

---

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

## RESUMO

FIORE A. P. Z. P. **Regulação de p27<sup>kip1</sup> pelo fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  pode aumentar a concentração de p27 por meio do controle de sua degradação. Este estudo visa analisar o efeito do jejum e do TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>thr187</sup>, 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<sup>thr187</sup> e Skp2 ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o tratamento com TGF $\beta$ 1 reverteu os efeitos do jejum em 2h e 14h para todas as proteínas analisadas ( $p < 0,05$ ). Para comprovarmos o papel do TGF $\beta$ 1, utilizamos um anticorpo específico e notamos que os níveis de p27, fosfo-p27<sup>thr187</sup>, Skp2 e Cdh1 foram mantidos semelhantes ao controle, mesmo quando o anticorpo foi administrado juntamente ao peptídeo TGF $\beta$ 1, sugerindo a reversão da resposta ao TGF $\beta$ 1. A seguir, para verificarmos a influencia de TGF $\beta$ 1 na síntese proteica, bloqueamos a síntese proteica através da injeção intraperitoneal de cicloheximida e tratamos os animais com TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1 houve a redução de Cdh1. Dando sequência, analisamos a influencia de TGF $\beta$  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 $\beta$ 1 reverteu este efeito. Finalmente, acompanhamos a degradação de p27 na mucosa gástrica de filhotes em jejum e tratados com TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  exógeno reverte esses efeitos do jejum e estabiliza p27, através do controle negativo de Skp2 e positivo de Cdh1. Concluímos que o fator de crescimento TGF $\beta$  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 $\beta$ 1, p27, Skp2, Cdh1, Sistema ubiquitina proteassoma.

## ABSTRACT

FIORE A. P. Z. P. **Transforming growth factor  $\beta$ 1 regulates p27<sup>Kip1</sup> 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 $\beta$ 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 $\beta$ 1 may increase p27 concentration through the control of its degradation. The present study aims to analyze the effects of fasting and TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1 or PBS, administered by gavage. Samples were collected after 0h, 2h and 14h. We evaluated the protein concentration of p27, phospho-p27<sup>thr187</sup>, Skp2 and Cdh1 by Western blot, and we observed that during fasting both p27 and Cdh1 were decreased ( $p < 0.05$ ), while phospho-p27<sup>thr187</sup> and Skp2 were increased ( $p < 0.05$ ). On the other hand, TGF $\beta$ 1 administration reversed fasting effects for all these proteins. In order to confirm the role of TGF $\beta$ 1, we administered a specific antibody against the peptide and noticed that p27, fosfo-p27<sup>thr187</sup>, Skp2 and Cdh1 levels were maintained at control levels, even when the antibody was given together with TGF $\beta$ 1. Subsequently, to evaluate TGF $\beta$ 1 influence on protein synthesis, we blocked it through intraperitoneal injection of cycloheximide followed by TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1. In addition, we analyzed TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1 administration reverted this effect. Finally, we followed p27 degradation in the gastric mucosa of fasted animals treated with TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  reversed fasting effects stabilizing p27, by negatively controlling Skp2 and increasing Cdh1. We concluded that milk born TGF $\beta$  actively participates of the developing gastric tissue homeostasis and acts on the cell proliferation coordination during suckling periods.

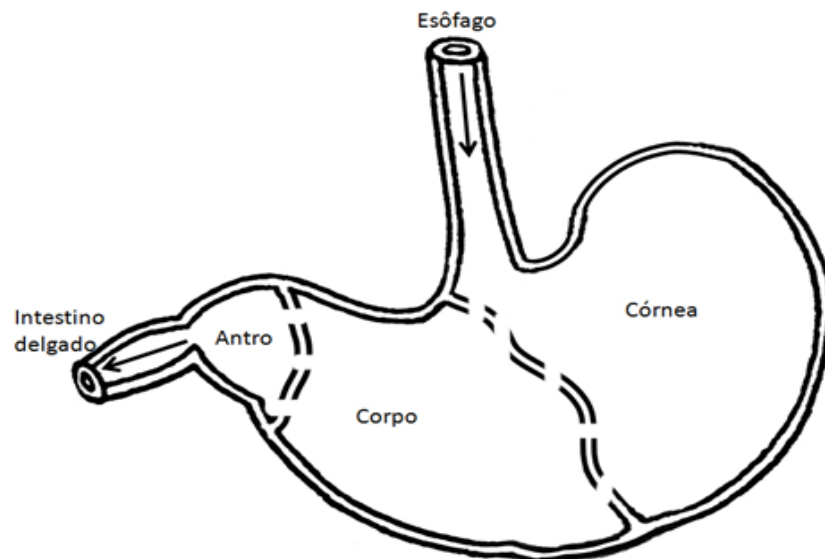
**Keywords:** Gastric mucosa, TGF $\beta$ 1, p27, Skp2, Cdh1, Ubiquitin-proteasome system.

