ANA PAULA ZEN PETISCO FIORE

**REGULAÇÃO DE P27 PELO FATOR DE CRESCIMENTO
TRANSFORMANTE $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS
LACTENTES**

Tese apresentada para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências pelo programa de pós-
graduação em Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo.

São Paulo

2013

ANA PAULA ZEN PETISCO FIORE

**REGULAÇÃO DE P27 PELO FATOR DE CRESCIMENTO
TRANSFORMANTE $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS
LACTENTES**

Tese desenvolvida junto ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

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

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Fiore, Ana Paula Zen Petisco.

Regulação de p27kip1 pelo fator de crescimento transformante β 1 (TGF β 1) na mucosa gástrica de ratos lactentes. / Ana Paula Zen Petisco Fiore. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Gama.

Tese (Doutorado) – 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: Mecanismos que atuam sobre a proliferação e morte celular no epitélio gástrico e intestinal.

Versão do título para o inglês: Transforming Growth Factor β 1 Regulates p27Kip1 Post translational Levels in the Gastric Mucosa of Suckling Rats.

1. Mucosa gástrica 2. Desenvolvimento pós-natal 3. Jejum
4. Fatores de crescimento 5. Ciclo celular 6. Ratos I. Gama, Profa. Dra. Patrícia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB017/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Paula Zen Petisco Fiore.

Título da Tese: Regulação de p27kip1 pelo fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) na mucosa gástrica de ratos lactentes.

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Gama.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA-ICB/USP - 052/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 80/11/CEUA, datado de 05.07.11 e por solicitação da Profa. Dra. **Patrícia Gama**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Ana Paula Petisco Zen Fiore** ao Projeto de Pesquisa "Papel de hormônios e fatores de crescimento na mucosa gástrica de ratos submetidos ao desmame precoce", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 30 de novembro de 2011.

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

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Guido e Eny, pelo amor incondicional e apoio sem medir esforços. Aos meus irmãos Caio e Fulvia que sempre me apoiaram, incentivaram e foram meus maiores críticos. Às minhas tias Beth e Maria Inês, por serem meus exemplos de pessoas boas e fortes. E aos meus avós, por me deixarem a herança mais valiosa.

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Prof^a Dr^a Patrícia Gama, que me recebeu em seu laboratório e me proporcionou a experiência mais importante da vida, nestes dois anos me ensinou a ter amor e confiança em meu trabalho, respeito pelos meus colegas e a respeitar e aceitar minhas limitações, assim como as limitações de outros.

"Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça.

Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo, com amor.

Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende.

E mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar.

Porque descobri, que no caminho incerto da vida o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Patrícia Gama, pela confiança em meu trabalho, ensinamentos, dedicação, cuidado, competência e profissionalismo exemplares.

À minha família, pelo apoio, incentivo e nunca me deixarem desanimar.

Aos queridos amigos do laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos, pela amizade e carinho, por criarem um ambiente favorável para a construção do conhecimento e pelo companheirismo. À Camila por nossas inúmeras discussões, sempre construtivas. À Daniela, pelos conselhos valiosos. À Juliana, pelo apoio constante. À Luciana, pelo apoio, disponibilidade e ensinamentos. À Adriane, Larissa e Vitor, pelo apoio. À Eunice, Heloisa, Natália e Priscila pela amizade, mesmo de longe. Ao Cruz Alberto M Rigonati, pelo suporte técnico.

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

À Prof^a Dr^a Glaucia Maria Machado-Santelli, pela amizade, livre acesso às dependências de seu laboratório e dicas valiosas no meu exame de qualificação.

À Prof^a Dr^a Vanessa de Freitas, pela amizade e dicas valiosas no meu exame de qualificação.

À Prof^a Dr^a Estela M. A. F. Bevilacqua, pela amizade e por permitirem o livre acesso às dependências de seu laboratório.

Ao Prof Dr Anselmo Moriscot, por gentilmente ceder o anticorpo para Ubiquitina.

À Prof^{as} Dr^{as} Alison Coulquhon, Chao Yun Irene Yan, Maria Inês Borella, Marinilce Fagundes, pela amizade.

Ao Prof Dr Victor Arana Chavez e Prof Dr Jarbas Arruda Bauer pela amizade.

À Dra Leslie I Gold pelas dicas valiosas e pela discussão enriquecedora.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Braz Melo, Claudio Cabado e Fernando G Araújo, pelo cuidado com os animais e ajuda para manejá-los.

Aos queridos Alex, Julio e Murilo do laboratório de Biologia Molecular da Tiróide, pela amizade, apoio e dividirem um pouquinho do seu conhecimento comigo.

Às minhas amigas Eloiza, Tatiani e Vivian, do laboratório de Biologia Oral pela grande amizade, afago e apoio.

Aos meus queridos Bianca, Julia, Juliette, Marianna, Natalia e Isabellinha, Pablo, Pauline e Guido, Rafael, Ricardo, Thainer e Talone, amigos que me apoiaram e me fazem uma pessoa mais feliz.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela amizade, por serem sempre muito solícitos e principalmente pelos momentos de descontração.

À Eva A. S. Oliveira, Monica S. Amaral e Tereza S Mayor pela revisão deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq por minha bolsa de estudo e financiamento dos estudos do laboratório.

A todos diretamente ou indiretamente envolvidos neste trabalho.

RESUMO

FIGURE A. P. Z. P. **Regulação de p27^{kip1} pelo fator de crescimento transformante β 1 (TGF β 1) na mucosa gástrica de ratos lactentes** (Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). 2013 f. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2013.

A ingestão de leite é essencial para o desenvolvimento pós-natal do estômago e, curiosamente, durante o período de aleitamento, o jejum estimula a proliferação celular do epitélio gástrico. Estudos anteriores mostram que o TGF β 1 inverte esta resposta, inibindo o processo proliferativo, e que a proteína p27 está envolvida em tal mecanismo. Os níveis de p27 oscilam durante o ciclo celular, devido à variação entre síntese e degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, e o encaminhamento da p27 para este processo depende da fosforilação na treonina 187. Diferentes estudos relatam que o TGF β pode aumentar a concentração de p27 por meio do controle de sua degradação. Este estudo visa analisar o efeito do jejum e do TGF β 1 na regulação de p27 no epitélio gástrico de ratos lactentes. Para tanto, filhotes de ratos Wistar de 14 dias foram submetidos ao jejum durante 90min e tratados com TGF β 1 ou PBS, administrada por gavagem. As amostras de mucosa gástrica foram coletadas após 0h, 2h e 14h de tratamento. Analisamos a concentração proteica de p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 por meio de Western blot, e observamos que durante o jejum houve a diminuição de p27 e Cdh1 ($p < 0,05$), paralelamente ao aumento de fosfo-p27^{thr187} e Skp2 ($p < 0,05$). Por outro lado, o tratamento com TGF β 1 reverteu os efeitos do jejum em 2h e 14h para todas as proteínas analisadas ($p < 0,05$). Para comprovarmos o papel do TGF β 1, utilizamos um anticorpo específico e notamos que os níveis de p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 foram mantidos semelhantes ao controle, mesmo quando o anticorpo foi administrado juntamente ao peptídeo TGF β 1, sugerindo a reversão da resposta ao TGF β 1. A seguir, para verificarmos a influência de TGF β 1 na síntese proteica, bloqueamos a síntese proteica através da injeção intraperitoneal de cicloheximida e tratamos os animais com TGF β 1 ou PBS. Observamos que não houve alteração dos níveis de p27 e Skp2. No entanto, quando o bloqueio foi feito concomitante a administração com TGF β 1 houve a redução de Cdh1. Dando sequência, analisamos a influência de TGF β na degradação de p27, para isso, imunoprecipitamos a proteína e avaliamos a presença da cauda de

ubiquitina. Verificamos que o jejum aumentou a ubiquitinação de p27, e administração de TGF β 1 reverteu este efeito. Finalmente, acompanhamos a degradação de p27 na mucosa gástrica de filhotes em jejum e tratados com TGF β 1 ou PBS por 30min. Para o ensaio, as amostras foram coletadas após 1min, 30min, 3h, 6h e 20h. Observamos que nos filhotes em jejum, a degradação de p27 aumentou após 30min, enquanto nos animais tratados com TGF β 1, essa resposta só foi detectada após 3h. Nossos resultados demonstram que o jejum promove a desestabilização p27 através do estímulo e manutenção de Skp2. E, sobretudo, nesta fase, o TGF β exógeno reverte esses efeitos do jejum e estabiliza p27, através do controle negativo de Skp2 e positivo de Cdh1. Concluimos que o fator de crescimento TGF β presente no leite materno participa ativamente da homeostase do tecido gástrico em desenvolvimento e da coordenação da proliferação celular durante a fase de aleitamento.

Palavras-chave: Mucosa gástrica, TGF β 1, p27, Skp2, Cdh1, Sistema ubiquitina proteassoma.

ABSTRACT

FIORE A. P. Z. P. **Transforming growth factor β 1 regulates p27^{Kip1} post translational levels in the gastric mucosa of suckling rats** [Ph.D Thesis in Cell and Tissue Biology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2013

Milk intake is essential for the stomach postnatal development, and curiously during suckling period fasting stimulates gastric epithelial cell proliferation. Previous studies showed that TGF β 1 reverse this response, by inhibiting the hyperproliferative response, and that p27 has a role in this mechanism. p27 levels oscillate during cell cycle, due to the variation between its synthesis and degradation by the proteasome, which depends on the recognition of phosphorylated p27 for ubiquitination. Different studies report that TGF β 1 may increase p27 concentration through the control of its degradation. The present study aims to analyze the effects of fasting and TGF β 1 treatment on p27 levels in the gastric mucosa of suckling rats. To that, 14 d-old Wistar rats were fasted for 90 min and received a single dose of TGF β 1 or PBS, administered by gavage. Samples were collected after 0h, 2h and 14h. We evaluated the protein concentration of p27, phospho-p27^{thr187}, Skp2 and Cdh1 by Western blot, and we observed that during fasting both p27 and Cdh1 were decreased ($p < 0.05$), while phospho-p27^{thr187} and Skp2 were increased ($p < 0.05$). On the other hand, TGF β 1 administration reversed fasting effects for all these proteins. In order to confirm the role of TGF β 1, we administered a specific antibody against the peptide and noticed that p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 and Cdh1 levels were maintained at control levels, even when the antibody was given together with TGF β 1. Subsequently, to evaluate TGF β 1 influence on protein synthesis, we blocked it through intraperitoneal injection of cycloheximide followed by TGF β 1 or PBS administration. We observed no alterations on both p27 and Skp2 levels. However, we found a reduction on Cdh1 concentration when protein synthesis was blocked concomitantly to TGF β 1. In addition, we analyzed TGF β 1 influence on p27 degradation, firstly we immunoprecipitated p27 and evaluated the presence of the ubiquitin tag on the different samples. We observed that fasting increased p27 ubiquitination, while TGF β 1 administration reverted this effect. Finally, we followed p27 degradation in the gastric mucosa of fasted animals treated with TGF β 1 or PBS for 30min. Samples was collected

after 1min, 30min, 3h, 6h e 20h. We verified that fasting increased p27 degradation after 30min, while in samples of TGF β 1 treated animals this response was only detected after 3h. Our results show that fasting promotes p27 destabilization through Skp2 induction and maintenance. And, mainly, during this period exogenous TGF β reversed fasting effects stabilizing p27, by negatively controlling Skp2 and increasing Cdh1. We concluded that milk born TGF β actively participates of the developing gastric tissue homeostasis and acts on the cell proliferation coordination during suckling periods.

Keywords: Gastric mucosa, TGF β 1, p27, Skp2, Cdh1, Ubiquitin-proteasome system.

LISTA DE ABREVIATURAS

TGF β : fator de crescimento transformante β

EGF: fator de crescimento epidermal

NGF: fator de crescimento neural

TRH: liberador do hormônio tireoideano

TSH: hormônio estimulador da tireoide

GC: glicocorticoide

LHRH: hormônio liberador do hormônio luteinizante

Smads: do inglês *Sma-Mothers Against Decapentaplegic*

BMPs: do inglês Bone Morphogenetic Proteins

T β R: receptor de TGF β

Smurf: do inglês *SMAD Ubiquitin Regulatory Factor*

CDK: quinase dependente de ciclina

Rb: retinoblastoma

CKIs: inibidor de quinase dependente de ciclina

Kip/Cip: proteína inibidora de quinase/ proteína que interage com CDK

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

UPS: sistema ubiquitina-proteassoma

SCF: Complexo Skp, Culina, F-box

APC/C: complexo promotor de anáfase/ ciclossomo

TBS: solução salina tamponada com Tris

PMSF: fenilmetilsulfonil fluorido

BSA: albumina bovina sérica

PBS: salina tamponada com fosfato

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Organização anatômica do estômago de ratos	21
Figura 2- Organização funcional da glândula gástrica do corpo do estômago	23
Figura 3- O ciclo celular é regulado por ciclinas e CDKs	29
Figura 4- Resíduos fosforilados de p27	30
Figura 5- Cinética da concentração da transcrição/tradução em relação aos níveis proteicos de p27 durante o ciclo celular, em relação a atividade do complexo Ciclina-CDK	31
Figura 6- Via de ubiquitinação e degradação proteassomal	32
Figura 7- Complexo multiproteico SCF	33
Figura 8- Atuação de TGF β no controle do ciclo celular, participação de p27	34
Figura 9- Regiões do estômago para coleta	38
Figura 10- Esquema da indução de jejum e tratamento com TGF β 1	39
Figura 11- Esquema do tratamento com anticorpo para TGF β 1	40
Figura 12- Fórmula química da cicloheximida	40
Figura 13- Esquema do tratamento com cicloheximida	41
Figura 14- Determinação da massa corpórea dos animais lactentes de 14 dias	48
Figura 15- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	50
Figura 16- Efeito de TGF β 1 na fosforilação de p27 na treonina 187 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	52
Figura 17- Efeito de TGF β 1 na fosforilação na treonina 187 de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	53

Figura 18- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Ciclina E e CDK2, reguladores da fosforilação p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	54
Figura 19- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Skp2, responsável pelo reconhecimento e promoção da degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	55
Figura 20- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Cdh1, responsável pelo reconhecimento e promoção da degradação de Skp2 e Cks1 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	56
Figura 21- Efeito da neutralização de TGF β 1 na concentração proteica de p27, fosfo-p27 ^{Thr187} , Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica de ratos de 14 dias submetidos ao jejum	58
Figura 22- Efeito da administração de cicloheximida durante o tratamento com TGF β 1 na concentração proteica de p27, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	60
Figura 23- Efeito de TGF β 1 na ubiquitinação de p27, essencial para o reconhecimento e promoção da degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum	61
Figura 24- Efeito do jejum e tratamento com TGF β 1 na degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes submetidos ao jejum	63
Figura 25- Resumo das observações deste estudo	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de anticorpos primários utilizados para a análise da distribuição proteica por <i>immunoblot</i> na mucosa gástrica de ratos submetidos ao jejum e tratados com TGF β 1	45
Tabela 2- Resumo dos resultados obtidos para relação entre p27, fosfo-p27 ^{thr187} , Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos	71
Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos para a relação entre p27, fosfo-p27 ^{thr187} , Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica durante a utilização do anticorpo para a isoforma 1 de TGF β	72
Tabela 4- Resumo dos resultados obtidos pela inibição da síntese proteica pela cicloheximida (ciclo) na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos	73
Tabela 5- Relação entre p27, níveis de fosfo-p27 ^{thr187} , Skp2 e Cdh1, ubiquitinação de p27 e degradação de p27 na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos. Comparação a partir dos resultados apresentados	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Anatomia e histologia do estômago	21
1.2 Formação e maturação das glândulas gástricas	23
1.3 Efeito do jejum na mucosa gástrica	25
1.4 TGFβ e o controle proliferativo	26
1.5 Controle da progressão do ciclo celular	28
1.6 Regulação de p27 em animais submetidos ao jejum	30
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Animais	37
4.2 Tratamento com TGFβ1	38
4.3 Inibição dos efeitos de TGFβ1	39
4.4 Inibição da síntese proteica	40
4.5 Imunoistoquímica	41
4.6 Análise da expressão proteica por <i>Immunoblot</i>	43
4.6.1 Extração de proteínas	43
4.6.2 Imunoprecipitação	43
4.6.3 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e western blot	44
4.6.4 Imunodeteção	45
4.7 Ensaio de degradação de p27	46
4.8 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48

5.1 Massa corpórea dos animais tratados com TGF β 1 durante o jejum em animais lactentes	48
5.2 Efeito do tratamento de TGF β 1 na concentração de p27 durante o jejum em animais lactentes	49
5.3 Efeito do tratamento de TGF β 1 na fosforilação de p27 durante o jejum em animais lactentes	51
5.4 Efeito do tratamento de TGF β 1 na concentração dos reguladores de p27 durante o jejum em animais lactentes	54
5.5 Efeito da neutralização de TGF β 1 na concentração e fosforilação de p27, Skp2 e Cdh1 durante o jejum em animais lactentes	57
5.6 Efeito da inibição da síntese proteica pela cicloheximida	59
5.7 Efeito do jejum e tratamento TGF β 1 na interação p27-Ub	61
5.8 Efeito do jejum e tratamento com TGF β 1 na degradação de p27	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e histologia do estômago

O estômago é uma dilatação do tubo digestório, onde os alimentos sofrem processos enzimáticos para que sejam posteriormente digeridos nos intestinos. O estômago de roedores está dividido em três regiões histologicamente distintas: 1) A córnea, região de comunicação com o esôfago, que é composta por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado; 2) O corpo, região onde ocorre a maior secreção de ácido gástrico, pepsina e hormônios, composta por longas glândulas tubulares; 3) O antro-pilórico onde há a produção de muco alcalino para a neutralização do ácido gástrico e hormônios (Lee, Trasler *et al.*, 1982) (Figura 1).

