a via de MAPK, porém o paralelismo entre baixos níveis teciduais de p-ERK e estímulo proliferativo é paradoxal. Neste momento, consideramos que duas hipóteses podem ser propostas: 1) a redução da atividade da corticosterona poderia também ter ativado uma via de sinalização alternativa para o controle da proliferação celular *in vivo*, como um mecanismo compensatório, e/ou 2) ao reduzirmos o efeito da corticosterona, a via de ação direta por meio do GR ficaria suprimida, permitindo o estímulo proliferativo, enquanto MAPK teria um papel secundário.

Por fim, avaliamos a participação das Smads, proteínas responsivas às isoformas de TGF β . Observamos que os níveis proteicos de Smad2 fosforilada não foram alterados pelo tipo de dieta e pelo tratamento com RU486. Resultados semelhantes foram obtidos e discutidos em nosso laboratório para filhotes submetidos ao desmame precoce (Ogias et al., 2010a). Apesar da ausência de resposta para a Smad2, não podemos ainda descartar a ocorrência de modificações

de ativação dessa via no modelo estudado, uma vez que constatamos uma redução na expressão de TGF β 1 em animais submetidos ao desmame precoce. É importante ressaltar que a mudança de dieta pelo desmame precoce se constitui em um tratamento longo, e o ponto de coleta escolhido em nosso estudo pode não ter coincidido com o momento de regulação da ativação da via, que se caracteriza por eventos celulares rápidos (De Andrade Sá et al., 2008; Schmierer e Hill, 2005).

Em conjunto, esses resultados indicam que a corticosterona endógena não é capaz de regular a expressão dos fatores de crescimento TGF α e TGF β no epitélio gástrico. Nesse sentido, o aumento da proliferação celular após o tratamento com RU486, nos animais amamentados e submetidos ao desmame precoce, pode ter ocorrido pela retirada do efeito inibitório, e direto, do GR sobre o ciclo celular, do qual se destaca a modulação negativa da expressão de moléculas críticas para a transição G1-S, como ciclina D1, cdk4 e c-myc (Miyata et al., 2008; King e Cidlowski, 1998). Ressaltando essa ação direta, Ogias et al. (2010b) demonstraram que, em animais adultos, o estresse induzido pela privação alimentar está associado a um decréscimo da expressão de ciclina D, cdk4 e p21, com o concomitante aumento de p27 que, em conjunto, determinam a resposta proliferativa inibitória no epitélio gástrico.

Os resultados obtidos nesse estudo estão resumidos na figura 15.

Figura 15. Esquema dos resultados obtidos nesse estudo.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, constatamos que:

- 1) O desmame precoce eleva a concentração plasmática de corticosterona;
- 2) A corticosterona circulante tem efeito antiproliferativo sobre a mucosa gástrica;
- 3) O mecanismo de ação da corticosterona sobre a proliferação celular não ocorre por meio da regulação dos níveis proteicos de $TGF\alpha$ e $TGF\beta$;
- 4) O padrão alimentar modula a concentração tecidual de $TGF\alpha$ e $TGF\beta$ 1;
- 5) A corticosterona é capaz de ativar a via de sinalização MAPK/ERK durante o estresse desencadeado pelo desmame precoce.

Estes resultados nos levam a sugerir que a ação supressora da corticosterona sobre a proliferação celular deve ocorrer de forma direta, e ser modulada pelo padrão alimentar.

Figura 16. Proposta de vias de regulação da proliferação celular do epitélio gástrico durante o desmame precoce.

REFERÊNCIAS ¹

Akritopoulou-Zanze I, Patel JR, Hartandi K, Brenneman J, Winn M, Pratt JK, Grynfarb M, Goos-Nisson A, Von Geldern TW, Kym PR. Synthesis and biological evaluation of novel, selective, nonsteroidal glucocorticoid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(9):2079-82.

Aherne MA, Campelton MR, Wright NR. Introduction to population cell kinetics. London: Edward Arnold; 1977.

Almawi WY, Irani-Hakime N. The antiproliferative effect of glucocorticoids: is it related to induction of TGF-beta? *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(10):2450-2.

Alvares EP, Gama P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26(8):869-73.