# 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.

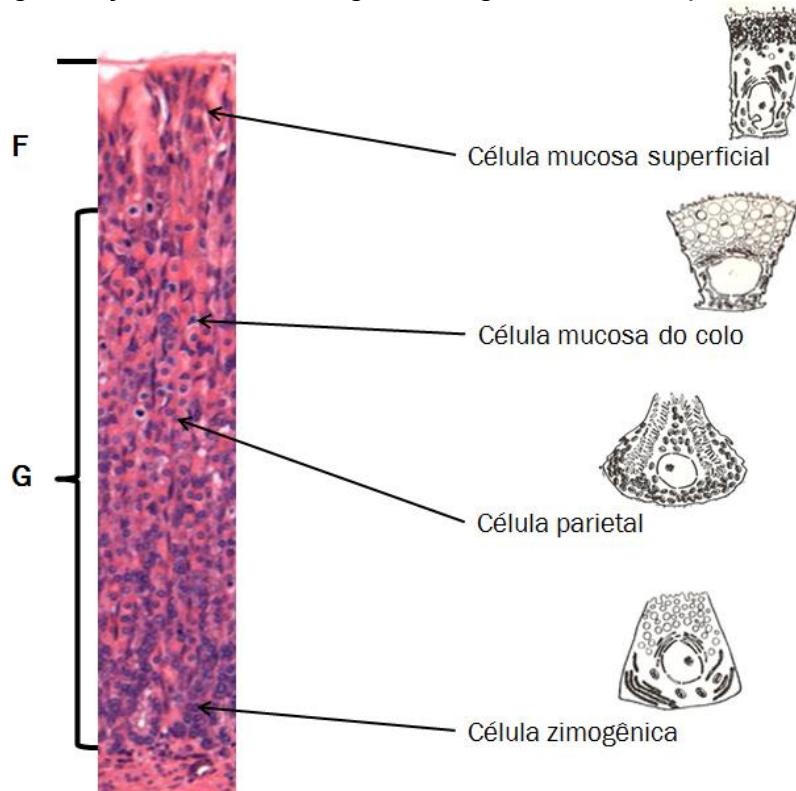
Fonte: Fiore (2013).

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 mucina 1 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  $\beta$  (TGF $\beta$ ), 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 gastrintestinal (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 lambar 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 $\beta$ , 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; Penttila, Van Spriël *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; Penttila, Van Spriël *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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ e o controle proliferativo**

O TGF $\beta$  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 $\beta$ , e parácrina, quando o TGF $\beta$  produzido age em células vizinhas. Em mamíferos existem três isoformas descritas de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3), sendo a mais estudada, a isoforma TGF $\beta$ 1. Alterações da responsividade aos efeitos inibitórios do TGF $\beta$  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 $\beta$  é desencadeado após sua ligação com o receptor serina/treonina do tipo II (T $\beta$ RII), que ativa e recruta o receptor do tipo I (T $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  (Ebisawa, Fukuchi *et al.*, 2001).

Estudos em nosso laboratório mostraram que a mucosa gástrica expressa as isoformas de TGF $\beta$  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 $\beta$ 1 concomitante à diminuição de TGF $\beta$ 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 $\beta$ 3 e do receptor T $\beta$ 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ ) 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 $\beta$  (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).

Ciclinas são proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular, que agem por meio da ativação de quinases dependentes de ciclinas (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).

