



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

**Expressão e regulação da quinase celular intestinal (ICK)
em modelo de desnutrição *in vivo* e *in vitro***

FORTALEZA
2014

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

**Expressão e regulação da quinase celular intestinal (ICK)
em modelo de desnutrição *in vivo* e *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Biomedicina

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Coorientadores: Dr. Richard Littleton Guerrant

Dr. John Zheng Fu (University of Virginia - USA).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A48e Alves, Luis Antonio de Oliveira.
 Expressão e regulação da quinase celular intestinal (ICK) em modelo de desnutrição *in vivo* e *in vitro*. / Luis Antonio de Oliveira Alves. – 2014.
 145f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Clínica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Doutorado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Biomedicina.
 Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
 Co-Orientação: Dr. Richard Littleton Guerrant
 Dr. John Zheng Fu (University of Virginia - USA).
1. Desnutrição. 2. Proliferação de Células. 3. Apoptose. 4. Proteínas Serina-Treonina Quinases. I. Título.

CDD 612.3

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

**Expressão e regulação da quinase celular intestinal (ICK)
em modelo de desnutrição *in vivo* e *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.
Área de Concentração: Biomedicina
Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dr.^a Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. James Stuart Owen
University College London – UCL

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Luciana Relly Bertolini
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Em especial, a você Rosângela, porque me deste a vida, quando chegou o tempo certo de um encontrar o outro.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante os anos do curso. À Universidade Federal do Ceará - UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - PPGCM, assim como à Universidade da Virgínia - Estados Unidos, que disponibilizaram às condições de infraestrutura necessárias para a concretização desta pesquisa.

E de forma particular,

Agradeço e ofereço esta tese a todos que me ajudaram a construí-la, não é tarefa fácil. Acredito que o maior perigo em um agradecimento não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A minha mãe, por ter sido o contínuo apoio em todos estes anos ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência dos meus próprios valores e por ter me ensinado a arte de pensar com rigor e disciplina, propiciando-me a fundamentação básica, sem a qual este trabalho não teria sido escrito.

Aos meus avós Maria e Luiz Oliveira que me falam com seu “saber da sabedoria” ensinando-me na coragem de prosseguir, fazendo o melhor possível.

Agradeço também de forma muito carinhosa, ao companheiro Dr. João Filipe Coutinho, M.D. que sempre me estimula a crescer científica e pessoalmente, pelas inúmeras trocas de impressões e acima de tudo, pelo inestimável apoio que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias. Sua paciência infinita e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta tese.

Aos primos Priscila Oliveira, Daniel Oliveira, Weyma Alves, Giliano Carvalho, Luiz Miguel de Oliveira, Jorge Luiz de Oliveira e aos tios não citados, mas não menos queridos, assim como a outra parte da querida família, que fica lá na minha bela Ibiapina, muito obrigado pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais nos quais gostaria de estar junto de vocês, mas que mesmo à distância fizeram chegar, de diversas formas, seus incentivos e carinhosos cuidados.

Aos melhores amigos que posso chamar de irmãos: Karol Ximenes, Danielle Val, Aleandra Mara e Paulo Victor de Oliveira. A borracha do tempo nunca apagou nossos corações.

Aos colegas do Labicone: Celina Viana, Ítalo Figueiredo, Tiê Costa, Camilla Almeida, Josiane Santos, Cristhyane Costa, Kildere Canuto, Davi Gonçalves, Kalina Oliveira, Orleânco Azevedo e IC's, pela cobertura direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia. Devo dizer-lhes que aprendi com vocês a generosa solidariedade e o carinho desprendido. Por tudo, agradeço-lhes individualmente

A Danielle Abreu Foschetti, pela amizade, apoio prestado e convivência diária durante o ano de 2012 em Charlottesville nos Estados Unidos. Foi muito bom dividir essa aventura com você.

Aos amigos americanos que fiz enquanto estudante na Universidade da Virgínia, Carolina Ramôa, Tanseli Nesil, Lydia Abebe, Cameron Elward, Matthew Maher, Leah Barreth, Glynis Kolling, Charlotte Martin, Christophe Pauly, Luther Bartelt, Jonh Moore, Tufeng, Wu Di, Edna Zaenker, Teddy Van Opstal, Cameron Elward e a todos que neste curso souberam compreender a etapa pela qual eu estava passando, entendendo minhas dificuldades, buscando se aproximar de mim nos momentos de solidão longe da família, agradeço-lhes carinhosamente por tudo isto.

Não poderia deixar de mencionar o mestre, David Bolick, que me ajudou com seus conhecimentos de exímio cientista e soube tornar meu cotidiano mais leve graças ao seu entusiasmo e boa vontade. Saudade de você meu amigo! Essa tese também é sua.

E a todos os trabalhadores do Centro Global para Saúde (Center for Global Health), April Balard, Rebecca Scharf, Mary Ann e Steve Murphy, pela forma carinhosa como fui recebido, pela disponibilidade manifestada e pelo incansável acompanhamento e apoio nos trabalhos.

No âmbito acadêmico, gostaria de agradecer especialmente a excelência profissional do Professor Dr. Reinaldo Barreto Oriá que conferiu prestígio e valor a minha pesquisa como orientador. Pela competência científica, disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, que me ensinou com prazer e dedicação muito do que sei, bem como pelas críticas, correções, sugestões, paciência e amizade então demonstradas.

Também aos professores americanos, Dr. Richard Littleton Guerrant e Dr. John Zheng Fu pela consideração de ter aceitado a coorientação de minha tese, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Incluo, de forma especial, o nome do Dr. James K. Roche (*in memoriam*) nesta minha lista. Foi sorte ele ter cruzado meu caminho. Seu incansável apoio moral, orientação e permanente disponibilidade, me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução deste estudo. O senhor foi um grande mestre! Suas ideias, permearam meu trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado! Todos vocês são coautores deste estudo.

E finalmente, mas principalmente, a Deus, que nos ensina diariamente que a melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar é se aproximando Dele.

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas graça das graças é não desistir nunca".