Alvares EP, Jordão LR, Gama P. Differential distribution of transforming growth factor beta and receptors in the hyper or hypoproliferative gastric mucosa of developing and adult rats. *Histol Histopathol*. 2007;22(2):147-53.

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.

Alvares EP. The effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day old suckling rat. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(6):641-9.

Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*. 1993;75(4):671-80.

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

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

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2010 Nov 13].

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

Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ Jr. Localization of transforming growth factor alpha and its receptor in gastric mucosal cells. Implications for a regulatory role in acid secretion and mucosal renewal. *J Clin Invest.* 1989;84(3):1017-23.

Beck CA, Estes PA, Bona BJ, Muro-Cacho CA, Nordeen SK, Edwards DP. The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology.* 1993;133(2):728-40.

Bittencourt DH. Esquema ilustrando os mecanismos de ação do GR. Vancouver, CA; 2010.

Björkqvist M, Dornonville de la Cour C, Zhao CM, Gagnemo-Persson R, Håkanson R, Norlén P. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. *Regul Pept.* 2002;108(2-3):73-82.

Blanchette F, Day R, Dong W, Laprise MH, Dubois CM. TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest.* 1997;99(8):1974-83.

Bluth RF, Carpenter HA, Pittelkow MR, Page DL, Coffey RJ. Immunolocalization of transforming growth factor alpha in normal and disease human gastric mucosa. *Human Pathol.* 1995;26(12):1333-40.

Booth D, Haley JD, Bruskin AM, Potten CS. Transforming growth factor-B3 protects murine small intestinal crypt stem cells and animal survival after irradiation, possibly by reducing stem-cell cycling. *Int J Cancer.* 2000;86(1):53-9.

Boyle JT, Koldovský O. Critical role of adrenal glands in precocious increase in jejunal sucrose 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.

Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif*. 2004;37(1):35-53.

Brummelte S, Schmidt KL, Taves MD, Soma KK, Galea LA. Elevated corticosterone levels in stomach milk, serum, and brain of male and female offspring after maternal corticosterone treatment in the rat. *Dev Neurobiol*. 2010;70(10):714-25.

Buts JP, De Meyer R, Kolanowski J. Ontogeny of cell proliferation and DNA synthesis in rat colon: role of glucocorticoids. *Am J Physiol*. 1983;244(5):G469-74.

Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*. 1997;48:129-56.

Chen A, Laskar-Levy O, Koch Y. Selective expression of neuropeptides the rat mammary gland: somatostatin gene is expressed during lactation. *Endocrinology*. 1999;140(12):5915-21.

Ciacchi C, Lind SE, Podolsky DK. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology*. 1993;105(1):93-101.

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

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000;141(11):4255-61.

De Andrade Sá E, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. *Regul Pept*. 2008;146(1-3):293-302.

De Andrade Sá ER, Jordão LR, Takahashi CA, Alvares EP, Gama P. Ontogenic expression of TGFbeta 1, 2, and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. *Dev Dyn*. 2003;227(3):450-7.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.

Donovan SM, Odle J. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Ver Nutr.* 1994;14:147-167.

Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem.* 1995;270(18):10618-24.

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

Dvorak B, Williams CS, McWilliam DL, Shinohara H, Dominguez JA, McCuskey RS, Philipps AF, Koldovsky O. Milk-borne epidermal growth factor modulates intestinal transforming growth factor-alpha levels in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2000;47(2):194-200.

Eastwood GL, Quimby GF, Laferriere JR. Effects of chronic steroid ingestion on gastroduodenal epithelial renewal in the rat. *Cell Tissue Kinet.* 1981;14(4):405-11.

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

Filaretova L, Bagaeva T, Makara GB. Aggravation of nonsteroidal antiinflammatory drug gastropathy by glucocorticoid deficiency or blockade of glucocorticoid receptor in rats. *Life Sci.* 2002;71(21):2457-68.

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

Fleshner M, Deak T, Spencer RL, Laudenslanger ML, Watkins LR, Maier SF. A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology.* 1995;136(12):5336-42.

Fujisawa T, Kamimura H, Hosaka M, Torii S, Izumi T, Kuwano H, Takeuchi T. Functional localization of proprotein-convertase furin and its substrate TGFbeta in EGF receptor-expressing gastric chief cells. *Growth Factors.* 2004;22(1):51-9.