Figura 1- Organização anatômica do estômago de ratos

O estômago está organizado em regiões que diferem funcionalmente e histologicamente: córnea, corpo e antro (estão indicadas pelas linhas contínuas). As setas indicam o caminho feito pelo bolo alimentar.

Fonte: Fiore (2013).

A mucosa na região do corpo gástrico é organizada em glândulas tubulares que se abrem em fossetas, e são compostas por diferentes populações de células epiteliais com atividades específicas. A glândula gástrica

é a unidade funcional da região do corpo do estômago e no animal adulto compreende três regiões: istmo, colo e base (Figura 2) (Lee, Trasler *et al.*, 1982).

Os tipos celulares se localizam diferencialmente em cada uma das regiões, de forma que na fosseta observa-se a prevalência de células mucosas superficiais que produzem mucina1 e mucina 5AC, componentes do muco que protege a mucosa gástrica; no istmo observam-se figuras mitóticas, e sabe-se que as células- tronco pluripotentes, responsáveis pela renovação do epitélio gástrico localizam-se na interface desta região com o colo; neste, observa-se grande quantidade de células mucosas do colo, responsáveis pela produção de mucina 1 e mucina 6, componentes do muco mais viscoso; na região da base observa-se a prevalência de células zimogênicas, basófilas, produtoras de pepsinogênio, que em contato com o ácido gástrico converte-se em pepsina; por toda a extensão da glândula são observadas células parietais que apresentam a bomba H^+/K^+ -ATPase na membrana plasmática para liberar prótons H^+ para o lúmen gástrico, e este juntamente com o Cl^- transportado compõe o ácido clorídrico (Figura 2). Além dessas células epiteliais, ainda estão presentes as células enteroendócrinas, responsáveis pela produção de hormônios, entre os quais se destaca a ghrelina, (Helander, 1981; Lee, Trasler *et al.*, 1982; Date, Kojima *et al.*, 2000; Khurana e Mills, 2010; Mills e Shivdasani, 2011).

Figura 2- Organização funcional da glândula gástrica do corpo do estômago.

A mucosa gástrica de indivíduos adultos é representada pela região da fosseta (F) e região glandular (G). Esta última está dividida em istmo, colo e base. As células mucosas superficiais ficam na abertura da glândula (F); células-tronco pluripotentes localizam-se na interface istmo-colo; células mucosas no colo são observadas no colo, e células zimogênicas (basófilas) estão na região basal da glândula. As células parietais que são grandes, acidófilas e tem cromatina frouxa distribuem-se ao longo de toda a glândula.

Fonte: Adaptado de Simões (1992) e Junqueira & Carneiro (2008)

1.2 Formação e maturação das glândulas gástricas

O processo de formação e maturação das glândulas gástricas, no rato, estende-se do final da fase pré-natal até o desmame. Durante este período inicial, o epitélio glandular cresce rapidamente e existe uma elevada taxa de proliferação, e uma baixa taxa de diferenciação celular em toda a extensão da glândula (Alvares e Gama, 1993), diferentemente do observado na mucosa adulta, onde a concentração de células proliferativas é restrita à interface entre istmo e colo (Mills e Shivdasani, 2011).

O desenvolvimento normal da mucosa gástrica depende da combinação entre proliferação, migração, diferenciação, maturação e morte celular. Desde a

fase fetal até as três primeiras semanas de vida pós-natal, ocorrem modificações intensas que resultam na formação das glândulas gástricas (Alvares e Gama, 1993; Alvares, 1994). Em ratos, observou-se que em fetos de 17 dias, o estômago é revestido por epitélio pseudoestratificado e a partir do 18º dia, inicia-se a diferenciação celular e formação de uma mucosa rudimentar; nos 19º e 20º dias de vida fetal, as células epiteliais migram em direção ao mesênquima, e nota-se a formação de dobras indicativas da formação glandular, o tecido epitelial torna-se simples com células colunares (Alvares, 1994; Goldfeder e Alvares, 2001).

No primeiro dia de vida pós-natal do rato, o estômago apresenta glândulas rasas e células imaturas, e entre 15 e 21 dias, período que representa a fase de desmame, há diferenciação e amadurecimento das células gástricas; após o 21º dia, as células estão diferenciadas e organizadas nas glândulas (Lee, Trasler *et al.*, 1982; Karam e Leblond, 1992) (Figura 2). É importante ressaltar que durante toda essa fase ocorre o início da produção endógena de peptídeos como o fator de crescimento transformante β (TGF β), fundamentais para controlar a maturação e o desenvolvimento do estômago (De Andrade Sa, Jordao *et al.*, 2003).

Assim, durante o primeiro mês de vida, tanto o crescimento intenso quanto a renovação celular constante são essenciais para manutenção de todo trato gastrointestinal (Wong e Wright, 1999). No estômago, a proliferação e diferenciação celular são controladas por diversos fatores, entre eles o estado nutricional, moléculas presentes no leite, a microbiota luminal e o programa genético (Lee e Lebenthal, 1983; Nanthakumar, Dai *et al.*, 2005; Osaki, Curi *et al.*, 2010; Osaki, Figueiredo *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que as etapas do desenvolvimento morfofisiológico gástrico são paralelas às variações da dieta, e desde o primeiro dia de vida, o animal entra em contato com o colostro e o leite materno, que permanece como única fonte de alimentação durante as duas primeiras semanas pós-natais. A partir do 14º dia, ocorre a substituição gradual do leite por ração e nesta etapa o filhote passa outras mudanças como a abertura dos olhos e crescimento dos dentes, o que lhe dá capacidade para começar a lamber e roer a ração deixada na caixa pela mãe. Após 28 dias, o desmame é naturalmente completo, porém para animais em biotério o

desmame é padronizado no 21º dia, quando a ninhada é separada da mãe (Henning, 1981; 1986).

A amamentação marca o primeiro contato dos filhotes com o alimento. O leite materno é rico em gorduras e seu principal carboidrato é a lactose, mas este alimento também contém vários peptídeos biologicamente ativos como o fator de crescimento epidermal (EGF), o TGF β , o fator de crescimento neural (NGF), insulina, prolactina, somatostatina, o hormônio liberador do hormônio tireoideano (TRH), o hormônio estimulador da tireóide (TSH), glicocorticoides (GCs) entre outros (Koldovský, 1989; Penttilä, Van Spriel *et al.*, 1998). Acredita-se que os componentes do leite funcionam como um suprimento inicial para o filhote até que a produção endógena atinja concentrações adequadas (Smith e Ojeda, 1984; Gama e Alvares, 1996; Penttilä, Van Spriel *et al.*, 1998).

1.3 Efeito do jejum na mucosa gástrica

Diversos estudos no nosso laboratório mostram que distúrbios na amamentação do lactente promovem um aumento significativo na proliferação e da diferenciação de células da glândula gástrica (Alvares e Gama, 1993; Gama e Alvares, 1998; Osaki, Curi *et al.*, 2010; Osaki, Figueiredo *et al.*, 2011), evidenciando um papel importante do leite como agente controlador do desenvolvimento normal da mucosa.

Alvares (1992) e Alvares e Gama (1993), submeteram animais de diferentes idades ao jejum, que representa a privação total de alimento, e observaram que durante a fase de amamentação e durante na transição para alimentação mista, ocorre um forte estímulo da proliferação celular no epitélio gástrico. Aos 21 dias, fase do desmame, o jejum não tem efeitos sobre a renovação epitelial e, no entanto, aos 30 dias, quando a ingesta é exclusivamente constituída por alimento sólido, ocorre inibição da proliferação celular após o jejum. Essa variação sugere um papel importante do tipo de alimento no controle das respostas proliferativas da mucosa (Alvares e Gama, 1993). Mais recentemente, descrevemos que os filhotes submetidos ao jejum apresentam redução nos níveis de TGF β 3, esse evento poderia estar

relacionado ao quadro hiperproliferativo promovido durante este estado nutricional. Em contrapartida, animais adultos submetidos ao jejum apresentam um quadro hipoproliferativo, com aumento de TGF β 3 e p27 (Alvares, Jordão *et al.*, 2007; Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010).

Em adição, observamos que durante a fase de amamentação, o efeito estimulante do jejum é revertido quando os animais são tratados com LHRH ou somatostatina, ambos os hormônios presentes no leite (Gama e Alvares, 1996). Outro estudo mais recente mostrou que o tratamento com TGF β 1 durante o jejum promove a fosforilação e translocação nuclear das R-Smads, e também leva à redução da proliferação, além de induzir a apoptose no epitélio gástrico (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

1.4 TGF β e o controle proliferativo

O TGF β é um fator de crescimento inibitório em células epiteliais, que faz parte de uma grande família, que inclui Inibinas, Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) e Activinas. Estes fatores de crescimento apresentam ação autocrina, quando as células produtoras têm receptores para TGF β , e parácrina, quando o TGF β produzido age em células vizinhas. Em mamíferos existem três isoformas descritas de TGF β (TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3), sendo a mais estudada, a isoforma TGF β 1. Alterações da responsividade aos efeitos inibitórios do TGF β são investigadas em diversos tipos de tumores, doenças cardíacas, síndromes e doença de Alzheimer (Massagué e Xi, 2012; Rubio-Perez e Morillas-Ruiz, 2012)

O efeito do TGF β é desencadeado após sua ligação com o receptor serina/treonina do tipo II (T β RII), que ativa e recruta o receptor do tipo I (T β RI). Essa ativação gera a fosforilação da R-Smad (Smad2/3), que se liga à Co-Smad (Smad4) formando um complexo que é translocado para o núcleo e atua como fator de transcrição de genes específicos (Alexandrow e Moses, 1995; Massague, 2000). Além das R-Smads e da Co-Smad, outra proteína, a I-Smad (Smad7) tem papel importante na cascata ao inibir a fosforilação da R-Smad pelo T β RI, e atuar no bloqueio da formação do complexo R-Smad-Co-Smad

(Heldin, Miyazono *et al.*, 1997). A Smad7 ainda interage com proteínas Smurf, que promovem a degradação das proteínas da cascata de sinalização do TGF β (Ebisawa, Fukuchi *et al.*, 2001).

Estudos em nosso laboratório mostraram que a mucosa gástrica expressa as isoformas de TGF β e seus receptores ao longo do desenvolvimento peri e pós-natal (De Andrade Sa, Jordao *et al.*, 2003). A administração de hidrocortisona aumenta a concentração de TGF β 1 concomitante à diminuição de TGF β 2 (Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010); quando filhotes em desmame precoce são submetidos ao jejum, observamos um aumento dos níveis teciduais de TGF β 3 e do receptor T β RI, sugerindo que essa família de fatores de crescimento é influenciada por hormônios e pelo padrão alimentar (Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010).

Dentre os efeitos desencadeados pelo TGF β em células epiteliais, está o bloqueio da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular, graças à regulação de Ciclina D/E e suas unidades catalíticas CDK4/6 e CDK2 (Laiho, Decaprio *et al.*, 1990; Ewen, Sluss *et al.*, 1993; Geng e Weinberg, 1993). O TGF β ainda inibe a fosforilação e inativação da proteína Rb, impedindo que esta se ligue a E2F, o que aprisiona a célula na fase G1 do ciclo celular (Laiho, Decaprio *et al.*, 1990). Além disso, o TGF β induz o aumento de expressão das proteínas inibidoras de quinases dependentes de Ciclinas (CKIs), que se ligam ao complexo Ciclina/CDK, impedindo a progressão do ciclo celular (Koff, Ohtsuki *et al.*, 1993; Liu e Preisig, 1999; Nagahara, Ezhevsky *et al.*, 1999; Donovan, Rothenstein *et al.*, 2002).

Em alguns tipos de carcinomas foi observado que a R-Smad (mediadora central da resposta antiproliferativa do TGF β) é fosforilada por CDK2 e CDK4 *in vivo* e *in vitro*. A fosforilação de Smad3 pela CDK inibe a atividade transcricional e função antiproliferativa, e assim pode contribuir para a tumorigênese de carcinomas refratários aos efeitos inibitórios de TGF β (Matsuzaki, Kitano *et al.*, 2009).

1.5 Controle da progressão do ciclo celular

O ciclo celular é composto por quatro fases distintas: a fase G1; a fase de síntese de DNA ou fase S; a fase G2; e finalmente, a fase M, onde há a divisão celular. As células que entram em quiescência estão na fase G0. A duração de cada fase vai depender do tipo celular e da necessidade de reposição (Alberts, Bray *et al.*, 2009).

Ciclins são proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular, que agem por meio da ativação de quinases dependentes de ciclins (CDK), e apresentam oscilações de concentração durante as diferentes fases do ciclo. Essas proteínas atuam através da interação e ativação de CDKs, e os complexos formados, que têm atividade enzimática, são responsáveis por diversos eventos ao longo do ciclo celular. Desta forma, a expressão coordenada, modificações pós-traducionais e degradação das Ciclinas e CDKs são essenciais para o mecanismo de regulação (Alberts, Bray *et al.*, 2009).

A fase G1 é definida como um intervalo entre a mitose e a fase de síntese de DNA (S), e para a maioria das células é um intervalo longo, no qual a célula cresce e prepara a maquinaria para a próxima fase. Durante o final da fase G1, a Ciclina D associa-se a CDK4 ou CDK6 e promove a transição entre as fases G1 e S, que por sua vez, é controlada pela formação do complexo Ciclina E-CDK2 (Koff, Ohtsuki *et al.*, 1993; Zetterberg, Larsson *et al.*, 1995; Satyanarayana e Kaldis, 2009).