(Dom Hélder Câmara)

Intestinal Cell kinase
肠道 细胞 激酶

Good Luck to You!
祝你好运

RESUMO

A desnutrição pode afetar a arquitetura intestinal, causando atrofia da mucosa e comprometendo o *turnover* epitelial. Embora o intestino seja capaz de responder compensatoriamente à desnutrição, os mecanismos moleculares pelos quais o intestino responde à privação proteica não estão completamente esclarecidos. A quinase celular intestinal (ICK) é uma proteína altamente conservada do tipo serina/treonina e um novo componente das vias de sinalização que regulam a proliferação celular na cripta intestinal. Para avaliar o papel da resposta intestinal compensatória à privação proteica, regulada pela ICK, foi medida a ativação de vias moleculares relacionadas à proliferação e sobrevivência celulares, como a via canônica Wnt/ β -catenina, a via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), vias da proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da proteína quinase B (PKB/Akt), bem como a expressão de marcadores para células-tronco intestinais (LgR-5 e Bmi1) por *immunoblotting* num modelo *in vivo* em camundongos fêmeas C57BL/6J submetidas à uma dieta hipoproteica (contendo 2% de proteína) por cinco dias e controles nutridos recebendo dieta padrão. Também foi realizado um estudo *in vitro* utilizando células HCT-8 de adenocarcinoma ileocecal humano desafiadas com meio padrão com restrição de soro fetal bovino (0-1%) para avaliar a resposta da ICK na presença ou não de fatores tróficos intestinais como glutamina (2mM), alanil-glutamina (10 e 50 mM) e zinco (10 e 50 μ M), além de caseína e albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 0,25 e 0,5% no meio, respectivamente. A análise de RNAm foi feita para avaliar o transcrito de ICK por q-PCR, após privação proteica. No intuito de avaliar o efeito dessa quinase sobre a proliferação celular e apoptose, foi realizado o silenciamento do gene da ICK com uso de RNA de interferência em células HCT-8. A viabilidade celular foi avaliada com base na exclusão do azul de tripan. Posteriormente, foram realizados testes de *western blot* para caspase 3 e 9, PARP-clivada, além de anexina V por citometria de fluxo para avaliar apoptose, assim como *western blot* para via Wnt/ β -catenina e ciclina D1 no intuito de medir os mecanismos relacionados à proliferação celular. Dessa forma, foi identificado um aumento significativo e transitório nos níveis intestinais de ICK na desnutrição induzida pela ração hipoproteica, concomitante com a ativação de vias moleculares relacionadas à proliferação e sobrevivência, bem como o aumento da expressão de marcadores para células-tronco intestinais. Esse trabalho também documentou que a

privação proteica, induzida por baixa concentração de soro, aumenta a expressão de ICK em células HCT-8, efeito que foi revertido pela adição de BSA no meio. O mesmo resultado, não foi observado com outros compostos como glutamina, alanil-glutamina e zinco. Apesar do aumento da expressão da ICK após privação proteica, não houve diferença significativa da sua transcrição quando comparado com os controles. O silenciamento do gene de ICK reduziu significativamente a sinalização da via Wnt- β -catenina e ciclina D1 em células HCT-8 com aumento da apoptose por um mecanismo dependente de caspases. Os resultados sugerem que o aumento da expressão de ICK em resposta à privação proteica é um mecanismo de proteção que limita a apoptose e suporta a proliferação celular epitelial na desnutrição.

Palavras-chave: Desnutrição. Privação de proteína. Quinase celular intestinal. β -catenina. Proliferação. Apoptose.

ABSTRACT

Malnutrition can affect the intestinal architecture, causing mucosal atrophy and compromising epithelial turnover. Although the gut is able to compensatorily respond to malnutrition, the molecular mechanisms by which the gut responds to protein deprivation are not completely understood. The intestinal cell kinase (ICK) is a highly conserved serine/threonine protein and a novel component of the signaling pathways that regulate cell proliferation in the intestinal crypt. In order to evaluate the role of the intestinal compensatory response to protein deprivation mediated by ICK, the activation of molecular pathways related to cell proliferation and survival were measured in C57BL/6J mice subjected to low protein diet (containing 2% protein) for five days and received standard chow-fed controls. We analyzed the intestinal canonical Wnt/ β -catenin pathway, mammalian target of rapamycin (mTOR), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and protein kinase B (PKB/Akt) by immunoblotting. We also measured the expression of intestinal stem cells markers (LGR-5 and Bmi1). We also conducted an in vitro study using human ileocecal adenocarcinoma cells (HCT-8) starved with low serum (0-1%) to evaluate the ICK response with or without gut trophic factors, such as glutamine (2 mM), alanyl-glutamine (10 and 50mM), and zinc (10 and 50 μ M), casein and bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 0.25 or 0.5% in the medium, respectively. We also assessed ICK mRNA transcript by q-PCR after protein deprivation. In order to evaluate the effect of this kinase on cell proliferation and apoptosis, the ICK gene was silenced using interference RNA in HCT-8 cells. Cell viability was measured by trypan blue exclusion. Furthermore, caspase 3 and 9, cleaved PARP, analyzed by western blot, and annexin V, measured by flow cytometry, were used to assess apoptosis. In order to measure ICK effect on cell proliferation, we analyzed Wnt/ β -catenin and cyclin D1 pathways by western blot. We identified a significant and transient increase in ICK intestinal levels following low-protein induced malnutrition, concomitant with the activation of molecular pathways related to proliferation and survival, as well as increased expression of intestinal stem cell markers. This work also documented that the protein deprivation, induced by low serum concentration, increased the expression of ICK in HCT-8 cells, an effect that was reversed by BSA in the medium. This reverse effect was not seen with other compounds such as glutamine, alanyl-glutamine or zinc. Despite the increase in ICK expression after protein deprivation, no significant difference in its transcripts was

found, when compared with controls. The silencing of the ICK gene significantly decreased Wnt/ β -catenin and cyclin D1 signaling activation in HCT-8 cells with increased apoptosis by a caspase dependent mechanism. Our results suggest that the increased ICK expression in response to protein deprivation is a protective mechanism that limits cell apoptosis and supports epithelial cell proliferation following malnutrition.