Gama P, Alvares EP. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation in the gastric epithelium of suckling rats. *J Gastroenterol.* 1998;33(1):32-38.

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, Moraes JCB, Alvares EP. Cell proliferation and death in the gastric epithelium of developing rats after glucocorticoid treatments. *Anat Rec.* 2000;260(3):213-21.

Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin DB. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells.* 1997;15(3):190-7.

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

Goldberg JR, Plescia MG, Anastasio GD. Mifepristone (RU 486): current knowledge and future prospects. *Arch Fam Med.* 1998;7(3):219-22.

Gunin AG, Nikolaev DV. Effect of acute and chronic glucocorticoid treatments on epithelial cell proliferation in the esophagus and small intestine of rats. *J Gastroenterol.* 1999;34(6):661-7.

Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* 1997;75(1):21-41.

Helander HF. The cells of the gastric mucosa. *Intl 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.

Holt PG, Oliver IT. Plasma corticosterone concentrations in the perinatal rat. *Biochem J.* 1968;108(2):339-41.

Hormi K, Onolfo JP, Gres L, Lebraud V, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor α in the upper digestive tract and pancreas of the rat. *Regul Pept.* 1995; 55(1):67-77.

Inman GJ. Linking Smads and transcriptional activation. *Biochem J.* 2005;386(Pt 1):e1-e3.

Itóh S, Landström M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P. Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem.* 1998;273(44):29195-201.

Jahnke GD, Lazarus LH. A bombesin immunoreactive peptide in milk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(2):578-82.

Johanssen S, Allolio B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(5):561-9.

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

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

Kamimura H, Konda Y, Yokota H, Takenoshita S, Nagamachi Y, Kuwano H, Takeuchi T. Kex2 family endoprotease furin is expressed specifically in pit-region parietal cells of the rat gastric mucosa. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 1):G183-90.

Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Takeuchi T, Chiba T. TGF α inhibits apoptosis of murine gastric pit cells through an NF- κ B-dependent-pathway. *Gastroenterology.* 2001;121(1):56-67.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cells and pinpointing of the stem cells. *Anat Rec.* 1993;236(2):259-79.

Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat Rec.* 1993;236(2):314-32.

Kelly EJ, Newell SJ, Brownice KG, Farmery SM, Cullinane C, Reid WA, Jackson P, Gray SF, Primrose JN, Lagopoulos M. Role of epidermal growth factor and transforming growth factor α in the developing stomach. *Arch Dis Child*. 1997;76(2):F158-162.

King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:601-17.

Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994;8(2):133-46.

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

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

Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech*. 2001;52(4):354-62.

Konturek PC, Ernst H, Brzozowski T, Ihlm A, Hahn EG, Konturek SJ. Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor α after exposure of rat gastric mucosa to stress. *Scand J Gastroenterol*. 1996; 31(3):209-16.

Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev Psychobiol*. 1990;23(5):395-410.

Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*. 1993;143(1):3-9.

Kumar V, Bustin SA, McKay IA. Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int*. 1995;19(5):373-388.

Kumegawa M, Takuma T, Hosoda S, Kunii S, Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Biochim Biophys Acta*. 1978;543(2):243-50.

Kuwayama H, Eastwood GL. Effects of parenteral hydrocortisone sodium succinate on epithelial renewal in hamster gastric mucosa. *Dig Dis Sci*. 1988;33(9):1064-9.

Lack J, O'Leary JM, Knott V, Yuan X, Rifkin DB, Handford PA, Downing AK. Solution structure of the third TB domain from LTBP1 provides insight into assembly of the large latent complex that sequesters latent TGF-beta. *J Mol Biol.* 2003;334(2):281-91.

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 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.

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

Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, Naumann U, Wagenknecht B, Garten W, Weller M, Platten M. Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1,2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *J Immunol.* 2001;166(12):7238-43.

Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science.* 1994;264(5167):1936-8.

Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta.* 2005;359(1-2):189-94.

Li G, Wang S, Gelehrter TD. Identification of glucocorticoid receptor domains involved in transrepression of transforming growth factor-beta action. *J Biol Chem.* 2003;278(43):41779-88.

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

Liu T, Feng XH. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. *Biochem J*. 2010;430(2):191-8.