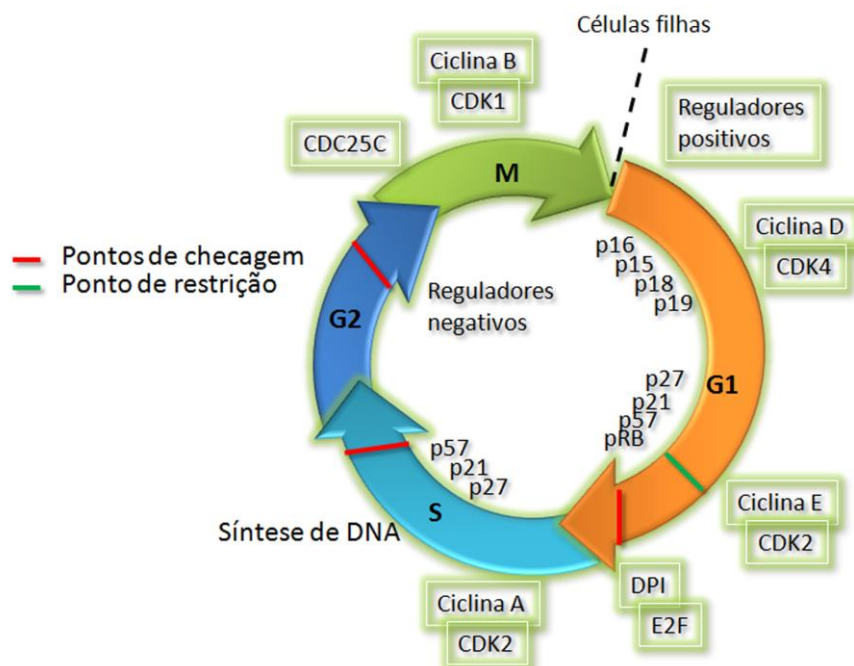
Na fase S inicia-se a síntese de DNA, e nessa etapa o complexo formado e ativado é composto por Ciclina A-CDK2, que além de estimular a duplicação dos cromossomos também controla a transição S/G2. Para entrada da célula em divisão, as Ciclinas A e B formam complexos com CDK1 e induzem a entrada da célula 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<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup>. 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.



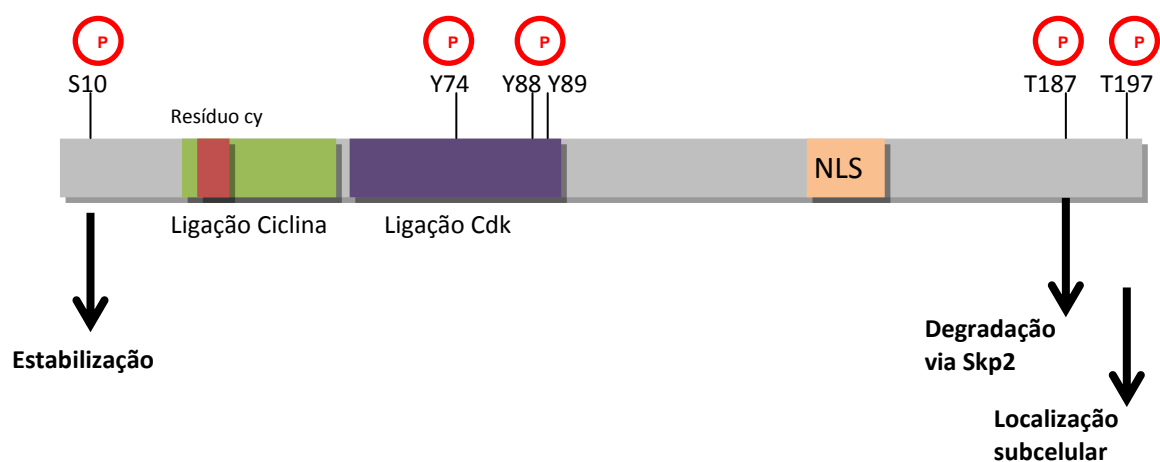
Durante todo o ciclo celular os diferentes complexos Ciclina-CDK são ativados, e são responsáveis pela progressão do ciclo celular. Diferentes proteínas podem regular negativamente os complexos formados e retardar ou inibir a passagem de uma fase para outra.