Keywords: Malnutrition. Protein deprivation. Intestinal cell kinase. β -catenin. Proliferation. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do intestino delgado de um adulto	33
Figura 2: Diversidade das funções da mucosa intestinal	35
Figura 3: Alteração na carga de proteínas por meio da reação de fosforilação	37
Figura 4: Organização estrutural da treonina, serina, tirosina e processo de fosforilação da tirosina	39
Figura 5: Função de proteínas quinases e fosfatases.....	40
Figura 6: Ilustração esquemática dos domínios e funções estruturais das proteínas quinases ICK, MAK e MOK.....	43
Figura 7: Transdução de sinais	45
Figura 8: Representação do ciclo celular	48
Figura 9: Cascata da MAPK.....	50
Figura 10: Vias de sinalização envolvidas diretamente na regulação da cascata apoptótica.....	51
Figura 11: Via de sinalização simplificada mTOR/PI3K/AKT	54
Figura 12: Visão geral das vias de sinalização Wnt	58
Figura 13: Fêmeas de camundongos C57BL6/J	62
Figura 14: Equipamento de Western blot	66
Figura 15: Células embrionárias HEK 293T	68
Figura 16: Células de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8.....	69
Figura 17: Diagrama ilustrando os principais passos da formação do grampo e subsequente silenciamento mediado pelo shRNA	70
Figura 18: Equipamento de citometria de fluxo (<i>BD</i> [®] - <i>Becton Dickinson FACSCaliburTM</i>).....	72
Figura 19: Batedor de esferas ou “ <i>bead bater</i> ” usado no rompimento ou “lise” de células.....	73

Figura 20: Kit de extração de RNA e equipamento QIAcube® para extração automatizada de DNA e RNA.....	74
Figura 21: A desnutrição proteica induz um aumento da regulação de vias de sinalização importantes que estão relacionados com a sobrevivência e proliferação das células do intestino	80
Figura 22: A desnutrição em células epiteliais ileocecais HCT-8 <i>in vitro</i> induz uma regulação positiva (<i>up-regulation</i>) aguda de proteína ICK de uma maneira reversível.....	82
Figura 23: A Albumina Sérica Bovina, como um suplemento para o meio de privação, reduz significativamente os níveis de ICK induzida pela desnutrição	86
Figura 24: Regulação negativa (<i>down-regulation</i>) de proteína ICK, induzida por privação de soro em células HCT-8, pode ser parcialmente revertida por adição de caseína.....	87
Figura 25: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 prejudica significativamente a proliferação celular regulando negativamente (<i>down-regulation</i>) a via Wnt/ β -catenina.....	88
Figura 26: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 induziram uma regulação negativa significativa do sinal de β -catenina ativa, bem como do alvo ciclina D1.....	89
Figura 27: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 induziu apoptose pelo mecanismo dependente da caspase.....	91
Figura 28: Níveis de expressão encontrados pela PCR em tempo real	94
Figura 29: Efeito do D-sorbitol em células HCT-8	95
Figura 30: Suplementação com glutamina	96
Figura 31: Suplementação com alanil glutamina.....	96
Figura 32: Suplementação de zinco	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informação nutricional das dietas padrão e especial contendo 20 e 2% de proteína utilizadas nos protocolos.	63
Tabela 2: Iniciadores usados nos protocolos de q-PCR.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Abl	Gene Abelson da Leucemia Mielóide Crônica
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase B
APC	Polipose adenomatosa familiar
AQ	Alanil-glutamina
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bcr	Proteína de regiões de grupos de interrupção / Gene Carcinoma Renal NY-REN-26
BMP	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina sérica bovina
C57BL6J	Estirpe inata de rato de laboratório
CCRK	Quinase relacionada com o ciclo celular
CD4	Grupamento de diferenciação 4
Cdc42	Proteína homóloga 42 de controle de divisão celular
CDK	Quinase ciclina dependente
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDKIs	Inibidores CDK
CIP/KIP	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>

C-jun	Proto-oncogene c-jun
C-myc	Oncogene homólogo da mielocitomatose viral aviária
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PK	Proteína-quinase DNA-dependente
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
E2F	Fator de transcrição
ECO	<i>endocrine-cerebro-osteodysplasia</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase controlada pela sinalização extracelular
ERK1/2	Quinase controlada pela sinalização extracelular 1/2
FAP	Polipose Familiar Adenomatosa
FasL	Fas ligante
FBS	Soro fetal bovino
FBXO9	Proteína 9F-box
FKHRL1	Fator de transcrição fork head
FOXO1	Proteína caixa Forkhead O1
Frizzled/FZD	Receptores acoplados à proteína G
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato

Gln	Glutamina
GRB2	Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento
GSK-3β	Quinase glicogênio sintetase 3
GTP	Guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HCT-8	Linha celular de epitélio ileocecal humano
HEK293T	Linhagem de células de rim embrionário humano
ICK	Quinase celular intestinal
INK4	Inibidores de quinase dependentes de ciclina 4
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal
L-arginina	Levógiro alanina
L-glutamina	Levógiro glutamina
MAK	Quinase associada a célula germinativa masculina
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MAP2K	MAP quinase quinase
MAP3K	MAP quinase quinase quinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCL1	Leucemia de células mielóides 1
MDM2	E3 ligase de ubiquitina-proteína Mdm2
MEK	MAP quinase quinase
Mg²⁺	Magnésio
mL	Mililitros
mM	Mili-molar
MOK	Receptor para produtos finais de glicação avançada
MRK	Quinase de linhagem mista

RNA_m	RNA mensageiro
mTert	Transcriptase reversa da Telomerase de camundongo
mTOR	Via de sinalização alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC2	<i>Mtor-Rictor Kinase Complex 2</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NFAT	Fator nuclear das células T ativadas
NF-κβ	Fator nuclear kappa B
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
°C	Grau célsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p21	Reguladora da transição da fase G1 para S
p27	Proteína-quinase inibidora 1
p53	Proteína supressora tumoral
p53	Proteína supressora tumoral
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
PCP	Peridina-clorofila-proteína
PDGF	Receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta
PDK	Quinases dependentes dos fosfoinosítídeos
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfadilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PK	Proteína quinase
pK_a	Logaritmo negativo da constante de ionização do ácido