Na fase S inicia-se a síntese de DNA, e nessa etapa o complexo formado e ativado é composto por Ciclina A-CDK2, que além de estimular a duplicação dos cromossomos também controla a transição S/G2. Para entrada da célula em divisão, as Ciclinas A e B formam complexos com CDK1 e induzem a entrada da célula em mitose, que representa a divisão celular propriamente dita. A degradação das Ciclinas A e B e a inativação da CDK1 são responsáveis pelo retorno da célula à fase G1 (Satyanarayana e Kaldis, 2009).

A regulação do complexo Ciclina-CDK pode ser realizada por proteínas inibidoras de quinases dependentes de Ciclinas (CKIs), que pertencem a duas

famílias: as INK4 que são as proteínas p15, p16, p18 e p19; e as Kip/Cip que compreendem as proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}. As CKIs se ligam aos complexos Ciclina-CDK e inibem a atividade catalítica de forma específica, e como exemplo pode-se citar a ação da p27 no complexo Ciclina E-CDK2 ou a interação de p16 no complexo formado pela Ciclina D-CDK4/6 (Lu e Hunter, 2010).

Outros mecanismos também participam da regulação funcional desses complexos; as proteínas RB e RB-like (p130 e p107), controlam a expressão gênica mediada pela família de fatores transcricionais E2F. A RB liga-se a este fator, inativando-o, e dessa forma inibe a expressão da Ciclina E. Quando fosforilada, a proteína RB deixa o E2F livre, permitindo a transcrição de genes necessários à entrada em S (Polager e Ginsberg, 2009). A Figura 3 resume os elementos importantes na regulação do ciclo celular.

Figura 3- O ciclo celular é regulado por ciclinas e CDKs.

Durante todo o ciclo celular os diferentes complexos Ciclina-CDK são ativados, e são responsáveis pela progressão do ciclo celular. Diferentes proteínas podem regular negativamente os complexos formados e retardar ou inibir a passagem de uma fase para outra.

Fonte: Adaptado de Alberts (2009).

1.6 Regulação de p27 em animais submetidos ao jejum

A CKI p27 é uma proteína inibidora de CDK, cujo baixo nível correlaciona-se a um mau prognóstico em tumores humanos (Lloyd, Erickson *et al.*, 1999). A p27 é uma proteína dinâmica que pode ser fosforilada em diferentes sítios, que determinam sua localização intracelular, sua estabilidade e função. Dentre estes sítios, pode-se mencionar: 1) a região C-terminal que contém uma Serina (Ser10) que ao ser fosforilada induz o transporte da p27 do núcleo para o citoplasma, conferindo estabilidade à proteína (Susaki e Nakayama, 2007); 2) uma região rica em cisteína, onde ocorre ligação com as Ciclinas; 3) uma região que contém três tirosinas (Y74, Y88 e Y89), que quando fosforiladas promovem a ligação para inativação de CDKs (Boehm, Yoshimoto *et al.*, 2002; Chu, Sun *et al.*, 2007; Okayama, 2012). A Tirosina 157 pode ser fosforilada por AKT, o que induz a localização citoplasmática de p27 (Shin, Yakes *et al.*, 2002; Viglietto, Motti *et al.*, 2002); 4) na região N-terminal, a p27 pode ser fosforilada na treonina 187, que causa instabilidade e leva à degradação da proteína (Pagano, Tam *et al.*, 1995). Cabe ressaltar que esta fosforilação é promovida pelo complexo Ciclina E/Cdk2; 5) o último sítio contém a treonina 197, que ao ser fosforilada promove a translocação da p27 para o núcleo celular (Figura 4) (Okayama, 2012).

Figura 4- Resíduos fosforilados de p27

Esquema da p27, seus diferentes sítios de fosforilação e respostas celulares.
Fonte: Adaptado de Okayama (2012).

Na mucosa gástrica, a infecção por *H. Pylori* reduz a concentração de p27. Em camundongos infectados e deficientes nessa proteína há maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer (Eguchi, Carpentier *et al.*, 2004; Kuzushita, Rogers *et al.*, 2005). Em linhagens epiteliais normais ou tumorais, o deslocamento de p27 do complexo Ciclina D-CDK4/6 para o complexo Ciclina E-CDK2 caracteriza um dos principais modos de regulação exercido pelo TGF β durante o ciclo celular (Taipale, Tiihonen *et al.*, 2000; Ciarallo, Subramaniam *et al.*, 2002; Zhang, Monkkonen *et al.*, 2002).

Diversos estudos demonstram que a expressão de RNAm de p27 permanece constante ao longo do ciclo celular, enquanto a concentração proteica é variável. Discute-se que a regulação pós-traducional de p27 ocorre por degradação via sistema ubiquitina-proteassoma (Hengst e Reed, 1996; Millard, Yan *et al.*, 1997; Carrano, Eytan *et al.*, 1999; Nguyen, Gitig *et al.*, 1999; Slingerland e Pagano, 2000) (Figura 5).

Figura 5- Cinética da concentração da transcrição/tradução em relação aos níveis proteicos de p27 durante o ciclo celular, em relação à atividade do complexo Ciclina-CDK

Relação da concentração de p27 e atividade de Cdks e os efeitos sobre a progressão do ciclo celular

Fonte: Adaptado de Auld (2006).

O sistema ubiquitina-proteassoma de degradação proteica vem sendo apontado como a forma de regulação pós-traducional da p27 durante a

transição de fases do ciclo celular (Auld, Fernandes *et al.*, 2007). Este sistema de proteólise intracelular está associado a funções chaves no controle celular como transdução de sinal, progressão do ciclo celular e regulação transcricional (Hershko e Ciechanover, 1998) (Figura 6).

Figura 6- Via de ubiquitinação e degradação proteassomal

Passos da via ubiquitina-proteassoma de degradação proteica, essa via é composta por três enzimas: E1 ativa a ubiquitina (Ub) ; E2 reconhece a ubiquitina e a E3 forma uma ligação entre a E2-ubiquitina e a proteína alvo. Após múltiplos ciclos, a proteína alvo ubiquitinada é reconhecida e degradada pelo proteassoma, os peptídeos resultantes desse processo são reutilizados ou degradados pela célula e a ubiquitina é reutilizada no sistema proteassomal

Fonte: Adaptado de Hershko (2005).

Diversos estudos mostram que a degradação da p27 é dependente da fosforilação na treonina 187, isso ocorre durante a transição entre a fase G1 e fase S do ciclo celular, quando há um aumento da formação de complexo Ciclina E-CDK2; esse complexo fosforila a p27 livre na treonina 187, e a fosfo-p27^{thr187} é reconhecida pelo complexo E3 ligase SCF^{Skp2}, para em seguida ser ubiquitinada e degradada via proteassoma 26S (Montagnoli, Fiore *et al.*, 1999; Cardozo e Pagano, 2004). SCF é um complexo multiproteico formado por Skp,

Culina 1 e F-box (SKP2 e CKS1) (Figura 7) que catalisa a ubiquitinação de p27 para a degradação proteassomal (Zheng, Schulman *et al.*, 2002; Hao, Zheng *et al.*, 2005).

No complexo SCF, a proteína Skp2 é a adaptadora (Figura 7) e sua presença é responsável pela especificidade de reconhecimento da proteína a ser ubiquitinada. A atividade desse complexo vai depender da disponibilidade de Skp2, e assim quanto maior sua concentração, mais p27 é reconhecida e degradada (Gstaiger, Jordan *et al.*, 2001; Zheng, Schulman *et al.*, 2002; Auld, Fernandes *et al.*, 2007).

Figura 7- Complexo multiproteico SCF.

O complexo SCF^{Skp2} é formado por Skp1, Culina 1 e F-box (Skp2 e Cks1), liga-se a E2 e é responsável pelo reconhecimento da p27, promovendo a ubiquitinação da mesma
Fonte: Adaptado de Carrano e Pagano (2004).

A Skp2 é reconhecida pelo complexo APC/C^{Cdh1}, que vai promover sua marcação e degradação. A proteína adaptadora do Complexo APC/C é a Cdh1, sua disponibilidade é crucial para a manutenção dos níveis de Skp2, pela degradação via sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) (Skaar e Pagano, 2009). O APC/C foi descrito como um importante regulador de proteínas durante a progressão do ciclo celular (Qiao, Zhang *et al.*, 2010). Além disso, Liu e colaboradores (2007) mostraram que a degradação de Skp2 pelo complexo APC/C^{Cdh1} quando induzida por TGFβ é mediada pela interação física entre Smad3 e APC/C^{Cdh1} (Liu, Wu *et al.*, 2007).

Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum e paralelamente tratados com TGF β 1 apresentaram níveis mais altos de p27 na mucosa gástrica, e essa resposta pode ter contribuído para a reversão da hiperproliferação epitelial bem como para o aumento de apoptose (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

O TGF β 1 do leite é uma importante molécula para o controle da proliferação celular gástrica durante o período de aleitamento (De Andrade Sa, Jordao *et al.*, 2003; Ogias, Bitencourt *et al.*, 2006) e age através da regulação positiva dos níveis de p27 (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

Nossa hipótese é de que o TGF β agiria no controle do desenvolvimento pós-natal gástrico já que aumentaria a estabilidade da p27 (por meio da inibição da sua degradação), e a p27 estável inibiria a formação do complexo Ciclina-CDK, retardando o ciclo celular (Figura 8). Essa ação seria essencial para o controle e manutenção do crescimento celular.

Figura 8- Ação do TGF β no controle do ciclo celular com participação de p27.

Em células epiteliais em cultura, a ativação da via de TGF β leva a fosforilação e da CoSmad (Smad2), este complexo interage com APC/C^{Cdh1} fisicamente. APC/C é responsável pelo reconhecimento e ubiquitinação de Skp2, promovendo a estabilização de p27, inibindo, por fim, o ciclo celular.

Fonte: Fiore (2013).

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da mucosa gástrica de ratos ocorre principalmente no início da vida pós-natal e é controlado por fatores que incluem o estado nutricional e hormônios, provenientes principalmente do leite materno. A privação total de alimento durante o período de aleitamento provoca um forte estímulo proliferativo em células epiteliais gástricas (Alvares e Gama, 1993; Gama e Alvares, 1998), porém o mecanismo de controle do ciclo celular nesta condição permanece pouco esclarecido. Sabemos que o TGF β presente no leite materno reverte os efeitos hiperproliferativos do jejum, aumenta os níveis de p27, inibe a proliferação e promove apoptose e (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

A partir destas e de outras observações da literatura, consideramos ser necessário realizar um estudo detalhado sobre o efeito do jejum no controle pós- traducional de p27 e bem como do papel do TGF β na regulação desses eventos na mucosa gástrica.

3 OBJETIVO

Nosso objetivo foi estudar o efeito do TGF β 1 no controle pós traducional de p27 na mucosa gástrica de ratos durante a fase de desenvolvimento pós-natal.

Os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar a regulação de p27 durante o jejum curto (2 horas) e jejum longo (14 horas);
2. Verificar como TGF β 1 atua na regulação de p27;
3. Analisar a participação do sistema ubiquitina proteossmoa na regulação de p27.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Fêmeas de ratos (*Rattus norvegicus* da linhagem Wistar) foram mantidas em presença de machos por cinco dias para acasalamento. Após esse período as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais e a gestação foi acompanhada até o nascimento das ninhadas, cuja data foi determinada como dia zero. Utilizamos ninhadas com no mínimo cinco e no máximo oito filhotes. Quando necessário, reduzimos as ninhadas a oito filhotes no 3º dia de vida pós-natal. Para todos os experimentos utilizamos animais de 14 dias de vida pós-natal.

Os ratos foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas USP (Protocolo aprovado pela CEUA 80/2011). Os filhotes foram mantidos com as mães a 22 °C, sob ciclo claro/escuro 12/12 h (período de luz 06h00-18h00), com temperatura e exatidão controladas, alimento e água *ad libitum*. No 14º dia pós-natal parte da ninhada foi separada em gaiolas com grades, para evitar coprofagia, e submetida ao jejum (Alvares e Gama, 1993; De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008), durante o qual, água foi oferecida *ad libitum*. Várias ninhadas foram utilizadas e distribuídas nas diferentes condições experimentais.

No modelo utilizado (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008), os filhotes foram inicialmente submetidos ao jejum por 90 minutos e tratados como o descrito a seguir, enquanto os animais do grupo controle (alimentado) foram mantidos com as mães. As amostras gástricas foram coletadas após anestesia com uma solução 1:1 de cloridratos de xilazina e ketamina (0,5 ml/100 g de massa corpórea) (Vetbrands, São Paulo, Brasil) e os filhotes foram eutanasiados com o excesso dessas drogas. A massa corpórea foi determinada no momento da eutanásia.

Após o isolamento do estômago, fez-se o corte na curvatura menor, expondo a mucosa gástrica, e em seguida, o órgão foi esticado sobre uma

placa de cortiça utilizando alfinetes para fixá-los. Após a identificação das regiões gástricas, promovemos a coleta das amostras tanto para fixação (estudos morfológicos) quanto para raspagem (Figura 9). Para extração de proteína total, as amostras foram conservadas em 200 μ L de Salina tamponada com Tris (TBS) 0,02 M com PMSF 0,01 M (Fenilmetilsulfonil fluorido, Merck, Darmstad, Alemanha) a -80°C . Além disso, em experimentos distintos, os estômagos esticados em cortiça foram fixados em formaldeído 10% e então processados e incluídos em parafina.

Figura 9- Regiões do estômago.

Após o isolamento, o estômago dos filhotes foi aberto na curvatura menor, expondo a mucosa gástrica. Os estômagos foram então esticados sobre uma placa de cortiça utilizando alfinetes para fixá-los. É possível identificar as regiões: A- córnea, B- corpo e C- antro.

Fonte: Adaptado de Andrade Sá (2007).

4.2 Tratamento com TGF β 1

O TGF β 1 foi obtido na forma liofilizada (Peprotech, Rocky Hill, CT, USA) e foi reconstituído de acordo com as especificações do fabricante, em uma solução estoque de 0,1 μ g/ μ l em HCl 4 mM contendo 0,1% Albumina Sérica Bovina (BSA). Para todos os experimentos o TGF β 1 foi diluído para uma concentração de 5 ng/ μ l em uma solução veículo de Salina tamponada com fosfato (PBS) e BSA 0,2 mg/ml.

A administração 0,3 ml contendo 45 ng de TGF β 1 (~1,5 ng/ g massa corpórea) ou apenas de veículo foi feita por gavagem utilizando uma seringa e uma agulha específica para este fim (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008). Foi administrada uma dose única de TGF β 1 ou veículo 90 minutos após o início do jejum (Figura 10). As amostras foram coletadas imediatamente (0h) e após

2 e 14h de tratamento e os grupos de tratamento determinados foram: grupo amamentado (mantido com as mães), grupo jejum 0h, grupo jejum + PBS 2h, grupo jejum + TGF β 1 2h, grupo jejum + PBS 14h, grupo jejum + TGF β 1 14h.

Figura 10- Esquema da indução de jejum e tratamento com TGF β 1.

Esquema representativo da administração de TGF β 1 ou veículo e horários de eutanásia dos animais para raspagem da região do corpo gástrico para extração de RNA, proteína e/ou fixação em 10% de formaldeído. Cada grupo foi representado por 4 animais para extração proteica e e 4-5 animais para IHQ. Os experimentos foram repetidos conforme indicado posteriormente em Resultados.

Fonte: Fiore (2013).

4.3 Inibição dos efeitos de TGF β 1

Os efeitos diretos de TGF β 1 foram avaliados por meio da inibição de sua atividade, e para isto utilizamos um anticorpo monoclonal específico para a isoforma do tipo1 (α -TGF β 1, 500 μ g/ml, R&D Minneapolis, MN, USA). Este anticorpo foi administrado na dose de 30 ng/g de massa corpórea (1 μ g /animal) por gavagem, juntamente com o TGF β 1 ou veículo em um volume final de 0,3 ml, 90 minutos após o início do jejum, como descrito anteriormente (item 4.1); o esquema de tratamento dos animais está resumido na Figura 11. As amostras foram coletadas após 2h de tratamento com PBS, TGF β 1, α -TGF β 1 e TGF β 1 combinado com α -TGF β 1.