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.

Luo JC, Lin HY, Lu CL, Wang LY, Chang FY, Lin HC, Huang YC, Ng KM, Chi CW, Lee SD. Dexamethasone inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(7):841-9.

Mahajan DK, London SN. Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril*. 1997;68(6):967-76.

Massagué J. Identification of receptors for type-beta transforming growth factor. *Methods Enzymol*. 1987;146:174-95.

Massagué J. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*. 1996;85(7):947-50.

Massagué J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem*. 1990;265(35):21393-6.

Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(5):605-22.

Mei J, Xu RJ. Transient changes of transforming growth factor-beta expression in the small intestine of the pig in association with weaning. *Br J Nutr*. 2005;93(1):37-45.

Milani S, Calabró A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech*. 2001;53(5):360-71.

Mills JC, Andersson N, Hong CV, Stappenbeck TS, Gordon JI. Molecular characterization of mouse gastric epithelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):14819-24.

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.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J*. 1991;10(5):1091-101.

Moeser AJ, Ryan KA, Nighot PK, Blikslager AT. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(2):G413-421.

Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2001;108(4):601-9.

Nakajima N, Kuwayama H. Stimulatory effect of transforming growth factor-alpha on gastric epithelial cell migration through proliferation. *J Clin Gastroenterol*. 1995;21 (Suppl 1):S45-9.

Nanthakumar NN, Dai D, Meng D, Chaudry N, Newburg DS, Walker WA. Regulation of intestinal ontogeny: effect of glucocorticoids and luminal microbes on galactosyltransferase trehalase induction in mice. *Glycobiology*. 2005;15(3):221-32.

Ogias D, Bitencourt B, Alvares EP, Gama P. Corticosteroids induce the differential expression of TGFbeta isoforms, receptors and signaling in the gastric mucosa of suckling rats. *Regul Pept*. 2006;135(1-2):17-22.

Ogias D, de Andrade Sá ER, Alvares EP, Gama P. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI 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):117-25.

Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, Colosetti P, Engström U, Heldin CH. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19482-8.

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

Osaki LH, Figueiredo PM, Alvares EP, Gama P. TGF α and EGFR are involved in the control of gastric cell proliferation through the activation of MAPK and Src signaling pathways in early-weaned rats. *Cell Proliferation*. In press.

Oursler MJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology*. 1993;133(5):2187-96.

Parekh TV, Gama P, Wen X, Demopoulos R, Munger JS, Carcangiu ML, Reiss M, Gold LI. Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Res*. 2002;62(10):2778-90.

Pecci A, Alvarez LD, Veleiro AS, Ceballos NR, Lantos CP, Burton G. New lead compounds in the search for pure antiglucocorticoids and the dissociation of antiglucocorticoid effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;113(3-5):155-62.

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

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

Penttila IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S21-5.

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Gramates P, Deuel TF. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(7):2229-33.

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):397-416.

Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Calnan DP, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad RA, Marchbank T. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut*. 1999;44(5):653-8.

Pohorecky LA. Interaction of ethanol and stress: research with experimental animals - an update. *Alcohol Alcohol*. 1990;25(2-3):263-76.

Raja RH, Paterson AJ, Shin TH, Kudlow JE. Transcriptional regulation of the human transforming growth factor-alpha gene. *Mol Endocrinol*. 1991;5(4):514-20.

Ramaley JA. Changes in daily serum corticosterone values in maturing male and female rats. *Steroids*. 1972;20(2):185-97.

Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzymes secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development*. 2007;134(1):211-22.

Rhodes JA, Tam JP, Finke U, Sauders M, Bernanke J, Silen W, Murphy RA. Transforming growth factor alpha inhibits secretion of gastric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(11):3844-46.

Rockman GE, Hall A, Markert L, Glavin GB. Early weaning effects on voluntary ethanol consumption and stress responsivity in rats. *Physiol Behav*. 1987;40(5):673-6.

Rokutan K, Yamada M, Torigoe J, Saito T. Transforming growth factor-beta inhibits proliferation and maturation of cultured guinea pig gastric pit cells. *Am J Physiol*. 1998;275(3 Pt 1):G526-33.