PKB/Akt	Proteína quinase B
PO₄	Fosfato
PVDF	Fluoreto polivinidileno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAGE 1	Antígeno de tumor renal
RAS	Gene vírus de sarcoma de rato
RB	Proteína retinoblastoma
RCK	Quinase de hibridização cruzada do gene <i>v-ros</i> tirosina quinase
Rho	Proteína GTPase Rho
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
ROCK	Rho quinase
Ror-2	Tirosina-quinase de proteína de receptor transmembranar
RTK	Receptor tirosina quinase
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SAPK	Proteína quinase ativada por estresse
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida
Ser	Serina
shRNA	Pequeno grampo de RNA
SNC	Sistema nervoso central
TAK1	Quinase de proteína da família ML

TBS	Tampão fosfato-salino
TDY	Treonina – ácido aspártico – Tirosina
TGF β	Fator de crescimento transformante β
Tir	Tirosina
TORC	Transdutor da atividade de CREB regulada por coativadores
Tre	Treonina
UE	União europeia
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Radiação ultravioleta
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
μ	micro
ε	épsilon
γ	gama
β	beta
ω	ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Epidemiologia e impacto da desnutrição	28
1.2. Homeostasia e histogênese do epitélio intestinal	31
1.2.1 Intestino e estresse nutricional.....	34
1.3. Proteínas Quinases	36
1.3.1 Atividade e classificação das proteínas quinases	36
1.3.2 Proteínas quinases e seu valor terapêutico	41
1.3.3 Quinase celular intestinal (ICK).....	42
1.4. Vias de sinalização e proliferação celular.	44
1.4.1 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)	49
1.4.2 Via ERK.....	52
1.4.3 Via mTOR/PI3K/AKT	53
1.4.4 Via Wnt/ β -Catenina	55
2. JUSTIFICATIVA	59
3. OBJETIVOS	60
3.1. Objetivos Gerais	60
3.2. Objetivos Específicos	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1. Modelo animal e aspectos éticos	62
4.2. Modelo de desnutrição <i>in vitro</i>	63
4.3. Extração de tecidos e células	64
4.4. Anticorpos	65
4.5. Western blot	65
4.6. RNA de interferência (shRNAi)	67

4.7. Determinação do número de células viáveis.	71
4.8. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo de anexina V.....	71
4.9. PCR quantitativo para ICK.....	72
4.9.1. Extração de RNA.....	72
4.9.2. Análise Espectrofotométrica.....	74
4.9.3 Transcrição Reversa.....	75
4.9.4. PCR quantitativo para ICK.....	75
4.10. Análise Estatística.....	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1. A desnutrição proteica induz um aumento robusto e transitório da expressão da proteína ICK, associada à ativação de vias de sinalização que regulam a proliferação e sobrevivência celular, assim como o aumento da expressão dos marcadores de células-tronco intestinais.	77
5.2. A privação de soro fetal bovino (FBS) no meio aumenta de forma significativa a expressão da proteína ICK em células HCT-8 de forma aguda e de uma maneira reversível.....	81
5.3. A privação de soro fetal bovino (FBS) no meio induz um aumento agudo da expressão (<i>up-regulation</i>) dos níveis de ICK em células HCT-8, com esse efeito sendo revertido pela adição da albumina sérica bovina (BSA) e caseína.....	84
5.4. O silenciamento do gene da ICK diminui a viabilidade celular e regula negativamente (<i>down-regulation</i>) a via canônica Wnt/β-catenina em células HCT-8.....	88
5.5. O silenciamento do gene da ICK induz apoptose pela ativação de uma via dependente de caspase em células HCT-8.....	90
5.6. O rápido aumento proteico da ICK, induzido pela desnutrição, não é devido ao acréscimo da transcrição celular.	92
5.7. O efeito do BSA sobre as concentrações de ICK não é devido às mudanças de osmolaridade do meio de cultura.....	95

5.8. Outros resultados que não influenciam mudanças de ICK <i>in vitro</i>	96
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
8. ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e impacto da desnutrição

A desnutrição ainda se constitui um importante problema em saúde pública nos países em desenvolvimento. No ano de 2010, um percentual de 18% da população mundial ou 103 milhões de crianças com idade menor que cinco anos estavam desnutridas (baixo peso por idade), de acordo com os padrões de crescimento infantil da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A Organização Mundial de Saúde estima que mais de vinte milhões de crianças nascem abaixo do peso a cada ano e cerca de 150 milhões de crianças menores de cinco anos têm baixo peso para a sua idade. O problema é mais grave na área Centro-sul da Ásia (30%), seguido pela África Oriental (22%), Ocidental (22%) e Central (21%) e pelo Sudeste da Ásia (17%). A situação é melhor em outras regiões como o Leste da Ásia, Norte da África e da América Latina e o Caribe onde a taxa cai para 10%. Crianças de famílias mais pobres têm o dobro de chance de estarem abaixo do peso do que as em famílias menos pobres. Crianças que vivem em áreas rurais têm mais probabilidade de desenvolverem desnutrição que as que vivem em áreas urbanas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A desnutrição infantil, incluindo crescimento lento e deficiência em micronutrientes, constitui cerca de 35% das causas de morte em crianças com idade menor que cinco anos e possível motivo de doenças cardiovasculares na idade adulta, sendo que dentre as principais causas de morte em crianças, 60,7% resultantes de diarreia, 52,3% de pneumonia, 44,8% de sarampo e 57,3% de malária são atribuíveis à desnutrição concomitante (DE QUEIROZ *et al.*, 2014; DEBOER *et al.*, 2012). Os autores em seguida complementam que além da desnutrição ser altamente prevalente em países em desenvolvimento, faz parte da chamada “síndrome de pobreza”, que se associa às famílias de baixa renda, com muitos membros, pouca educação, baixo desenvolvimento, más condições de habitação, pouco acesso a cuidados de saúde e

à alimentação. Dado o aumento da incidência de doenças cardiovasculares em áreas em desenvolvimento, as associações entre desnutrição infantil, infecções do início da vida e o aumento da ocorrência de fatores de risco metabólicos exigem atenção redobrada das políticas de saúde pública no mundo todo (DEBOER *et al.*, 2012).