Figura 11- Esquema do tratamento com anticorpo para TGF β 1.

Esquema representativo da administração de PBS e TGF β 1 (1,5 ng/g) simultaneamente ao anticorpo de TGF β 1 (α -TGF β 1, 30ng/g) e horários de eutanásia dos animais para raspagem da região do corpo gástrico para extração de proteína. Cada grupo foi representado por 4 animais e o experimento foi repetido. Fonte: Fiore (2013).

4.4 Inibição da síntese proteica

Para a avaliação do efeito da inibição da síntese proteica realizamos um tratamento com cicloheximida (Figura 12) (ciclo, Biomol Plymouth Meeting, PA) por injeção intraperitoneal, em paralelo ao tratamento com TGF β 1 e o jejum. Esta droga interfere no processo de translocação do mRNA para o ribossomo, e interrompe a tradução e alongamento da cadeia proteica.

Figura 12- Fórmula química da cicloheximida

A cicloheximida (ciclo), interfere no processo de translocação do mRNA para o ribossomo, interrompendo a tradução e alongamento da proteína.

Fonte: PubChem, NIH (2013)

Utilizamos cicloheximida em dose de 0,3 $\mu\text{g/g}$ de massa corpórea (9 $\mu\text{g/}$ animal), e diluição em 0,1 ml de PBS ou apenas PBS (veículo). A primeira injeção intraperitoneal de cicloheximida ou veículo (PBS) foi realizada 60 minutos após o início do jejum, e a segunda injeção foi administrada imediatamente após do tratamento com TGF β 1 ou PBS. As amostras foram coletadas após 2h de tratamento com PBS+veículo, PBS+ciclo, TGF β 1+veículo, TGF β 1+ciclo

Figura 13- Esquema do tratamento com cicloheximida.

Esquema representativo da administração i.p de cicloheximida (ciclo) (0,3 $\mu\text{g/g}$), e de PBS e TGF β 1 (1,5 ng/g) e horários de eutanásia dos animais para raspagem da região do corpo gástrico para extração de proteína. Cada grupo foi representado por 4 animais.

Fonte: Fiore (2013).

4.5 Imunoistoquímica

Para que p27 seja degradada, esta deve ser fosforilada na treonina 187, pelo complexo Ciclina E-CDK2 no núcleo. Fizemos a localização da p27 fosforilada (fosfo-p27^{thr187}) por imunoistoquímica. Para esses ensaios, os filhotes foram submetidos ao jejum e tratamento com TGF β 1 ou PBS por 2 e 14 horas, como foi descrito no item 4.3.

Os estômagos removidos e abertos, foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%), fixados em formaldeído 10% e mantidos em álcool 70%. Para a inclusão em parafina os tecidos foram submetidos a banhos em álcool em concentrações crescentes e xilol, e por fim embebidos em parafina. Foram feitos corte não seriados com 6,0 μm de espessura e estes foram colocados

em lâminas recobertas com carga positiva (Fisherbrand, Kennesaw, GA, USA). Os tecidos foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcool e mantidos em estufa a 37 °C, *overnight*.

No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes com PBS (0,05 mM), submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com metanol-H₂O₂ 3% e posteriormente submetidos à recuperação antigênica com ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0) em banho-maria em micro-ondas (5 minutos em potência alta – 600W e 5 minutos em potência média – 300W), seguida por resfriamento completo. As ligações não específicas foram bloqueadas com soro coelho 5% (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) em TBS por 30 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e incubadas na presença do anticorpo policlonal de coelho que reconhece a fosfo-p27^{thr187} (2,5 µg/ml, *overnight* a 4 °C, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os tecidos foram então lavados 3 vezes com TBS por 5 minutos, e em seguida incubados por 2 horas a temperatura ambiente em presença do anticorpo secundário biotilado (cabra-anti coelho, Jackson Laboratories) e lavados com TBS (3x de 3 minutos), os tecidos forma incubados com complexo estreptavidina-peroxidase (Jackson Laboratories) em temperatura ambiente por 1 hora.

A atividade da peroxidase foi revelada em presença de 3,3'-diaminobenzidina 0,05% (DAB, DAKO, Glostrup, Denmark) em Tris 50 mM contendo H₂O₂ 3% por 4 minutos no escuro. As lâminas foram lavadas com TBS (3x de 5 minutos) e contracoradas com hematoxilina de Mayer, que evidencia os núcleos celulares. O controle negativo foi incubado com soro no lugar do anticorpo primário.

Para estimar a população celular imunopositiva para fosfo-p27^{thr187}, foi feita a contagem de 1.200 a 1.500 núcleos celulares (epiteliais) marcados e não marcados por animal. A contagem foi feita sob microscópio (Nikon, Tóquio, Japão), utilizando aumento de 100x, e ocular integradora (8x, Kpl 2, Zeiss), que apresenta um retículo com linhas que dividem o campo (região quadrangular com 0,52 mm²) em quatro espaços idênticos. Para a quantificação, identificamos a primeira célula parietal, a fim de determinar o limite entre fosseta e glândula gástrica, e então rastreamos as células epiteliais ao longo

de toda a glândula. O índice de marcação foi determinado pelo número de células positivas/ número de células totais x 100. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (Olympus, Montreal, Canadá), usando o programa Image ProPlus v.5.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

4.6 Análise da expressão proteica por *Immunoblot*

4.6.1 Extração de proteínas

As amostras foram coletadas após 0, 2 e 14 horas de tratamento como descrito anteriormente. O estômago foi aberto na curvatura menor, a mucosa gástrica foi lavada com solução salina 0,9%, e a raspagem da região do corpo foi feita em placa gelada sob microscópio estereoscópico, com auxílio de uma tesoura oftalmológica. O produto raspado foi colocado em um tubo contendo PMSF (10 mM) em TBS 20 mM e mantido a -80 °C.

As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA modificado por Torquati (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 1% e glicerol 10% em Tris HCl 20 mM pH 8,0) contendo inibidores de protease e fosfatase (PMSF 1 mM, benzamidina 1mM, leupeptina 1 mM; aprotinina 1 mM e Na₃VO₄ 1 mM, Sigma) (Torquati, O'rear *et al.*, 2004). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 *g* por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.6.2 Imunoprecipitação

A presença de p27 associada à ubiquitina foi avaliada por meio de imunoprecipitação. Para tanto, 100 µg de proteína total de cada amostra foram incubadas com 1 µg de anticorpo para p27 (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA, EUA) em tampão de lise, em quantidade suficiente para um volume

final de 200 μ l. Em paralelo, *beads* de proteína A-agarose (200 μ l/mg, Santa Cruz) foram pré-clareados por meio de lavagens em tampão de lise, seguidas por pulsos de centrifugação (5.000 rpm) e conservados *overnight* a 4 °C.

No dia seguinte, cada amostra foi incubada com 20 μ l de *beads* de proteína A-agarose por 90 minutos a temperatura ambiente. Depois disso, foram feitas 3 lavagens com tampão de lise intercaladas a centrifugações (pulsos de 5.000 rpm), e a última lavagem foi feita em PBS 5mM. As amostras foram então ressuspensas em tampão de amostra, aquecidas a 100 °C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE em gradiente (5%-20%).

4.6.3 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e western blot

Após a quantificação, determinamos o volume necessário para obter 30 μ g de proteína total, e as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris 0,5 M, SDS 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, β - mercaptoetanol 1%) e mantidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida, as alíquotas foram aplicadas aos poços e fracionadas em gel SDS-PAGE 12% (100 volts por 2 horas) em tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,4 e SDS 0,1%) em aparato de eletroforese vertical miniVE (Hoefer, Holliston, EUA).

As proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) em tampão de transferência (Tris 25 mM glicina 192 mM e metanol 20%) (200 mA, 2 horas a 4°C) em aparato miniVE *blotter* (Hoefer). Após este procedimento, a identificação das bandas proteicas foi feita por coloração das membranas com *Ponceau Red* 0,5%, que foi rapidamente lavado com TBS 20 mM; os géis foram corados com *Comassie Blue*, para avaliar o sucesso da transferência das proteínas para a membrana.

4.6.4 Imunodeteccção

As membranas foram lavadas em TBS 20 mM (pH 7,4) (2x de 10 minutos) e bloqueadas de acordo com a especificidade do anticorpo primário (Tabela 1). A solução de bloqueio seleccionada foi diluída em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TTBS). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) (*overnight* a 4° C), e no dia seguinte foram lavadas com TBS (2x, 5 minutos), TTBS (2x, 5 minutos) e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário correspondente conjugado à peroxidase. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBS e TTBS.

As bandas foram detectadas utilizando o sistema ECL (GE Healthcare), que evidencia a proteína ligada aos anticorpos por quimioluminescência. As membranas foram expostas em filmes de raio-X (MGX Plus, Kodak), e estes foram processados em revelador (Kodak) e fixador (Kodak); após a secagem os filmes foram escaneados em impressora multifuncional (Photosmart, HP). Para realizar a densitometria das bandas, utilizamos o software Image J (1.37v Software, NIH, USA) e obtivemos o resultado como densidade óptica integrada (IOD) em unidades arbitrárias. A expressão proteica semi- quantitativa foi determinada através da leitura da proteína de interesse/ β -actina.

Tabela 1- Relação de anticorpos primários utilizados para a análise da distribuição proteica por *immunoblot* na mucosa gástrica de ratos submetidos à jejum e tratados com TGF β 1

Anticorpo	Marca	Concentração*	Bloqueio/Diluição	origem
Skp2	Santa Cruz	0,4 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Coelho
Cdh1	Calbiochem	0,2 μ g/ml	Leite 5% / TTBS	Monoclonal
Fosfo-p27^{thr187}	AbCam	0,2 μ g/ml	BSA 1% / TTBS	Coelho
Ciclina D1	Santa Cruz	0,2 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Coelho
CDK 4	Santa Cruz	0,2 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Coelho
Ciclina E	Santa Cruz	0,2 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Coelho
CDK 2	Santa Cruz	0,2 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Coelho
p27	BD	0,3 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Monoclonal
p21	Invitrogen	0,2 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Monoclonal
Ub	Boston Biochem	0,2 μ g/ml	BSA 1% e Leite 5% / TTBS	Coelho
β-actina	Sigma	0,01 μ g/ml	Leite 5% / Leite 5%	Monoclonal

*todos os anticorpos foram incubados *overnight* a 4 °C

Fonte: Fiore (2013).

4.7 Ensaio de degradação de p27

Para determinar os efeitos do jejum e do TGF β 1 sobre a degradação proteica de p27, submetemos os filhotes ao tratamento anteriormente descrito (item 4.2), e coletamos amostras após 30 minutos, período no qual ocorre a ativação da via das Smads (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

Realizamos o experimento de acordo com protocolo de Lecanda e colaboradores (2007), e para tanto, as amostras foram coletadas por raspagem, congeladas em N₂ líquido, e mantidas a – 80 °C. Cada uma das amostras foi então, descongelada em gelo e diluída em tampão contendo 50 mM de Tris (pH 8,3), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, com adição de inibidores de proteases (100 μ g/ml de aprotinina, 1 mM de PMSF, e 10 μ g/ml de leupeptina). Os lisados obtidos foram então recongelados. Após novo descongelamento, e completa homogeneização dos lisados, as amostras foram centrifugadas a 10000 X g por 10 minutos. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

Incubamos 200 μ g do lisado em 60 μ l de tampão de degradação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 2 mM, aprotinina 100 μ g/ml, PMSF 1 mM, e leupeptina 10 μ g/ml) em presença de 1 μ g de proteína p27 recombinante (AbCam, Cambridge, MA, EUA) (Pagano, Tam *et al.*, 1995; Lecanda, Parekh *et al.*, 2007). Após cada intervalo de tempo determinado (1min, 30min, 3h, 6h, e 20h), uma alíquota de 10 μ l (30 μ g) do lisado foi coletada e ressuspensa em 20 μ l de tampão de amostra, contendo β -mercaptoetanol, para a interrupção da reação. As amostras foram então congeladas rapidamente em N₂ líquido. Posteriormente, 10 μ l (cerca de 10 μ g) das amostras foram separados em gel de poliacrilamida 12%, e transferidos para uma membrana de nitrocelulose para imunodeteção de p27, como descrito anteriormente (item 4.6.3 e 4.6.4, respectivamente).

4.8 Análise estatística

As amostras foram agrupadas de acordo com os tratamentos e submetidas à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Realizamos análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ para todos os testes realizados.

5 RESULTADOS

5.1 Massa corpórea dos animais tratados com TGF β 1 durante o jejum em animais lactentes

Todos os animais tiveram a massa corpórea avaliada no momento da eutanásia. Observamos que não houve variação entre os filhotes submetidos ao jejum, quando comparamos 0 e 2 horas de tratamento (TGF β 1 ou veículos) em relação ao grupo amamentado controle (Figura 14). No entanto, após 14 horas de jejum, observamos que o grupo tratado com TGF β 1 apresentou uma redução significativa de massa corpórea quando comparado ao início do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 14). Nessa condição, observamos que a diminuição da massa corpórea dos animais tratados com TGF β 1 (14h) foi de 6% e 15% em relação aos animais em jejum 0h e alimentados, respectivamente.

Figura 14- Determinação da massa corpórea dos animais lactentes de 14 dias.

A massa corpórea foi determinada no momento da eutanásia. Os animais de 14 dias foram submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas de PBS ou TGF β . A massa corpórea está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 4 filhotes/grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo jejum 0 h de tratamento. Fonte: Fiore (2013).

5.2 Efeito do tratamento com TGF β 1 na concentração de p27 durante o jejum em animais lactentes

Sabe-se que a ativação da via TGF β 1/Smads é essencial para a diferenciação do epitélio gástrico. Entre os alvos de TGF β 1 está a CKI p27, e desta forma, avaliamos o efeito da administração de TGF β 1 na concentração de p27 na mucosa gástrica (Figura 15).

Inicialmente, investigamos se o jejum poderia regular a concentração proteica de p27 e observamos redução dos níveis em 0 e 2 horas de tratamento, quando comparados com o grupo amamentado ($p < 0,05$) (Figura 15). Esse efeito foi contínuo, e após 14 horas, detectamos níveis proteicos de p27 ainda baixos ($p < 0,05$).

A administração de TGF β 1 reverteu a resposta induzida pelo jejum sobre a concentração de p27. Após 2 horas (desde a gavagem com TGF β 1) detectamos níveis de p27 equivalentes aos do grupo amamentado ($p < 0,05$) e após 14 horas de tratamento com TGF β 1, observamos que a concentração de p27 foi muito aumentada quando comparada ao seu controle, tratado com PBS ($p < 0,05$) (Figura 15).

Figura 15- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Concentração de p27 na mucosa gástrica de animais lactentes amamentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas com TGF β 1 ou PBS. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários específicos para p27 e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A determinação da densidade relativa das bandas foi obtida como p27/ β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 4 animais/grupo. * p<0,05 quando comparado ao grupo alimentado (A), # p<0,05 quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS. Os ensaios foram conduzidos em duplicata técnica.

Fonte: Fiore (2013).

5.3 Efeito do tratamento de TGF β 1 na fosforilação de p27 durante o jejum em animais lactentes

Um passo essencial para a regulação pós-traducional de p27 é a fosforilação na treonina 187 pelo complexo Ciclina E- CDK2, que ocorre na progressão da fase G1-S do ciclo celular. Essa fosforilação resulta no reconhecimento e marcação de p27 para a degradação via proteassoma 26S. Para analisarmos se a regulação de p27 durante o jejum ocorre via degradação de p27, e se o TGF β 1 é capaz de agir sobre esse processo, avaliamos a fosforilação de p27^{thr187} por imunoistoquímica e *immunoblot*.