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

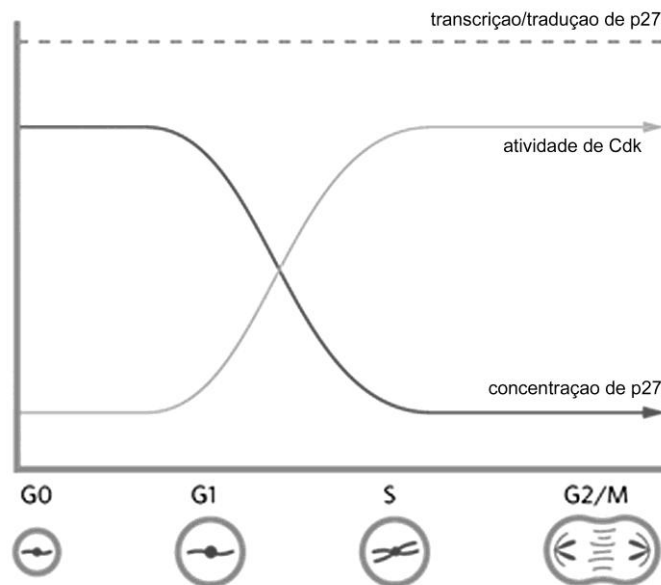


Esquema da p27, seus diferentes sítios de fosforilação e respostas celulares.  
Fonte: Adaptado de Okayama (2012).

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 $\beta$  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

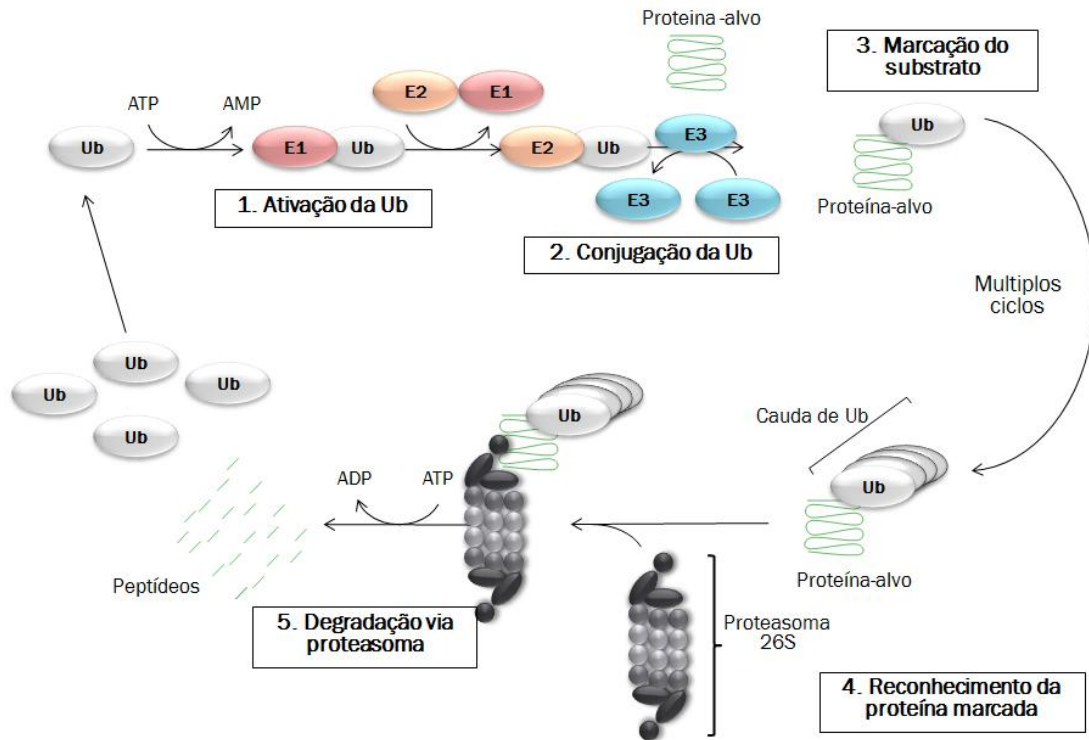
Fonte: Adaptado de Auld (2006).