Para Ravasco *et al.*, (2005), a desnutrição ocorre quando a disponibilidade de nutrientes não atende às necessidades diárias do corpo para realizar suas funções. Este desequilíbrio pode resultar da ingestão inadequada de alimentos, uma dieta pobre ou desbalanceada ou até por excesso. Tais desequilíbrios são frequentemente produzidos pela deficiência relativa de proteínas, carboidratos e gorduras como fontes de energia e micronutrientes. Essas deficiências são seguidas de alterações fisiopatológicas que primeiro traduzem-se em prejuízo funcional e posteriormente em danos bioquímicos e físicos, estando também associada, com uma redução significativa no ritmo de crescimento do sistema nervoso central, em crianças, incluindo peso cerebral, córtex cerebral, número reduzido de neurônios, mielinização deficiente, perda da arborização dendrítica e várias alterações nas características microscópicas das espinhas dendríticas, predispondo, inclusive, às doenças degenerativas a longo prazo (AZEVEDO *et al.*, 2014).

Durante períodos prolongados de escassez de alimentos e desnutrição, algumas proteínas estruturais, particularmente aquelas que compõem o músculo esquelético e órgãos internos, são usadas para fornecer energia. Na inanição primária o corpo metaboliza as reservas de gordura, preferencialmente de modo que muitas proteínas estruturais são conservadas. Em determinadas situações, por exemplo, durante uma doença, após estresse ou trauma, tais mecanismos de proteção podem ser afetados e a ingestão de alimentos reduzida é relacionada com perda rápida da massa/volume de músculo esquelético, cardíaco e respiratório, aumento da susceptibilidade à infecção devido à função imunológica prejudicada, baixa capacidade de cicatrização e perda de massa corporal (HEYMSFIELD; MCMANUS, 1985; ZIEGLER *et al.*, 2003)

Ingestão nutricional inadequada também resulta em atrofia do revestimento do intestino, diminuição das secreções intestinais e alterações da microbiota intestinal, o que agrava mais a capacidade de obter os nutrientes dos alimentos. A desnutrição ocorre antes que os sinais clínicos sejam evidentes e, em curto prazo, as consequências do déficit nutricional podem não ser observadas. No entanto, ingestão nutricional insuficiente, por um período prolongado, altera a composição corporal com resultado óbvio, que é a perda de peso, afetando adversamente as funções do corpo, causando problemas de crescimento e desenvolvimento cognitivo que juntos trazem graves efeitos sociais sobre o capital humano (GUERRANT *et al.*, 2013)

Os nutrientes podem ser classificados como macronutrientes, micronutrientes ou ainda como aminoácidos anabólicos. Os macronutrientes são consumidos em grandes quantidades e fornecem energia, incluindo carboidratos, proteínas e gorduras. Já os micronutrientes, como as vitaminas, minerais e oligoelementos, são consumidos em quantidades muito pequenas (mg ou µg) e são necessários para uma ampla gama de processos essenciais, incluindo o crescimento, manutenção, proteção e reparo do corpo. Energia e micronutrientes também são necessários pelo sistema imunológico para proteger o corpo contra a invasão de organismos patogênicos (GURMINI *et al.*, 2005; RAVASCO *et al.*, 2005).

Recentemente, vários trabalhos demonstraram com sucesso a utilização de micronutrientes e aminoácidos anabólicos em processos de desnutrição, que tem sido associada com benefícios no crescimento físico e na integridade da mucosa intestinal, tais como; o tratamento com arginina (CASTRO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012) glutamina (LIMA *et al.*, 2002), vitamina A e zinco (CHEN *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2014).

A glutamina, por exemplo, é um dos aminoácidos mais abundantes e é considerado condicionalmente essencial em condições de estresse, como infecção, trauma e desnutrição. Além de ter um papel importante como combustível para enterócitos e leucócitos do intestino delgado, a glutamina participa em vários processos metabólicos, tais como síntese de proteína, gluconeogênese, transferência de nitrogênio, biossíntese de ácidos nucleicos, regulação da resposta imune e regulação do estado de oxidação celular (WANG; QIAO; LI, 2009).

O zinco, igualmente, é componente essencial de muitas enzimas, sendo necessário para atividade de muitas outras, desempenhando um papel importante na resposta de fase aguda e na resposta imune, embora os mecanismos pelos quais isto ocorre não estejam elucidados. É também essencial para o crescimento e função metabólica normal atuando também como cofator para a superóxido dismutase, protegendo a célula de danos induzidos por radicais livres, melhora os efeitos da vitamina D no metabolismo ósseo por meio do estímulo da síntese de DNA em células ósseas e participa na síntese de DNA e RNA, o que ultimamente é relacionado à replicação celular (DE QUEIROZ *et al.*, 2014).

1.2. Homeostasia e histogênese do epitélio intestinal

O trato intestinal é constituído por um tubo composto de várias camadas de tecido. A camada externa contém feixes de músculo liso inervados responsáveis por executar o peristaltismo. A camada do interna é constituída por tecido estromal sendo revestido de uma faixa de células epiteliais cilíndricas, denominado de mucosa, que processa, absorve nutrientes. Esse epitélio tem uma função especializada, desde a absorção de nutrientes à digestão de moléculas complexas (RESCIGNO, 2011).