Após reação específica, a avaliação morfológica mostrou que a fosfo-p27^{thr187} está presente principalmente no núcleo celular e é observada por todo o comprimento da glândula gástrica (Figura 16). Verificamos que o tratamento com TGF β 1 reduziu significativamente o índice de células marcadas em 2 e 14 horas de tratamento quando comparado com o grupo controle correspondente ($p < 0,05$). Além disso, notamos que após 14 horas de jejum houve a redução na marcação para fosfo-p27^{thr187} em relação ao grupo tratado por 2 horas. Após 14 horas de tratamento com TGF β 1, encontramos a menor distribuição de fosfo-p27^{thr187} na mucosa gástrica ($p < 0,05$) (Figura16).

Figura 16- Efeito de TGF β 1 na fosforilação de p27 na treonina 187 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Deteção de fosfo-p27^{thr187} por imunoistoquímica na mucosa gástrica em animais lactentes submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 2 e 14 horas de TGF β 1 ou PBS. O controle negativo da reação foi feito com omissão do anticorpo primário. Na mucosa gástrica estão indicadas (F) fosseta e (G) glândula gástrica. Barra = 25 μ m. O índice de células marcadas (%) está representado como média $\pm$ desvio padrão. (n) número de animais em cada condição. * p < 0,05 quando comparado o jejum+PBS 2h, # p < 0,05 quando comparado ao grupo Jejum + PBS correspondente. Fonte: Fiore (2013).

Após a análise por imunistoquímica, realizamos o *immunoblot* para verificar os níveis de fosforilação da p27^{thr187} nos mesmos períodos usados para a avaliação da concentração de p27 total (Figura 17). Observamos que em 0 horas (90 minutos de jejum), não houve alteração em relação ao grupo alimentado. No entanto, após 2 horas de gavagem com PBS, detectamos um aumento significativo nos níveis de fosfo-p27^{thr187} ($p < 0,05$), e após 14 horas, os níveis estavam equivalentes aos observados nos animais alimentados. A gavagem com TGF β 1 em paralelo ao jejum reduziu a fosforilação de p27^{thr187} após 2 e 14 horas de tratamento, quando comparados aos controles pareados ($p < 0,05$), sendo que em 14 horas foram detectados os menores níveis de fosfo-p27^{thr187} ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17- Efeito de TGF β 1 na fosforilação na treonina 187 de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação da concentração de fosfo-p27^{Thr187} na mucosa gástrica de animais lactentes alimentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas de PBS ou TGF β 1. 30 μ g de proteína total foram resolvidos em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para fosfo-p27^{thr187} e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa das bandas foi obtida como fosfo-p27^{Thr187}/ β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n)= 4 filhotes/grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo alimentado; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS; & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com TGF β 1 por 2h. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

5.4 Efeito do tratamento de TGF β 1 na concentração dos reguladores de p27 durante o jejum em animais lactentes

Já que importantes alterações na concentração de p27 total assim como na fosforilação de p27^{thr187} foram observadas, buscamos avaliar como p27 seria regulada durante o estímulo proliferativo do jejum e como TGF β 1 regularia este processo. Para isso analisamos por *immunoblot* as proteínas do complexo Ciclina E-CDK2, responsáveis pela fosforilação da p27 na treonina 187. Nós observamos que não houve modificação significativa na concentração de Ciclina E e CDK 2 entre os grupos analisados (Figura 18).

Figura 18- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Ciclina E e CDK2, reguladores da fosforilação p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação da concentração de Ciclina E e CDK2 na mucosa gástrica de animais lactentes alimentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas de TGF β 1 ou PBS. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários específicos para Ciclina E, CDK2 e β actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa foi obtida como Ciclina E, CDK2 e β -actina e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 4 filhotes/grupo. Os ensaios foram conduzidos em duplicatas técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

Buscamos então outro regulador da concentração de p27, a proteína Skp2, responsável pelo reconhecimento e ubiquitinação da fosfo-p27^{thr187}. Realizamos *immunoblots* para verificar os níveis de Skp2 nos mesmos

períodos usados para a avaliação da concentração de p27 total. Observamos que em 0 horas (90 minutos de jejum), houve um aumento nos níveis de Skp2 em relação ao grupo alimentado, e essa variação foi progressiva, sendo que os níveis mais altos de Skp2 foram detectados após 14 horas de tratamento com PBS ($p < 0,05$). Em contrapartida, a gavagem com TGF β 1 em paralelo ao jejum reduziu significativamente a concentração de Skp2 após 2 e 14 horas de tratamento em relação aos controles pareados ($p < 0,05$); cabe ressaltar que após 14 horas, detectamos os níveis mais baixo da proteína (Figura 19).

Figura 19- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Skp2, responsável pelo reconhecimento e promoção da degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação da concentração de Skp2 na mucosa gástrica de animais lactentes alimentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas de TGF β 1 ou PBS. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários específicos para Skp2 e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa das bandas foi obtida como Skp2 / β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 3 ou 4 filhotes/grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo alimentado, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

Investigamos também se os níveis da proteína Cdh1, responsável pelo reconhecimento e ubiquitinação de Skp2 foram alterados pelas condições experimentais. Nós observamos que durante o jejum (0 e 2 horas de tratamento), os níveis de Cdh1 foram reduzidos quando comparados ao grupo amamentado ($p<0,05$) (Figura 20). Este efeito foi contínuo, e após 14 horas de tratamento detectamos a concentração mais baixa de Cdh1 ($p<0,05$). A gavagem com TGF β 1 reverteu essa resposta, de forma que após 2 horas de tratamento, encontramos níveis de Cdh1 equivalentes ao observado para o grupo amamentado ($p<0,05$). Após 14 horas de administração de TGF β 1, verificamos que a concentração de Cdh1 aumentou quando comparada ao respectivo controle ($p<0,05$) (Figura 20).

Figura 20- Efeito de TGF β 1 na concentração proteica de Cdh1, responsável pelo reconhecimento e promoção da degradação de Skp2 e Cks1 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação da concentração de Cdh1 na mucosa gástrica de animais lactentes amamentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 0, 2 e 14 horas de TGF β 1 ou PBS. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários específicos para Cdh1e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa das bandas foi obtida como Cdh1/ β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 3 ou 4 filhotes/grupo. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo alimentado, # $p<0.05$ quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS. Ensaio conduzido em duplicata técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

5.5 Efeito Neutralização de TGF β 1 na concentração e fosforilação de p27, Skp2 e Cdh1 durante o jejum em animais lactentes

Para avaliarmos o efeito direto de TGF β 1 na regulação da concentração e fosforilação de p27 na mucosa gástrica, utilizamos um anticorpo para neutralizar de forma específica a isoforma 1 de TGF β .

Em relação à p27, observamos que o TGF β 1 aumentou o nível da CKI quando comparado ao grupo controle (jejum+ PBS) ($p<0,05$) (Figura 21), conforme esperado e demonstrado acima. A administração exclusiva do anticorpo manteve constante o nível de p27 em relação ao grupo controle, porém quando o α -TGF β 1 foi usado juntamente com o peptídeo, a concentração de p27 foi restaurada também para os níveis do grupo controle (Figura 21), indicando uma reversão (não significativa) do efeito do TGF β 1.

Além disso, analisamos a fosforilação de p27 na treonina 187 e observamos que a administração de TGF β 1, como esperado, reduziu os níveis de fosfo-p27^{thr187} ($p<0,05$) (Figura 21). Verificamos também, que a administração do α -TGF β 1 não causou alterações em relação ao grupo controle (jejum +PBS) (Figura 21). Quando os animais foram tratados com anticorpo e com o peptídeo, a concentração de fosfo-p27^{Thr187} foi reduzida em relação ao grupo controle, porém, se manteve ainda mais alta que no grupo tratado com TGF β 1 (Figura 21).

Testamos também as proteínas reguladoras do complexo de degradação, e observamos que o tratamento com TGF β 1 reduziu a concentração de Skp2 de forma significativa ($p<0,05$), enquanto que a presença do anticorpo manteve os níveis de Skp2 similares aos do grupo controle. É interessante notar que a administração do anticorpo concomitante ao TGF β 1 recuperou parcialmente o efeito desencadeado pelo fator de crescimento, e também que não observamos diferenças significativas entre o grupo α -TGF β 1 e moléculas combinadas (Figura 21).

Por último, avaliamos os efeitos sobre a Cdh1, e verificamos que o tratamento com TGF β 1 aumentou sua concentração de forma significativa ($p<0,05$). A presença do anticorpo manteve os níveis de Cdh1 similares aos do

grupo controle, e a administração do α -TGF β 1 juntamente com o peptídeo restaurou a concentração de Cdh1 nos mesmos níveis do grupo tratado apenas com PBS (controle) (Figura 21).

Figura 21- Efeito da neutralização de TGF β 1 na concentração proteica de p27, fosfo-p27^{Thr187}, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica de ratos de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação do efeito da neutralização de TGF β 1 na mucosa gástrica de animais lactentes alimentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 2 horas com PBS, TGF β 1, PBS+ α -TGF β 1 e TGF β 1+ α -TGF β 1. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários das proteínas de interesse e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa das bandas foi obtida como proteína de interesse/ β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 3 filhotes/grupo. # p<0,05 quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS; & p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com TGF β 1. Os ensaios foram conduzidos em duplicatas técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

5.6 Efeito da inibição da síntese proteica pela cicloheximida

Está bem estabelecido que a cicloheximida exerce um efeito inibitório sobre a síntese proteica, já que ela inibe a translocação de RNAt e RNAm para os ribossomos, impedindo, assim o alongamento traducional. Para verificar se o TGF β 1 teria função na fase traducional, nós utilizamos a cicloheximida para inibir a síntese proteica.

Inicialmente verificamos e confirmamos o efeito do TGF β 1 sobre a concentração de p27, ao detectarmos um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (jejum + PBS) (Figura 22). Em seguida, observamos que a administração de cicloheximida durante o jejum diminuiu significativamente a concentração de p27 quando comparada ao controle ($p < 0,05$) (Figura 22). Entretanto, quando utilizada durante o tratamento com TGF β 1, encontramos o nível de p27 ligeiramente mais baixo que o observado no grupo TGF β 1, e semelhante ao controle (Figura 22).

Como as proteínas envolvidas na maquinaria de degradação apresentaram modificações após a gavagem com TGF β 1, investigamos também se os efeitos na concentração de Skp2 e Cdh1 poderiam ocorrer na fase de tradução. Verificamos que o TGF β 1 promoveu diminuição significativa de Skp2, conforme já demonstrado acima, e que a administração de cicloheximida não afetou os níveis proteicos (Figura 22). A análise de Cdh1 mostrou que o TGF β 1 aumentou sua concentração ($p < 0,05$), e que a administração da cicloheximida durante o tratamento com TGF β 1 reduziu significativamente os níveis dessa proteína ($p < 0,05$) (Figura 22).

Figura 22- Efeito da administração de cicloheximida durante o tratamento com TGF β 1 na concentração proteica de p27, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação do efeito da inibição proteica (cicloheximida) na mucosa gástrica de animais lactentes submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 2 horas com PBS, PBS+ciclo, TGF β 1 e TGF β 1+ciclo. 30 μ g de proteína total foram separados em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários de interesse e β -actina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. A densidade relativa das bandas foi obtida como proteína de interesse/ β -actina, e está representada como média $\pm$ desvio padrão. (n) = 3 ou 4 filhotes/grupo. # p<0,05 quando comparado ao grupo correspondente tratado apenas com PBS; & p<0,05 quando comparado ao grupo TGF β 1. Os ensaios foram conduzidos em duplicatas técnicas.

Fonte: Fiore (2013).

5.7 Efeito do jejum e tratamento com TGFβ1 na interação p27-Ub

Para que a p27 seja degradada via proteassoma 26S, deve ocorrer fosforilação, e reconhecimento pela E3 ligase SCF^{Skp2}, que leva à formação da cauda de ubiquitina, que então é reconhecida pelo proteassoma 26s para degradação.

Realizamos imunoprecipitação para p27 total para verificar a interação da CKI com a ubiquitina. Observamos que animais em jejum apresentaram um aumento na formação da cauda de ubiquitina em relação ao grupo alimentado (Figura 23). Após 2 horas de jejum e tratamento com PBS observamos que houve manutenção da cauda de ubiquitina, porém a administração de TGFβ1 levou a uma redução acentuada, tornando a ubiquitinação semelhante aquela encontrada no grupo alimentado (Figura 23).

Figura 23- Efeito de TGFβ1 na ubiquitinação de p27, essencial para o reconhecimento e promoção da degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes de 14 dias submetidos ao jejum.

Determinação da ubiquitinação de p27 na mucosa gástrica de animais de 14 dias alimentados ou submetidos ao jejum por 90 minutos, seguido de tratamento por 2 horas de PBS ou TGFβ1. Foi realizada a imunoprecipitação para p27 total a partir de 100μg de proteína e a imunodeteção realizada para ubiquitina. O produto do ensaio foi separado em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos primários específicos para ubiquitina. Bandas representativas de cada condição estão apresentadas e cada uma refere-se a um animal. (n)= 4 filhotes/ grupo. Este ensaio não permite que a densidade relativa seja calculada.

Fonte: Fiore (2013).

5.8 Efeito do jejum e tratamento com TGF β 1 na degradação de p27

Após a formação da cauda de ubiquitina, a p27 marcada é reconhecida e degradada pelo proteassoma. Para observar a influência do jejum e do efeito de TGF β 1 na degradação de p27 realizamos um ensaio a partir de proteína recombinante de p27 (p27r), lisados obtidos da mucosa gástrica coletados após 0 e 30 minutos de tratamento.

No grupo submetido ao jejum (0h de tratamento) observamos que a degradação da p27r ocorreu de forma gradual ao longo do tempo, e houve uma redução da concentração da proteína a partir de 3 horas de ensaio, que se manteve em 6 horas e perdurou até 20 horas, sendo que este último ponto apresentou a menor concentração de p27r (Figura 24).

O grupo submetido ao jejum e tratado com PBS por 30 minutos apresentou uma aceleração no processo de degradação da p27r a partir de 30 minutos de ensaio. Essa redução foi persistente em 3 horas e 6 horas, sendo que a menor concentração de p27r foi observada em 20 horas, em níveis semelhantes ao grupo jejum 0h (Figura 24).

No entanto, o grupo submetido ao jejum e tratado com TGF β 1 (30 minutos) apresentou um padrão semelhante ao grupo jejum 0h, porém, em relação ao grupo PBS 30 minutos, notamos uma atenuação na degradação de p27r. Assim, detectamos um decaimento de p27r somente após 3 horas e 6 horas, sendo que em 20 horas, este grupo apresentou concentração semelhante aos dois grupos descritos acima (Figura 24).

Figura 24- Efeito do jejum e tratamento com TGF β 1 na degradação de p27 na mucosa gástrica de ratos lactentes submetidos ao jejum.

Determinação da degradação de p27 na mucosa gástrica de animais de 14 dias submetidos ao jejum por 90 minutos (0h), seguido de tratamento por 30 minutos de PBS ou TGF β 1. O ensaio foi realizado a partir de 200 μ g de proteína total e a 1 μ g de p27r, em presença de ATP e as coletas das amostras foram após 1 minuto, 30 minutos, 3, 6 e 20 horas desde o início do ensaio de degradação. O produto do ensaio foi separado em gel SDS-PAGE 12%, e as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo específico para p27. Bandas representativas de cada momento de retirada do ensaio do estão apresentadas. No gráfico superior cada ponto representa a média da densidade óptica integrada absoluta (IOD em u.a.) obtida para as bandas em cada condição experimental. No gráfico inferior cada ponto representa a média em relação às amostras coletadas 1 minuto após o início do ensaio. (n)= 4 filhotes/ grupo experimental.