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



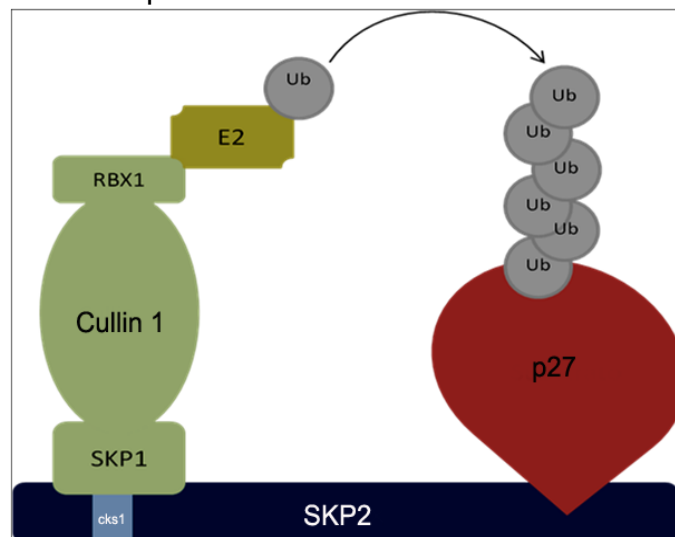
Passos da via ubiquitina-proteassoma de degradação proteica, essa via é composta por três enzimas: E1 ativa a ubiquitina (Ub) ; E2 reconhece a ubiquitina e a E3 forma uma ligação entre a E2-ubiquitina e a proteína alvo. Após múltiplos ciclos, a proteína alvo ubiquitinada é reconhecida e degradada pelo 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<sup>thr187</sup> é reconhecida pelo complexo E3 ligase SCF<sup>Skp2</sup>, 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<sup>Skp2</sup> 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).

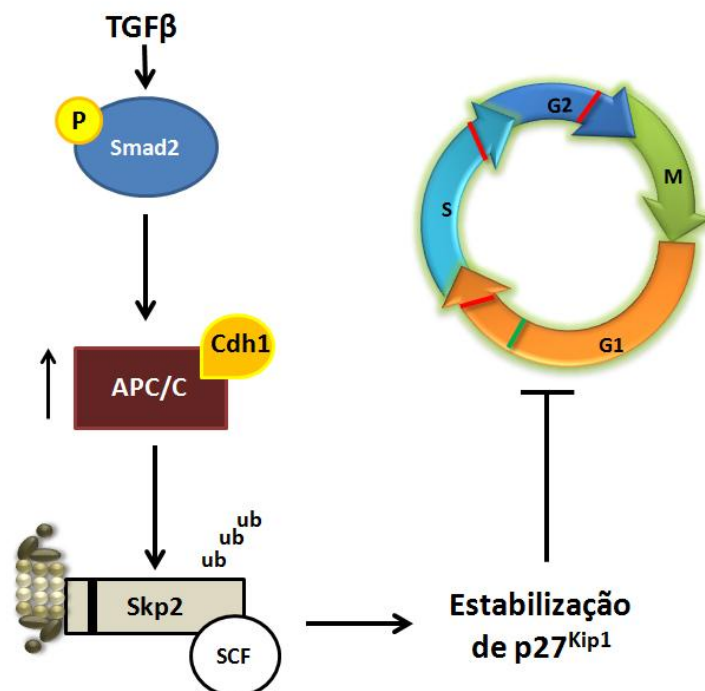
A Skp2 é reconhecida pelo complexo APC/C<sup>Cdh1</sup>, que vai promover sua marcação e degradação. A proteína adaptadora do Complexo APC/C é a Cdh1, sua disponibilidade é crucial para a manutenção dos níveis de Skp2, pela degradação via sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) (Skaar e Pagano, 2009). O 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<sup>Cdh1</sup> quando induzida por TGFβ é mediada pela interação física entre Smad3 e APC/C<sup>Cdh1</sup> (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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  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 $\beta$  no controle do ciclo celular com participação de p27.



Em células epiteliais em cultura, a ativação da via de TGF $\beta$  leva a fosforilação e da CoSmad (Smad2), este complexo interage com APC/C<sup>Cdh1</sup> 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).

## 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  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- $\beta$  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 relocalization 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.