O epitélio intestinal sofre rápida e contínua auto renovação: esta renovação é alimentada por células-tronco multipotentes responsáveis pela formação de toda a arquitetura epitelial e pela produção e manutenção de um epitélio absorptivo e secretório, que se dobra em unidades repetidas, compostas de invaginações, chamadas de criptas de Lieberkühn, e protusões, chamadas de vilos, que aumentam a área de absorção para uma melhor absorção dos nutrientes presentes no lúmen (MOLOFSKY; PARDAL; MORRISON, 2004). Estas células produzem e respondem a estímulos gerados por células vizinhas com a finalidade de manter a homeostase e promover a formação ou a recuperação tecidual. O *turnover* celular é finalizado pela apoptose/esfoliação de células terminalmente diferenciadas no ápice das vilosidades do intestino delgado (SATO *et al.*, 2009). A agressividade constante do conteúdo luminal induz uma notável e elevada taxa de morte de células, com até 10^{11} células

epiteliais (~ 200g) perdidas a cada dia em humanos. Isto impõe uma exigência de auto renovação diária ao longo da vida, que é impulsionada por pequenas populações de células-tronco adultas que residem dentro de nichos especializados (BARKER, 2014). Surpreendentemente, este contínuo processo de substituição epitelial ocorre sem perturbar a integridade funcional das junções célula-célula, já que a regulação da integridade juncional e permeabilidade paracelular são especialmente importantes para a homeostasia do sistema imune (BERGELSON, 2009).

Os enterócitos são o tipo mais representativo de células, que apresentam projeções digitiformes, conhecidas como microvilosidades. Estas surgem no lado luminal das células e são completamente revestidas por glicocálice. Essas células são derivadas de fontes multipotentes situadas na base das criptas. Quando essas células atingem a sua maturidade, elas migram em direção ao topo do vilão, onde células envelhecidas são expulsas no lúmen intestinal. Na profundidade das criptas, há também as células de Paneth que têm função de regulação, uma vez que elas produzem peptídeos antimicrobianos chamados de defensinas que constituem um sistema protetor contra os agentes patogênicos. Dessa forma, fica claro que a camada epitelial comporta-se como uma barreira anatômica e funcional, representando uma interface necessária para manter toda a homeostase intestinal (MCGUCKIN *et al.*, 2009). Essas estruturas podem ser bem visualizadas a seguir (FIGURA 1).

Existe uma complexa e dinâmica relação entre as células-tronco e o ambiente em que elas se encontram, que as provêm com os estímulos necessários para se adaptarem e responderem às necessidades do tecido, proliferando e mantendo a capacidade de auto renovação, gerando diferentes linhagens celulares. Esse nicho celular, que compõe o microambiente, protege e estimula as células-tronco. Além disso, um mecanismo de detecção de nutrientes dentro do nicho de células-tronco, que regula o tamanho e a atividade do *pool* dessas células foi recentemente descoberto (BARKER, 2014).

Esse microambiente é composto da matriz extracelular, células neurais, linfócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células do músculo liso e miofibroblastos, que ativam várias vias de sinalização, como é o caso da via Wnt que possui um papel crucial na manutenção e proliferação saudável das células intestinais

na formação de um epitélio diverso e organizado. A perda efetiva dessa via de sinalização, causa diminuição no número de células de Paneth e incapacidade de recuperação de barreira epitelial efetiva em processos, como por exemplo, o causado por episódios de desnutrição e infecções entéricas (BARKER, 2014; LI; XIE, 2005; NUSSE *et al.*, 2008; OHLSTEIN *et al.*, 2004; SEMONT *et al.*, 2010)