Fonte: Fiore (2013).

6 DISCUSSÃO

O efeito proliferativo do jejum no estômago de ratos lactentes foi primeiramente descrito por Alvares em 1992, que identificou células em divisão por toda a glândula gástrica, e mostrou um aumento da proliferação celular induzida pela restrição alimentar, sem alterações macroscópicas do tecido gástrico (Alvares, 1992). Mais recentemente, utilizando o mesmo modelo de jejum, nosso grupo descreveu o papel de TGF β 1 durante o desenvolvimento do estômago, e demonstrou que o tratamento por gavagem com esse fator de crescimento é capaz de inibir a proliferação e induzir a morte celular, através da ativação da via das Smads (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008).

O jejum representa a privação total de alimento, e em filhotes é um estímulo agudo para a proliferação celular gástrica, que é regulada positivamente por uma série de complexos ciclinas-CDKs e negativamente pelas CKIs (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008; Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010). A p27 é uma dessas CKIs, e sua concentração é controlada durante a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular, sendo esse ajuste dependente principalmente do sistema ubiquitina- proteassoma (UPS) (Pagano, Tam *et al.*, 1995; Carrano, Eytan *et al.*, 1999; Lu e Hunter, 2010). No presente estudo apresentamos novas informações sobre o controle dos níveis e de fosforilação de p27 e seus reguladores (Skp2 e Cdh1) durante a indução da proliferação de células gástricas promovida pelo jejum, e também, demonstramos como o TGF β 1 pode atuar no controle do ciclo celular durante o desenvolvimento pós-natal de ratos.

Está bem estabelecido que, em diversos tipos de carcinomas, a redução dos níveis de p27 está diretamente relacionada ao crescimento acelerado e ao prognóstico ruim, especialmente devido ao escape do controle proliferativo. A determinação do papel da p27 em um processo depende da regulação de sua transcrição, síntese e modificação pós-traducional (Chu, Hengst *et al.*, 2008). Em 1996, Nakayama e colaboradores mostraram que animais *knockout* para p27 apresentavam aumento da massa corpórea e neoplasias epiteliais em diversos tecidos, no entanto, ainda respondiam aos efeitos inibitórios de TGF β e rapamicina. Esses resultados indicam que apesar da p27 controlar a

proliferação celular, sua deleção ou modificações em sua função não seriam totalmente suficientes para inibir a responsividade a fatores inibidores do crescimento de células epiteliais (Nakayama, Ishida *et al.*, 1996). Mais recentemente, Cuadrado e colaboradores (2009) mostraram que em células tumorais pulmonares que apresentam danos persistentes no DNA, a baixa expressão de p27 (induzida por shRNA) está relacionada à maior sobrevivência celular, mesmo em presença de drogas quimioterápicas genotóxicas, sugerindo que essa CKI participa também da manutenção da estabilidade genômica, além do controle do ciclo celular (Cuadrado, Gutierrez-Martinez *et al.*, 2009). Em câncer gástrico humano, foi observado que a p27 está relacionada à progressão tumoral e poderia estar envolvida na agressividade e capacidade de invasão (Myung, Kim *et al.*, 2000). Em 2007, Smartt e colaboradores mostraram que a p27 está localizada nas criptas intestinais, e que pode estar relacionada ao controle da proliferação no órgão (Smartt, Guilmeau *et al.*, 2007). Esses e outros resultados demonstram que a baixa detecção de p27 está associada a aspectos hiperproliferativos em células epiteliais, e uma vez que o trato gastrintestinal é recoberto por um tecido que é renovado muito rapidamente, a p27 também faz parte do mecanismo de controle do crescimento. Assim, durante o desenvolvimento pós-natal da mucosa gástrica, a concentração da p27 deve ser modulada em resposta aos elementos que atuam sobre a morfogênese, dentre os quais, estão o leite, fatores de crescimento e hormônios (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008; Ogias, De Andrade Sa, *et al.*, 2010; Osaki, Figueiredo *et al.*, 2011). No presente estudo, observamos que em filhotes em fase de amamentação, o jejum provocou a redução tempo-dependente na concentração de p27 na mucosa gástrica, com uma diminuição entre 2 e 14 horas de tratamento. É a primeira vez que esta variação é demonstrada, e a partir da hipótese de que essa redução poderia estar vinculada ao estímulo proliferativo induzido pelo jejum (Alvares, 1992; Gama e Alvares, 1998), desenvolvemos todo o estudo para explorar a regulação e o papel do TGF β 1 nesse contexto.

Quando os filhotes lactentes são submetidos ao jejum, o TGF β e outros fatores de crescimento presentes no leite materno são retirados da dieta. Estudos anteriores demonstraram que a redução da concentração de TGF β 1

no leite materno é inversamente proporcional a detecção de TGF β e seus receptores no estômago de ratos, desta forma pode-se assumir que o TGF β é suplementado pelo leite materno até que a produção endógena deste fator de crescimento supra a necessidade do tecido (Penttilä, Van Spriël *et al.*, 1998; De Andrade Sa, Jordao *et al.*, 2003).

De Andrade Sá e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de TGF β 1 durante o jejum é capaz de desencadear uma resposta inibitória eficiente, ao gerar a fosforilação de Smads e reduzir o potencial proliferativo de células gástricas (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008). Diversos estudos relatam que dentre as proteínas ativadas pela cascata de TGF β , a p27 é uma das responsáveis pelo efeito inibitório desse fator de crescimento na proliferação de células normais e transformadas (Reynisdottir, Polyak *et al.*, 1995; Nagahara, Ezhevsky *et al.*, 1999; Donovan, Rothenstein *et al.*, 2002; De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008). Quando tratamos os filhotes com TGF β 1, observamos que sua administração durante o jejum foi capaz de aumentar a concentração de p27 de modo tempo-dependente, de forma que após 2 horas, os níveis foram mais altos em relação ao grupo controle em jejum e ao início do tratamento, e após 14 horas detectamos uma elevação ainda maior. Devemos ressaltar que em 2 horas, o TGF β 1 restaurou a concentração de p27 encontrada em filhotes amamentados. Em conjunto, esses resultados indicam que o acúmulo de p27 promovido pelo TGF β 1 exógeno e presente no leite poderiam modular o crescimento da mucosa gástrica, através da inibição da progressão do ciclo celular.

A abundância de p27 no núcleo celular promove o sequestro da CDK2 e desta forma inibe a formação do complexo Ciclina E-CDK2, e esse sistema contribui para o aprisionamento da célula na fase G1 do ciclo celular (Okayama, 2012). Em contrapartida, diferentes estímulos proliferativos inibem o transporte de p27 para o núcleo, permitindo que a CDK2 livre ligue a Ciclina E (Chu, Sun *et al.*, 2007). Em 1997, Sheaff e colaboradores mostraram que o aumento da expressão de Ciclina E-CDK2 leva a fosforilação de p27 na Thr187 em fibroblastos, que este complexo reconhece diretamente a p27 e que esta fosforilação leva a eliminação de p27 da célula, permitindo a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Sheaff, Groudine *et al.*, 1997). Outros

estudos mostraram que para que a fosfo-p27^{thr187} seja ubiquitinada é necessária a formação de um complexo trimérico que inclui a Ciclina E e a CDK2, e que a degradação via UPS depende deste processo (Carrano, Eytan *et al.*, 1999; Montagnoli, Fiore *et al.*, 1999).

Observamos que a imunomarcacão para fosfo-p27^{thr187} é principalmente nuclear e está presente em toda a extensão da glândula, e essa localização é coerente com a distribuição do compartimento proliferativo, que aos 14 dias não está restrito ao istmo e colo, como no animal adulto (Alvares, 1992; Alvares e Gama, 1993). Constatamos por *western blot* que o jejum (2 horas) aumentou os níveis de fosfo-p27^{thr187}, porém esse efeito não foi mantido após 14 horas de tratamento, já que houve uma redução significativa na fosforilação de p27. Esses dados indicam que a p27 é rapidamente regulada pelo estímulo proliferativo (Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram observados em adipócitos hiperplásicos sincronizados em cultura, que apresentam redução progressiva nos níveis de p27 entre o início da fase G1 e final da fase G2, causada pelo aumento da fosforilação de p27 e de seu reconhecimento por Skp2; esses elementos levam à perda da estabilidade de p27 durante a progressão do ciclo celular. Esse estudo ainda mostrou que o uso de inibidores da via UPS promove a manutenção dos níveis de p27 e aprisiona as células em G1 (Auld, Fernandes *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que o tratamento de filhotes com TGFβ1 reverteu a resposta induzida pelo jejum, ao diminuir a fosforilação de p27^{thr187} após 2 e 14 horas de tratamento, em relação aos grupos em jejum pareados, sendo que em 14 horas foram detectados os menores níveis de fosfo-p27^{thr187}. Essas observações foram feitas tanto por avaliação do índice de células imunomarcadas quanto por *western blot*. Além disso, cabe mencionar que em 2 horas, o grau de fosforilação foi semelhante ao encontrado na mucosa gástrica de filhotes amamentados. Estudos anteriores mostraram que em células responsivas e refratárias ao TGFβ, o tratamento com este fator de crescimento promove alterações no padrão de fosforilação de p27, que podem estar diretamente relacionadas a características agressivas em tumores de mama (Ciarallo, Subramaniam *et al.*, 2002; Donovan, Rothenstein *et al.*, 2002). De um modo geral, nossos resultados indicaram que a fosforilação de p27 na treonina

187 foi induzida pelo jejum, e esse evento pode estar diretamente ligado ao estímulo da proliferação celular epitelial, regulando a transição G1-S. Sobretudo, a administração de TGF β 1 reverteu esses efeitos e sugere que a etapa de fosforilação de p27^{thr187} também é importante para a inibição da resposta proliferativa detectada anteriormente (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008). Ressaltamos que como o complexo Ciclina E-CDK2 faz parte da maquinaria de fosforilação estudamos sua concentração proteica, e não notamos alterações significativas. Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que quando os animais em amamentação são submetidos ao jejum e ao desmame precoce não há alterações nas concentrações de Ciclina E e CDK2 (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008; Ogias, De Andrade Sa *et al.*, 2010; Osaki, Figueiredo *et al.*, 2011). No entanto, De Andrade Sá e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento com TGF β 1 durante o jejum pode promover uma maior interação de p27 com a Ciclina E (De Andrade Sa, Bitencourt *et al.*, 2008). Como o jejum e o tratamento com TGF β podem não alterar a concentração de Ciclina E e CDK2, mas sim sua atividade, decidimos focar o estudo nas etapas de degradação de p27.

O complexo E3 ligase SCF é conhecido por promover a degradação de proteínas importantes para o ciclo celular e a Skp2 é a proteína adaptadora nuclear responsável pelo reconhecimento da fosfo-p27^{thr187} para ubiquitinação e degradação via proteassoma (Tsvetkov, Yeh *et al.*, 1999; Lu e Hunter, 2010; Lipkowitz e Weissman, 2011). Carrano e colaboradores (1999) demonstraram que o uso de oligonucleotídeos *antisense* ou a superexpressão de um dominante negativo de Skp2 promove a estabilização de p27, e que a ubiquitinação de p27 recombinante *in vitro* é aumentada quando Skp2 é adicionada a extratos de células em G1 (Carrano, Eytan *et al.*, 1999). Um estudo de Gstaiger e colaboradores (2001) correlacionou os níveis de Skp2 com a progressão tumoral entre displasias e carcinomas orais, demonstrando que Skp2 pode estar relacionada à malignidade neste tecido e pode ser apontada como uma oncoproteína (Gstaiger, Jordan *et al.*, 2001). A análise de 98 pacientes com carcinoma gástrico mostrou que nesse tumor há um aumento da expressão gênica de Skp2 inversamente proporcional aos níveis de proteína p27. Além disso, estes autores demonstraram que a superexpressão de Skp2

em células de em cultura pode induzir a proliferação e inibir a apoptose em células gástricas (Masuda, Inoue *et al.*, 2002). Sobretudo, Skp2 é essencial para a proliferação celular, já que camundongos *knockout* para Skp2 apresentam níveis elevados de p27, divisão celular extremamente reduzida em fibroblastos e ainda apresentam-se 25% menores que as ninhadas normais (Nakayama, Nagahama *et al.*, 2000; Zhu, 2010). Nossos resultados mostraram que o jejum induziu o rápido aumento da concentração proteica de Skp2, e esse efeito perdurou até 14 horas, quando o nível mais alto foi observado. Podemos sugerir que o processo proliferativo estimulado pelo jejum poderia ser dependente do aumento de Skp2, que levaria a degradação de p27. A gavagem com TGF β 1 reverteu os efeitos do jejum, diminuindo os níveis proteicos de Skp2.

Estudos vêm demonstrando que o TGF β exerce uma função negativa sobre a proteína Skp2. Wang e colaboradores (2004) relataram que a Skp2 perde a estabilidade durante o tratamento com TGF β , e esse processo é controlado por um mecanismo dependente da ubiquitina (Wang, Ungermannova *et al.*, 2004). Um estudo mais recente mostrou que o TGF β promove a translocação de Skp2 para o núcleo celular, onde a proteína é reconhecida pelo complexo APC/C^{Cdh1}. Eles mostraram também que a deleção do resíduo responsável pela localização nuclear de Skp2 promove sua estabilização (Hu, Liu *et al.*, 2011). Desta forma, podemos sugerir que a ausência do leite materno (jejum) durante a fase de amamentação resultaria um estímulo proliferativo graças ao aumento de Skp2, que levaria à instabilidade de p27. Por outro lado, o TGF β poderia manter os níveis de p27, ao reduzir os níveis de Skp2.

Dentre as moléculas que controlam a progressão do ciclo celular, estão duas E3 ligases: o complexo SCF e o complexo APC/C^{Cdh1}, e dentre seus alvos, está a proteína Skp2 (Skaar e Pagano, 2009; Qiao, Zhang *et al.*, 2010). Estudos mostraram que APC/C^{Cdh1} promove o acúmulo de p27 e mantém a célula na fase G1 e que desestabiliza Skp2. A inibição de Cdh1 através de siRNA estabiliza Skp2, e resulta na degradação de p21 e p27, e é acompanhada da entrada prematura na fase S do ciclo celular (Wei, Ayad *et al.*, 2004; Li, Shin *et al.*, 2008). Desta forma, a diminuição da atividade de

APC/C^{Cdh1} pode levar ao acúmulo de substratos como a Skp2, e promover o desenvolvimento de carcinomas altamente proliferativos, genomicamente instáveis e agressivos (Qiao, Zhang *et al.*, 2010).

Em carcinoma colorretal, Fujita e colaboradores (2008) observaram que as concentrações de Cdh1 e p27 são muito reduzidas, quando comparadas ao tecido adjacente sadio, enquanto a expressão de Skp2 é inversamente maior. Além disso, esses autores mostraram que o silenciamento de Cdh1 (por SiRNA) em células não transformadas de cólon resulta em uma maior proliferação celular, enquanto que o *knockdown* de Skp2 reduz o crescimento (Fujita, Liu *et al.*, 2008). Nossos resultados demonstraram que o jejum promoveu a diminuição dos níveis de Cdh1 de forma tempo-dependente, com uma variação semelhante à encontrada para p27. Esses dados indicaram que o jejum foi um estímulo suficiente para reduzir os níveis de Cdh1.

Liu e colaboradores (2007) mostraram que a Skp2 é rapidamente degradada após a utilização de TGFβ, e que essa degradação promove a estabilidade de p27 e a parada do ciclo celular. Estes autores, utilizaram SiRNA para Cdh1 e demonstraram que a degradação de Skp2 por meio do tratamento com TGFβ1 depende de Cdh1 e da ativação das Smads (Liu, Wu *et al.*, 2007). Notamos que a administração de TGFβ1 reverteu a resposta obtida para Cdh1 após o jejum, e efeito poderia estar diretamente relacionado à estabilidade de p27.