Romano M, Krauss ER, Boland CR, Coffey RJ. Comparison between transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in the protection of rat gastric mucosa against drug-induced injury. *Ital J Gastroenterol*. 1992;26(5):223-8.

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.

Saqui-Salces M, Neri-Gomez T, Gamboa-Dominguez A, Ruiz-Palacios G, Camacho-Arroyo I. Estrogen and progesterone receptor isoforms expression in the stomach of Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol*. 2008;14(37):5701-6.

Schaeffer C, Hahold C, Martin E, Lignot JH, Keding M, Foltz-Jourdainne C. Cytokine expression in rat colon during postnatal development: regulation by glucocorticoids. *Gastroenterology*. 2006;130(4):439-50.

Scheving LA, Buchanan R, Krause MA, Zhang X, Stevenson MC, Russell WE. Dexamethasone modulates ErbB tyrosine kinase expression and signaling through multiple and redundant mechanisms in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(3):G552-9.

Shanks N, Lightman SL. The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J Clin Invest.* 2001;108(11):1567-73.

Shinohara H, Williams CS, McWilliams DL, Koldovský O, Phillips AF, Dvorak B. Transforming growth factor-alpha delays gastric emptying and small intestinal transit in suckling rats. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36(4):356-60.

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.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1987;105(3):1039-45.

Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992;119(5):1017-21.

Schmierer B, Hill CS. Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):9845-58.

Sukhotnik I, Shteinberg D, Ben Lulu S, Bashenko Y, Mogilner JG, Ure BM, Shaoul R, Shamian B, Coran AG. Transforming growth factor-alpha stimulates enterocyte proliferation and accelerates intestinal recovery following methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat and a cell culture model. *Pediatr Surg Int.* 2008;24(12):1303-11.

Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):171-81.

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

Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K, Tarnawski AS. TGF-beta signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(1):3-13.

Tinnikov AA. On the role of corticosteroid-binding globulin (CBG) in modulating activity of glucocorticoids: developmental patterns for CBG, corticosterone, and a-fetoprotein levels in the rat serum. *Jpn J Physiol.* 1993;43(2):247-51.

Troyer KL, Luetke NC, Saxon ML, Qiu TH, Xian CJ, Lee DC. Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF- α . *Gastroenterology.* 2001;121(1):68-78.

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

Tseng CC, Schmidt KL, Johnson LR. Hormonal effects on development of the secretory apparatus of chief cells. *Am J Physiol.* 1987;253(3 Pt 1):G274-83.

Tsukada S, Ichinose M, Tatematsu M, Tezuka N, Yonezawa S, Kakei N, Matsushima M, Miki K, Kurokawa K, Kageyama T, et al. Glucocorticoids inhibit the proliferation of mucosal cells and enhance the expression of a gene for pepsinogen and other markers of differentiation in the stomach mucosa of the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;202(1):1-9.

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.

Tsutsumi S, Tomisato W, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T. Transforming growth factor- β 1 is responsible for maturation-dependent spontaneous apoptosis of cultured gastric pit cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(6):402-11.

Ueyama E, Morikawa Y, Yasuda T, Senba E. Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett.* 2004;371(1):40-4.

Wahl SM. Transforming growth factor β : the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med.* 1994;180(5):1587-90.

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

Woodward CJH, Hervey GR, Oakey RE, Whitaker EM. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br J Nutr.* 1991;66(1):117-27.

Xiao ZQ, Li J, Majumdar AP. Regulation of TGF- α -induced activation of AP-1 in the aging gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(2):G396-403.

Xiao ZQ, Majumdar AP. Increased in vitro activation of EGFR by membrane-bound TGF- α from gastric and colonic mucosa of aged rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):G111-6.

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

Yeh KY, Du FW, Holt PR. Endogenous corticosterone rather than dietary sucrose as a modulator for intestinal sucrase activity in artificially reared rat pups. *J Nutr.* 1986;116(7):1334-42.

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.

Zahwa H, Yorty JL, Bonneau RH. Elevated maternal corticosterone during lactation hinders the neonatal adaptive immune response to herpes simplex virus (HSV) infection. *Brain Behav Immun.* 2008;22(3):339-53.

Zhu L, Hatakeyama J, Zhang B, Makdisi J, Ender C, Forte JG. Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(2):G185-95.