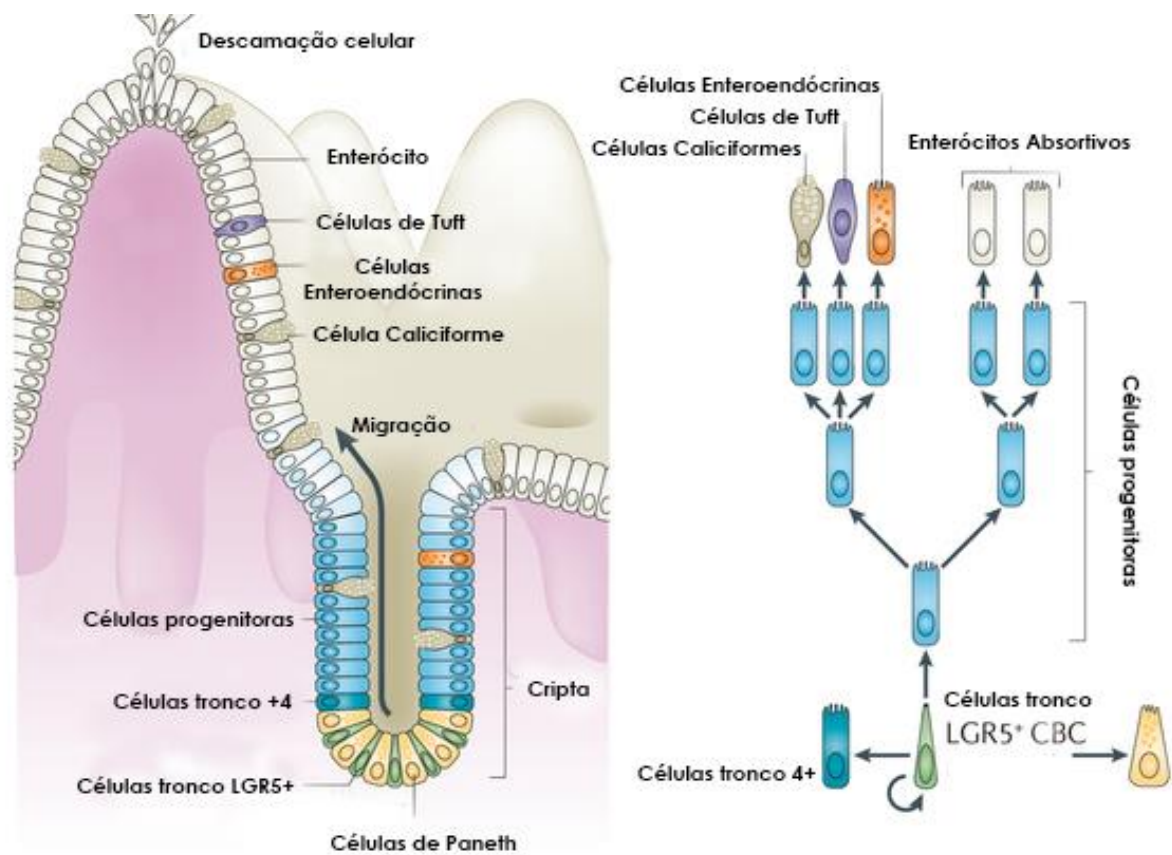


FIGURA 1: Estrutura do intestino delgado de um adulto. Células-tronco residem imediatamente acima das células de Paneth. Base de células cilíndricas, intercaladas entre as células Paneth, também podem se comportar como células-tronco. As células progenitoras param a proliferação na junção cripta-vilosidade e expressam marcadores de diferenciação. Células enteroendócrinas, absorptivas, e células de secretoras de muco migram no sentido ascendente, enquanto que as células de Paneth migram para baixo e localizam-se na parte inferior das criptas (BARKER, 2014).

1.2.1 Intestino e estresse nutricional

O intestino tem uma capacidade inerente para se adaptar morfológica e funcionalmente, em resposta aos estímulos ambientais internos e externos. Na verdade, a adaptação intestinal pode ser considerada um paradigma de interações gene-ambiente que tem implicações importantes no potencial de sobrevivência e bem-estar do indivíduo. A restrição alimentar, durante o desenvolvimento do animal, pode provocar efeitos irreversíveis, dependendo do período e do órgão em desenvolvimento. Se esta restrição se der durante a multiplicação celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso de alguns órgãos, mesmo após recuperação nutricional, devido ao decréscimo no número de células (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006).

Na maioria dos estudos realizados em animais, especialmente aqueles realizados em camundongos, demonstram que durante episódios de desnutrição, intestino delgado e mucosa atrofiam rapidamente com a redução da proliferação celular. Fato este notadamente observado em período de poucas horas, que compreendem mecanismos de adaptação que ocorrem em diversos níveis: fisiológico, celular e molecular (JENKINS; THOMPSON, 1994). É sabido também, que os sinais de adaptação podem estar relacionados a vários níveis hormonais, fatores de transcrição, níveis de ATP, ou mudanças na concentração de solutos luminiais.

Para Tappenden (2006), adaptação intestinal se refere a um processo em que o intestino sofre várias alterações estruturais e funcionais, para compensar a perda de suas funções, na intenção de manter a homeostase e arquitetura intestinal. Segundo o mesmo autor, o papel estimulante fornecido pelos nutrientes entéricos é ainda apoiado por evidências que indicam que a desnutrição altera a função e estrutura do intestino delgado, que é particularmente suscetível à injúria metabólica causada pela privação de fatores nutricionais.

Portanto, pode-se dizer que a mucosa do intestino delgado é adaptável, mas sua integridade é essencial para a sobrevivência, possuindo diversas funções biológicas, incluindo absorção de nutrientes, função de barreira, resposta à lesão, e reservatório imunológico (FIGURA 2) (SHAW; GOHIL; BASSON, 2012).



FIGURA 2: Diversidade das funções da mucosa intestinal (SHAW; GOHIL; BASSON, 2012) Adaptado.

1.3. Proteínas Quinases

As proteínas quinases pertencem a uma das maiores e mais funcionalmente diversas famílias de genes em eucariotos, constituindo cerca de 1,7% de todo o genoma humano. As quinases estão envolvidas no controle de funções celulares por meio de vias de sinalização complexas, que permitem regulação de funções fisiológicas, por fosforilação de substratos além de direcionar atividade, localização e atividade de inúmeras proteínas-alvo (LAHIRY *et al.*, 2009). As quinases são particularmente importantes para transdução de sinal e coordenação das complexas funções celulares, como pode ser visto com a proteína ativada por mitógeno (MAP) e quinases ciclina-dependente (CDK), que desempenham um papel central na regulação da divisão e proliferação de células em mamíferos. Atividade alterada das quinases ou substrato de fosforilação anormais têm sido implicados em doenças como distúrbios endócrinos, cânceres, imunodeficiências e doenças cardiovasculares (LAHIRY *et al.*, 2009).

1.3.1 Atividade e classificação das proteínas quinases

Os primeiros estudos na área de sinalização celular têm sua origem nos trabalhos realizados sobre os mecanismos da ação hormonal. A denominação hormônio, do grego “*hormao*” (que “estimula”, “excita”), introduzido pelo renomado pesquisador Ernest Henry Starling em 1905, a partir de seus experimentos sobre estímulo da secreção do suco pancreático no duodeno (BAYLISS; STARLING, 1905; STARLING, 1914).

A análise sobre os mecanismos de transdução de sinais foi mais intensa nos últimos 40 anos e revelou-se muito eficaz na identificação de novos alvos e para o desenho de novos fármacos. Este é o caso dos fármacos dirigidos a receptores acoplados à proteína G. Mais de 50% dos medicamentos modernos foram projetados com base nesta única família de transdutores de sinalização celular (FLOWER, 1999).

As enzimas conhecidas como proteínas quinases (PK) são efetores finais da maioria das vias de transdução de sinal celular. Tais enzimas realizam a reação de fosforilação aonde o fosfato terminal de resíduos de ATP ou menos frequentemente GTP são transferidos para a hidroxila de aminoácidos como serina, treonina ou tirosina (FIGURA 3).