Agrupados, esses resultados indicaram que a ausência das moléculas do leite materno (peptídeos, fatores de crescimento e hormônios) durante o jejum, aliada às respostas internas desencadeadas por essa condição alimentar reduziram a concentração de p27 e induziram a fosforilação e degradação dessa CKI na mucosa gástrica, em paralelo ao aumento de Skp2 e redução de Cdh1, sem afetar Ciclina E e CDK2. A suplementação com TGFβ1 por gavagem reverteu os efeitos do jejum sobre os níveis de p27, Skp2 e Cdh1, e também sobre a fosforilação de p27 de forma tempo-dependente. A Tabela 2 resume e compara essas informações.

Tabela 2- Resumo dos resultados obtidos para relação entre p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos.

	Alimentado	Jejum/ 0h	Jejum/ 2h PBS	Jejum/ 2h TGFβ1	Jejum/ 14h PBS	Jejum/ 14h TGFβ1
p27	+++	++	++	+++	+	++++
Fosfo-p27	++	++	+++	++	++	+
Skp2	+	++	+++	++	++++	+
Cdh1	+++	+++	+	+++	++	++++

Fonte: Fiore (2013).

Para confirmar se os efeitos de TGFβ1, descritos anteriormente para os níveis de p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 foram desencadeados diretamente, tratamos os animais com um anticorpo que reconhece de forma específica a isoforma do tipo 1 de TGFβ. Observamos que a administração do anticorpo manteve os níveis de p27 em relação ao grupo tratado apenas com PBS, porém a utilização do anticorpo concomitante ao TGFβ1 restaurou a concentração de p27 aos níveis do grupo controle. Além disso, a administração de TGFβ1 diminuiu fosfo-p27^{thr187}, e a administração do anticorpo para TGFβ1 não alterou os níveis de fosfo-p27^{thr187} em relação ao grupo controle. Quando os filhotes foram tratados com o anticorpo juntamente com o peptídeo, a concentração de fosfo-p27^{thr187} foi reduzida em relação ao grupo controle, porém, ainda se manteve mais alta que no grupo tratado com TGFβ1. Esses resultados demonstraram o efeito direto exercido pelo TGFβ1 sobre os níveis proteicos de p27 na mucosa gástrica de animais lactentes e corroboram estudos anteriores em outros modelos experimentais. (Hengst e Reed, 1996; Liu e Preisig, 1999; Donovan, Rothenstein *et al.*, 2002).

A avaliação da função de TGFβ1 na mucosa gástrica foi estendida às moléculas envolvidas na degradação de p27, e observamos que o tratamento com TGFβ1 reduziu a concentração de Skp2, enquanto que a presença do anticorpo manteve os níveis de Skp2 similares aos do grupo controle. É interessante notar que a administração do anticorpo concomitante ao TGFβ1 não foi capaz de modificar o efeito de TGFβ1. Para a Cdh1, o tratamento com TGFβ1 aumentou sua concentração, enquanto que a presença do anticorpo manteve os níveis similares aos do grupo controle. A administração do anticorpo juntamente ao peptídeo restaurou a concentração de Cdh1 nos

mesmos níveis do grupo jejum. Assim, podemos sugerir que na mucosa gástrica de ratos em desenvolvimento pós-natal, o TGF β 1 regulou os níveis e a estabilidade de p27 por meio do controle de Skp2 e Cdh1, moléculas regulatórias de sua degradação (Carrano, Eytan *et al.*, 1999; Tsvetkov, Yeh *et al.*, 1999; Ganoth, Bornstein *et al.*, 2001; Liu, Wu *et al.*, 2007). A Tabela 3 apresenta um resumo desses resultados de forma comparativa.

Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos para a relação entre p27, fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica durante a utilização do anticorpo para a isoforma 1 de TGF β .

	Jejum/ 2h PBS	Jejum/ 2h TGF β 1	Jejum/ 2h PBS/ $\alpha\beta$ 1	Jejum/ 2h TGF β 1/ $\alpha\beta$ 1
p27	+	++	+	+
Fosfo-p27	+++	+	+++	++
Skp2	+++	+	+++	++
Cdh1	++	+++	++	+

Fonte: Fiore (2013).

Lecanda e colaboradores (2007) relataram que a expressão gênica de p27 não é alterada durante o tratamento com TGF β , mesmo em doses muito acima da fisiológica, no entanto demonstraram que a concentração proteica é suscetível às diferentes concentrações de TGF β , e esse controle ocorre de forma pós-traducional (Lecanda, Parekh *et al.*, 2007). Para avaliar se o efeito do TGF β 1 ocorreria durante a tradução de p27, Skp2, Cdh1, promovemos um bloqueio da síntese proteica com uso de cicloheximida, previamente a administração de TGF β 1. Notamos que a presença da cicloheximida diminuiu significativamente a concentração de p27, porém quando a administramos juntamente com o TGF β 1, não encontramos alteração da amplitude em relação ao grupo controle.

Em células embrionárias de pulmão responsivas aos efeitos de TGF β , Liu e colaboradores (2007) mostraram que a administração desse fator de crescimento regula a síntese proteica de Skp2, sem alterar sua expressão gênica, e demonstraram também que o bloqueio da tradução (com uso de cicloheximida) não modifica a resposta de Skp2 ao TGF β (Liu, Wu *et al.*, 2007). Em nosso estudo avaliamos a concentração de Skp2 nas mesmas amostras

mencionadas acima para p27, e verificamos que o bloqueio da síntese proteica não alterou os níveis de Skp2.

Para o estudo de Cdh1, Liu e colaboradores (2008) utilizaram a linhagem de células HeLa e observaram que a cicloheximida controlou a concentração proteica dessa molécula (Liu, Li *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se da regulação positiva que o TGF β exerce sobre Cdh1 (Hu, Liu *et al.*, 2011), porém o ponto exato de sua ação permanece pouco conhecido. Na mucosa gástrica de filhotes em desenvolvimento, mostramos que o bloqueio da síntese não mudou a concentração de Cdh1, no entanto, o tratamento concomitante com o TGF β 1 reduziu significativamente os níveis que haviam sido aumentados pelo fator de crescimento. Em conjunto, nossos resultados indicaram que o efeito exercido pelo TGF β 1 sobre p27 e Skp2 deve ocorrer após a tradução, enquanto a regulação de Cdh1 pode acontecer previamente. A Tabela 4 apresenta e resume de forma comparada os resultados obtidos com o tratamento com cicloheximida.

Tabela 4- Resumo dos resultados obtidos pela inibição da síntese proteica pela cicloheximida (ciclo) na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos

	Jejum/ PBS	Jejum/ PBS/ciclo	Jejum/ TGF β 1	Jejum/ TGF β 1/ciclo
p27	++	+	+++	++
Skp2	++	++	+	+
Cdh1	+	+	++	+

Fonte: Fiore (2013).

A atividade de p27 durante o ciclo celular é imposta por seu controle temporal e sua degradação é dependente da fosforilação na Thr 187, que marca a CKI para o reconhecimento e ubiquitinação por SCF^{Skp2} (Starostina e Kipreos, 2012). Podust e colaboradores (2000) mostraram que em extratos celulares, a ubiquitinação de p27 depende da presença de Nedd8, uma proteína *ubiquitin-like* responsável pela ativação das enzimas E1, E2 e E3, que em sequência, permite a ligação covalente da ubiquitina pelo complexo SCF^{Skp2}, passo essencial para que a p27 seja reconhecida e degradada pelo proteassoma 26S (Podust, Brownell *et al.*, 2000). Mostrou-se que se a substituição do resíduo Thr187 por uma Alanina gera uma p27 não-fosforilável

e resistente à degradação pela via UPS; células que apresentam a forma indutível dessa proteína modificada não têm ubiquitinação de p27, não degradam a CKI, e apresentam inibição de ciclo celular e aumento de apoptose (Zhang, Tian *et al.*, 2005). Além disso, estudos demonstraram que o disparo da via de sinalização por MAPK, que é constitutivamente ativada em diversos tumores epiteliais, promove a aceleração do ciclo celular e leva ao aumento da fosforilação e degradação da p27 (Bloom e Pagano, 2003; Chu, Hengst *et al.*, 2008; Bashir, Pagan *et al.*, 2010; Huang, Pavlides *et al.*, 2012).

Para analisar a ubiquitinação de p27 durante o estímulo proliferativo induzido pelo jejum, realizamos a imunoprecipitação da p27 total para verificar a interação desta com a ubiquitina, e observamos que nesta condição alimentar, houve maior marcação para ubiquitina. É interessante ressaltar que o aumento da ubiquitinação foi paralelo ao pico de concentração de Skp2 (jejum + PBS 2h). Por outro lado, a gavagem com TGF β 1 diminuiu a marcação para a ubiquitinação de p27, e esse efeito é concomitante à elevação da concentração de p27 e de Cdh1 e à redução de Skp2. Nossos resultados indicaram que a redução dos níveis de p27 na mucosa gástrica durante o jejum pode estar diretamente relacionada ao aumento da ubiquitinação desta proteína por Skp2, e esse fenômeno pode ser observado após 2 horas de jejum. Além disso, podemos sugerir que o TGF β 1 exerceu um papel estabilizador sobre a p27 durante o jejum, resposta que depende do aumento de Cdh1. Esses resultados estão resumidos e apresentados de forma comparada na Tabela 5.

A função negativa de p27 na transição G1-S do ciclo celular está bem estabelecida, assim como a regulação de seus níveis pela fosforilação, ubiquitinação e degradação proteassomal. Este processo apresenta grande importância no desenvolvimento e progressão de carcinomas, e a quebra de p27 está diretamente envolvida na alta capacidade proliferativa de diversos tumores. Vários estudos descreveram que o destino de p27 é regulado por quinases específicas, e é dependente do ritmo proliferativo de cada população celular (Zhang, Monkkonen *et al.*, 2002; Auld, Fernandes *et al.*, 2007; Lu e Hunter, 2010). Em 1995, Pagano e colaboradores desenvolveram um ensaio para acompanhar a degradação de p27 e notaram que células em proliferação

apresentam uma degradação mais rápida dessa CKI, quando comparadas a células quiescentes (Pagano, Tam *et al.*, 1995). Avaliamos a influência do jejum e do efeito de TGF β 1 na degradação de p27 recombinante (p27r), e observamos que no grupo que foi estimulado pelo jejum (0 h de tratamento) a degradação de p27r ocorreu após 3 horas; com a progressão da restrição alimentar em mais 30 min, encontramos uma aceleração na degradação, e observamos concentração menor de p27r aos 30 minutos de ensaio. Esses dados demonstraram que o estímulo proliferativo pode promover a regulação negativa de p27 rapidamente, e assim à progressão do ciclo celular. No entanto, a influência do TGF β 1 na degradação de p27 na mucosa gástrica em desenvolvimento não havia sido relatada na literatura. Nossos resultados mostraram que a administração de TGF β 1 por 30 minutos atenuou a degradação de p27r, já que verificamos a redução na detecção desta proteína após 3 e 6 horas, de modo semelhante ao que encontramos no grupo controle (jejum 0 h). Embora a resposta detectada indique o atraso do processo de quebra de p27, o estudo de períodos mais longos sob efeito de TGF β 1 não está descartado, uma vez que é possível que após os 30 minutos iniciais (período de ativação de Smads) ocorra uma resposta mais marcante do fator de crescimento.

O TGF β é essencial para o desenvolvimento e homeostase tecidual de mamíferos e os ligantes, seus receptores e os componentes da cascata são conservados evolutivamente. Essa sinalização é responsável pela regulação de uma gama de respostas celulares e sua atividade é modulada no espaço e decorrer do tempo durante todo o desenvolvimento embrionário e pós-natal (Wu e Hill, 2009). A diminuição ou interrupção da sinalização de TGF β é amplamente relacionada aos eventos iniciais da oncogênese em diversos tecidos, onde se observa ausência da resposta aos efeitos anti-proliferativos (Massague, 2000; Lecanda, Parekh *et al.*, 2007; Matsuo, Fiore *et al.*, 2010; Mcconkey, Lee *et al.*, 2010; Moses e Barcellos-Hoff, 2011). Na mucosa gástrica em desenvolvimento, observamos que o estímulo proliferativo desencadeado pelo jejum aumentou a instabilidade de p27, graças à modulação positiva da proteína Skp2 e negativa de Cdh1, promovendo a ubiquitinação e degradação de p27. Mostramos também, que a presença de TGF β 1 no lúmen gástrico

durante a indução proliferativa promoveu o acúmulo de p27, que deve ter ocorrido devido ao aumento da estabilidade da CKI (a Tabela 5 resume os resultados apresentados).

Tabela 5- Relação entre p27, níveis de fosfo-p27^{thr187}, Skp2 e Cdh1 na mucosa gástrica nos diferentes tratamentos. Comparação a partir dos resultados apresentados.

	Alimentado	Jejum/ 0h	Jejum/ 2h PBS	Jejum/ 2h TGFβ1
p27	+++	++	++	+++
Fosfo-p27	++	++	+++	++
Skp2	+	++	+++	++
Cdh1	+++	+++	+	+++
Ub-p27	++	+++	++++	+
degradação- p27		↑↑	↑↑↑	↑

Fonte: Fiore (2013).

Kuzushita e colaboradores (2005) observaram que a infecção com *H. Pylori* em camundongos deficientes em p27 leva a alterações macroscópicas teciduais, associadas à redução na apoptose, aumento na proliferação epitelial, inflamação e uma maior susceptibilidade a infecção com este patógeno, demonstrando que a perda de p27 associada a colonização de *H. Pylori* coopera para o desenvolvimento de câncer gástrico (Kuzushita, Rogers *et al.*, 2005). O mesmo grupo, em 2012, analisou 164 casos de carcinomas gástricos e reportou que cerca de 60% deles apresentam p27 no citoplasma das células e que esse fato está associado à maior agressividade e taxa de mortalidade dentre os pacientes (Wen, So *et al.*, 2012). Desta forma, podemos associar a perda da capacidade supressora tumoral de p27 a situações que elevam a taxa proliferativa de células gástricas, e ainda ao desenvolvimento de neoplasias. De modo geral, nossos resultados demonstraram que a amplificação de Skp2 na mucosa gástrica participa da redução de p27, através do controle de Cdh1 e que esse mecanismo ocorre de forma pós-traducional. Essa resposta deve permitir a progressão do ciclo celular, e o aumento da proliferação durante o jejum em filhotes em amamentação. Além disso, demonstramos que quando o TGFβ1 está presente no lúmen durante a condição hiperproliferativa, Skp2 foi regulado negativamente, de forma pós-traducional, Cdh1 foi controlado positivamente de forma pré-traducional, contribuindo para a manutenção da

estabilidade e aumento da concentração de p27. O resumo das observações deste estudo está apresentado na Figura 25.

Figura 25- Resumo das observações deste estudo.

O jejum reduz a atividade de APC/C^{Cdh1}, aumenta a atividade de SCF^{Skp2}, aumenta a fosforilação de p27 e promove a degradação de p27, desta forma leva ao aumento da progressão do ciclo celular na mucosa gástrica. Por outro lado, a gavagem com TGFβ1 promove a ativação da via das Smads e aumenta a atividade de APC/C^{Cdh1}, que vai promover a degradação de Skp2 e, portanto reduzir a atividade de SCF^{Skp2}, levando ao aumento da estabilidade de p27 e consequente inibição da progressão do ciclo celular.

Fonte: Fiore (2013).

7 CONCLUSÃO

Através deste estudo pudemos concluir que:

1. O jejum promove o controle negativo de p27 na mucosa gástrica de em ratos amamentação;
2. O TGF β 1 exógeno atua na regulação de p27, por meio de duas proteínas essenciais para a estabilidade de p27 ao inibir Skp2 e induzir Cdh1;
3. A regulação de p27 na mucosa gástrica de filhotes em amamentação ocorre principalmente pelo sistema de ubiquitinação e degradação via proteassoma.

Assim exploramos e descrevemos parte do mecanismo molecular de regulação da proliferação celular gástrica durante o desenvolvimento pós-natal. Nossos resultados demonstram que o jejum modifica a síntese de p27 e promove a desestabilização de p27 através do estímulo e manutenção de Skp2. E mais interessante, nesta fase o TGF β 1 administrado por gavagem, ou seja, presente no lúmen foi capaz de reverter os efeitos do jejum e estabilizar p27, através do controle negativo (pós-traducional) de Skp2 e positivo (pós-transcricional) de Cdh1. Concluimos que o fator de crescimento TGF β 1 que está presente no leite materno pode participar diretamente do controle do crescimento gástrico durante o desenvolvimento pós-natal, por meio da coordenação do ciclo celular.

REFERÊNCIAS*

- ALBERTS, B. et al. **Essential Cell Biology**. 3ed. USA: Garland Science, 2009.
- ALEXANDROW, M. G.; MOSES, H. L. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. **Cancer Res.**, v. 55, n. 7, p. 1452-1457, 1995.
- ALVARES, E. P. The effect of fasting on cell proliferation in the gastric mucosa of the 14-day-old suckling rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, n. 6, p. 641-649, 1992.
- ALVARES, E. P. Extensive networks of TMPase positive basal lysosomes are present in fetal rat gastric epithelium before overt differentiation. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 26, n. 4, p. 515-523, 1994.
- ALVARES, E. P.; GAMA, P. Fasting enhances cell proliferation of gastric epithelium during the suckling period in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, n. 8, p. 869-873, 1993.
- ALVARES, E. P.; JORDÃO, L. R.; GAMA, P. Differential distribution of transforming growth factor beta and receptors in the hyper or hypoproliferative gastric mucosa of developing and adults rats. **Histol. Histopathol.**, v. 22, p. 147-153, 2007.
- AULD, C. A.; FERNANDES, K. M.; MORRISON, R. F. Skp2-mediated p27(Kip1) degradation during S/G2 phase progression of adipocyte hyperplasia. **J. Cell Physiol.**, v. 211, n. 1, p. 101-111, 2007.
- BASHIR, T. et al. Phosphorylation of Ser72 is dispensable for Skp2 assembly into an active SCF ubiquitin ligase and its subcellular localization. **Cell Cycle**, v. 9, n. 5, p. 971-974, 2010.
- BLOOM, J.; PAGANO, M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. **Semin. Cancer Biol.**, v. 13, n. 1, p. 41-47, 2003.
- BOEHM, M. et al. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. **EMBO J.**, v. 21, n. 13, p. 3390-3401, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARDOZO, T.; PAGANO, M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 9, p. 739-751, 2004.

CARRANO, A. C. et al. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, n. 4, p. 193-199, 1999.

CHU, I. et al. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. **Cell**, v. 128, n. 2, p. 281-294, 2007.

CHU, I. M.; HENGST, L.; SLINGERLAND, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 4, p. 253-267, 2008.

CIARALLO, S. et al. Altered p27(Kip1) phosphorylation, localization, and function in human epithelial cells resistant to transforming growth factor beta-mediated G(1) arrest. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, n. 9, p. 2993-3002, 2002.

CUADRADO, M. et al. p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. **Cancer Res.**, v. 69, n. 22, p. 8726-8732, 2009.

DATE, Y. et al. 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**, v. 141, n. 11, p. 4255-4261, 2000.

DE ANDRADE SÁ, E. R. et al. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. **Regul. Pept.**, v. 146, n. 1-3, p. 293-302, 2008.

DE ANDRADE SÁ, E. R. **Papel do fator de crescimento transformante beta 1 (TGFβ1) na mucosa gástrica de ratos em desenvolvimento pós-natal: estudo da via de sinalização e seus efeitos sobre a proliferação e morte celular.** 2007. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2007.

DE ANDRADE SÁ, E. R. et al. Ontogenic expression of TGFbeta 1, 2, and 3 and its receptors in the rat gastric mucosa. **Dev. Dyn.**, v. 227, n. 3, p. 450-457, 2003.

DONOVAN, J. C.; ROTHENSTEIN, J. M.; SLINGERLAND, J. M. Non-malignant and tumor-derived cells differ in their requirement for p27Kip1 in transforming growth factor-beta-mediated G1 arrest. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 44, p. 41686-41692, 2002.

EBISAWA, T. et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 16, p. 12477-12480, 2001.

EGUCHI, H. et al. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori. **Gut**, v. 53, n. 6, p. 797-804, 2004.

EWEN, M. E. et al. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 1009-1020, 1993.

FUJITA, T. et al. Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 173, n. 1, p. 217-228, 2008.

GAMA, P.; ALVARES, E. P. LHRH and somatostatin effects on the cell proliferation of the gastric epithelium of suckling and weaning rats. **Regul. Pept.**, v. 63, n. 2-3, p. 73-78, 1996.

GAMA, P.; ALVARES, E. P. Corticosterone treatment inhibits cell proliferation in the gastric epithelium of suckling rats. **J. Gastroenterol.**, v. 33, n. 1, p. 32-38, 1998.

GANOTH, D. et al. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 3, p. 321-324, 2001.

GENG, Y.; WEINBERG, R. A. Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 21, p. 10315-10319, 1993.

GOLDFEDER, E. M.; ALVARES, E. P. Effects of somatostatin, LHRH and TGF-alfa on epithelial cell proliferation in fetal stomach maintained in organ culture. **Braz. J. of Morph. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 21-28, 2001.

GSTAIGER, M. et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 9, p. 5043-5048, 2001.

HAO, B. et al. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. **Mol. Cell**, v. 20, n. 1, p. 9-19, 2005.

HELANDER, H. F. The cells of the gastric mucosa. **Int. Rev. Cytol.**, v. 70, p. 217-289, 1981.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465-471, 1997.

HENGST, L.; REED, S. I. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. **Science**, v. 271, n. 5257, p. 1861-1864, 1996.

HENNING, S. J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n. 3, p. 199-214, 1981.

HENNING, S. J. Development of the gastrointestinal tract. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 45, n. 1, p. 39-44, 1986.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 425-479, 1998.

HU, D. et al. Nuclear translocation of Skp2 facilitates its destruction in response to TGF β signaling. **Cell Cycle**, v. 10, n. 2, p. 285-292, 2011.

HUANG, K. T. et al. Estrogen and progesterone regulate p27kip1 levels via the ubiquitin-proteasome system: pathogenic and therapeutic implications for endometrial cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e46072, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. et al. **Histologia Básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARAM, S. M.; LEBLOND, C. P. Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. **Anat. Rec.**, v. 232, n. 2, p. 231-246, 1992.

KHURANA, S.; MILLS, J. C. The gastric mucosa development and differentiation. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 96, p. 93-115, 2010.

KOFF, A. et al. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 536-539, 1993.

KOLDOVSKÝ, O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. **J. Nutr.**, v. 119, n. 11, p. 1543-1551, 1989.

KUZUSHITA, N. et al. p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected mice. **Gastroenterology**, v. 129, n. 5, p. 1544-1556, 2005.

LAIHO, M. et al. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. **Cell**, v. 62, n. 1, p. 175-185, 1990

LECANDA, J. et al. Transforming growth factor-beta, estrogen, and progesterone converge on the regulation of p27Kip1 in the normal and malignant endometrium. **Cancer Res.**, v. 67, n. 3, p. 1007-1018, 2007.

LEE, E. R. et al. Division of the Mouse Gastric Mucosa Into Zymogenic and Mucous Regions on the Basis of Gland Features. **Amer. J. of Anat.**, n. 164, p. 187-207, 1982.

LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Early weanling and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. **Pediatr. Res.**, v. 17, n. 8, p. 645-650, 1983.

LI, M. et al. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. **Nat. Cell Biol.**, v. 10, n. 9, p. 1083-1089, 2008.

LIPKOWITZ, S.; WEISSMAN, A. M. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 9, p. 629-643, 2011.

LIU, B.; PREISIG, P. TGF-beta1-mediated hypertrophy involves inhibiting pRB phosphorylation by blocking activation of cyclin E kinase. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 2 Pt 2, p. 186-194, 1999.

LIU, W. et al. Proteolysis of CDH1 enhances susceptibility to UV radiation-induced apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 263-272, 2008.

LIU, W. et al. Cdh1-anaphase-promoting complex targets Skp2 for destruction in transforming growth factor beta-induced growth inhibition. **Mol. Cell. Biol.**, v. 27, n. 8, p. 2967-2979, 2007.

LLOYD, R. V. et al. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. **Am. J. Pathol.**, v. 154, n. 2, p. 313-323, 1999.

LU, Z.; HUNTER, T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. **Cell Cycle**, v. 9, n. 12, p. 2342-2352, 2010.

MASSAGUE, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 1, n. 3, p. 169-178, 2000.

MASSAGUÉ, J.; XI, Q. TGF- β control of stem cell differentiation genes. **FEBS Lett.**, v. 586, n. 14, p. 1953-1958, 2012.

MASUDA, T. A. et al. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. **Cancer Res.**, v. 62, n. 13, p. 3819-3825, 2002.

MATSUO, S. E. et al. Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 54, n. 4, p. 406-412, 2010.

MATSUZAKI, K. et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 69, n. 13, p. 5321-5330, 2009.

MCCONKEY, D. J. et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. **Urol. Oncol.**, v. 28, n. 4, p. 429-40, 2010.

MILLARD, S. S. et al. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 11, p. 7093-7098, 1997.

MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology**, v. 140, n. 2, p. 412-424, 2011.

MONTAGNOLI, A. et al. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. **Genes Dev.**, v. 13, n. 9, p. 1181-1189, 1999.

MOSES, H.; BARCELLOS-HOFF, M. H. TGF-beta biology in mammary development and breast cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 3, n. 1, p. a003277, 2011.

MYUNG, N. et al. Loss of p16 and p27 is associated with progression of human gastric cancer. **Cancer Lett.**, v. 153, n. 1-2, p. 129-136, 2000.

NAGAHARA, H. et al. Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 26, p. 14961-14966, 1999.

NAKAYAMA, K. et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 707-720, 1996.

NAKAYAMA, K. et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. **EMBO J.**, v. 19, n. 9, p. 2069-2081, 2000.

NANTHAKUMAR, N. N. et al. Regulation of intestinal ontogeny: effect of glucocorticoids and luminal microbes on galactosyltransferase and trehalase induction in mice. **Glycobiology**, v. 15, n. 3, p. 221-232, 2005.

NGUYEN, H.; GITIG, D. M.; KOFF, A. Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 2, p. 1190-1201, 1999.

OGIAS, D. et al. Corticosteroids induce the differential expression of TGFbeta isoforms, receptors and signaling in the gastric mucosa of suckling rats. **Regul. Pept.**, v. 135, n. 1-2, p. 17-22, 2006.

OGIAS, D. et al. Opposite effects of fasting on TGF-beta3 and TbetaRI distribution in the gastric mucosa of suckling and early weanling rats. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 224-229, 2010.

OKAYAMA, H. Cell cycle control by anchorage signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 8, p. 1599-1609, 2012.

OSAKI, L. H. et al. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: possible role of TGFalpha/EGFR. **Differentiation**, v. 79, n. 1, p. 48-56, 2010.

OSAKI, L. H. et al. EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. **Cell. Prolif.**, v. 44, n. 2, p. 174-182, 2011.

PAGANO, M. et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. **Science**, v. 269, n. 5224, p. 682-685, 1995.

PENTTILA, I. A. et al. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. **Pediatr. Res.**, v. 44, n. 4, p. 524-531, 1998.

PODUST, V. N. et al. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 9, p. 4579-4584, 2000.

POLAGER, S.; GINSBERG, D. p53 and E2f: partners in life and death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 738-748, 2009.

QIAO, X. et al. APC/C-Cdh1: from cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity. **Cell Cycle**, v. 9, n. 19, p. 3904-3912, 2010.

REYNISDOTTIR, I. et al. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. **Genes Dev.**, v. 9, n. 15, p. 1831-1845, 1995.

RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. **Sci. World J.**, v. 2012, p. 756357, 2012.

SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2925-2939, 2009.

SHEAFF, R. J. et al. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. **Genes Dev.**, v. 11, n. 11, p. 1464-1478, 1997.

SHIN, I. et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. **Nat. Med.**, v. 8, n. 10, p. 1145-1152, 2002.

SIMÕES C. **Proliferação, diferenciação, maturação e migração de populações celulares do epitélio gástrico do rato durante o primeiro mês de vida.** 1992. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1992.

SKAAR, J. R.; PAGANO, M. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 21, n. 6, p. 816-824, 2009.

SLINGERLAND, J.; PAGANO, M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. **J. Cell Physiol.**, v. 183, n. 1, p. 10-17, 2000.

SMARTT, H. J. et al. p27kip1 Regulates cdk2 activity in the proliferating zone of the mouse intestinal epithelium: potential role in neoplasia. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 232-243, 2007.

SMITH, S. S.; OJEDA, S. R. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors via milk LHRH. **Endocrinology**, v. 115, n. 5, p. 1973-1983, 1984.

STAROSTINA, N. G.; KIPREOS, E. T. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. **Trends Cell Biol.**, v. 22, n. 1, p. 33-41, 2012.

SUSAKI, E.; NAKAYAMA, K. I. Multiple mechanisms for p27(Kip1) translocation and degradation. **Cell Cycle**, v. 6, n. 24, p. 3015-3020, 2007.

TAIPALE, M. et al. Accumulation of a form of p27(Kip1) not associated with Cdk-cyclin complexes in transforming growth factor-beta-arrested Mv1Lu cells. **Exp. Cell Res.**, v. 259, n. 1, p. 107-116, 2000.

TORQUATI, A. et al. RUNX3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by reinstating transforming growth factor beta responsiveness in esophageal adenocarcinoma cells. **Surgery**, v. 136, n. 2, p. 310-316, 2004.

TSVETKOV, L. M. et al. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. **Curr. Biol.**, v. 9, n. 12, p. 661-664, 1999.

VIGLIETTO, G. et al. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. **Nat. Med.**, v. 8, n. 10, p. 1136-1144, 2002.

WANG, W. et al. Negative regulation of SCFSkp2 ubiquitin ligase by TGF-beta signaling. **Oncogene**, v. 23, n. 5, p. 1064-1075, 2004.

WEI, W. et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 194-198, 2004.

WEN, S. et al. Promotion of cytoplasmic mislocalization of p27 by Helicobacter pylori in gastric cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 14, p. 1771-1780, 2012.

WONG, W. M.; WRIGHT, N. A. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v. 52, n. 5, p. 321-333, 1999.

WU, M. Y.; HILL, C. S. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. **Dev. Cell**, v. 16, n. 3, p. 329-43, 2009.

ZETTERBERG, A.; LARSSON, O.; WIMAN, K. G. What is the restriction point? **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 7, n. 6, p. 835-842, 1995.

ZHANG, F. et al. TGF-beta induced G(1) cell cycle arrest requires the activity of the proteasome pathway. Transforming growth factor. **Exp. Cell Res.**, v. 281, n. 2, p. 190-196, 2002.

ZHANG, Q. et al. Inducible expression of a degradation-resistant form of p27Kip1 causes growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 18, p. 3932-3940, 2005.

ZHENG, N. et al. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 703-709, 2002.

ZHU, L. Skp2 knockout reduces cell proliferation and mouse body size: and prevents cancer? **Cell Res.**, v. 20, n. 6, p. 605-607, 2010.