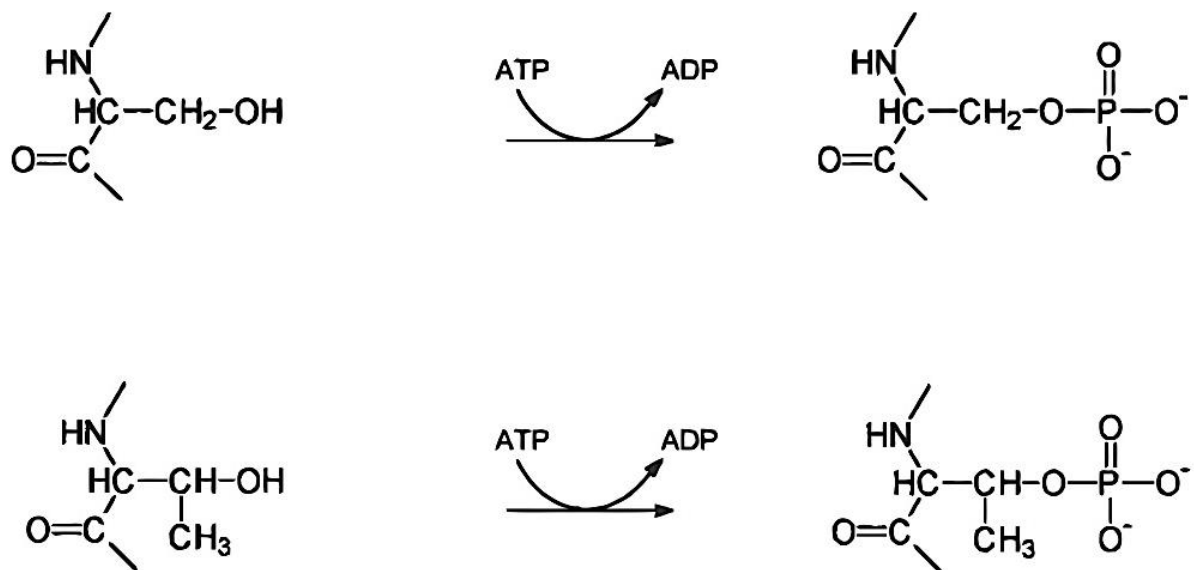


FIGURA 3: Alteração na carga de proteínas por meio da reação de fosforilação. A fosforilação de resíduos de Ser (acima) e Tre (abaixo) é catalisada por quinases específicas que utilizam ATP como doador de fosfatos. O produto da reação é uma Ser/Tre fosforilada que possui duas cargas negativas em pH neutro (KRAUSS, 2003).

A atividade catalítica das PK possui o atributo de beneficiar cineticamente uma reação. Isso porque a reação entre ATP produz quantidades muito pequenas de éster fosfato em água, ou seja, a hidrólise espontânea de monoéster fosfato, tem cinética lenta em condições fisiológicas normais, tornando necessária a ação de fosfatases para que a reação seja acelerada. Assim, a fosforilação de proteínas é reversível e controlada por enzimas em ambas as direções (fosforilação e desfosforilação).

Diversos são os mecanismos utilizados pelos seres vivos para autorregulação e sobrevivência frente à mudanças e estímulos externos e internos, como fosforilação, controle do fluxo de íons, liberação de sinalizadores e mensageiros, entre outros. A fosforilação apresenta-se como um mecanismo ímpar e onipresente no controle da sinalização celular, que fornece a maquinaria eficiente para o controle de diversas atividades proteicas. A capacidade de modificar a ação enzimática é um dos principais mecanismos de regulação em resposta a estímulos, norteando a atividade de redes metabólicas que controlam os processos fisiológicos das células (KRAUSS, 2003).

O processo de fosforilação de resíduos de hidroxiaminoácidos de proteínas é uma alteração pós-traducional que está presente na constituição de quase todos os organismos vivos conhecidos. Ligado covalentemente às hidroxilas dos resíduos dos aminoácidos serina, treonina, tirosina, histidina e aspartato, o grupo fosfato altera a estrutura nativa da proteína, ativando-a ou inativando-a (FIGURA 4) (JOHNSON; LEWIS, 2001).

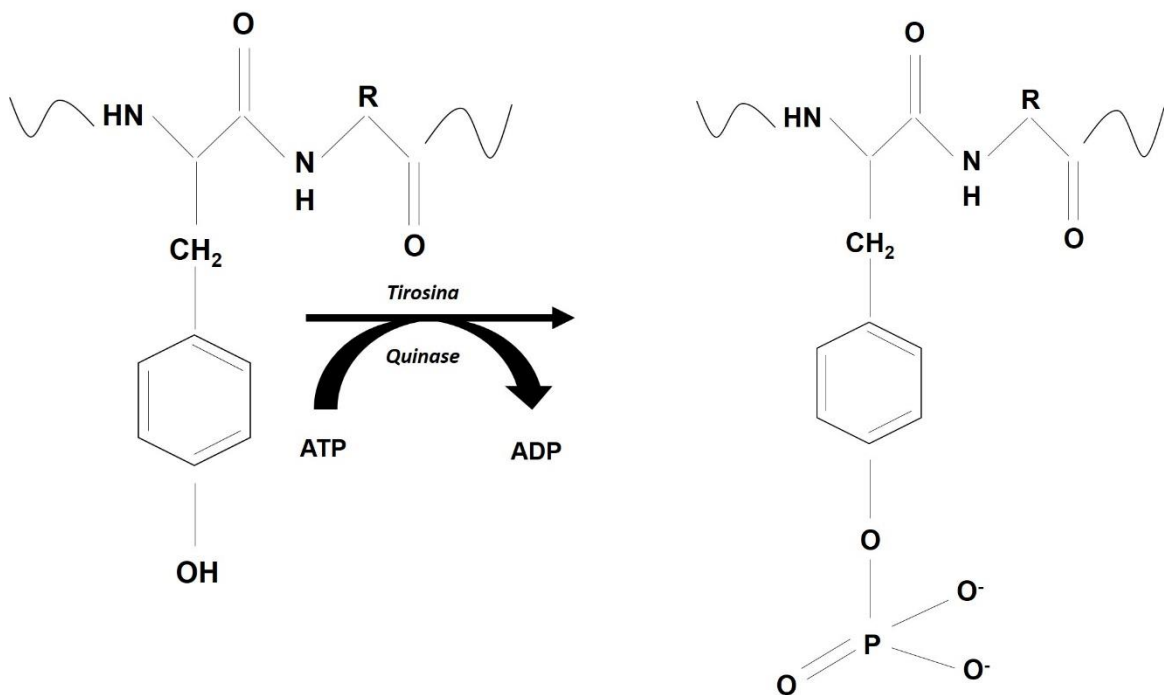
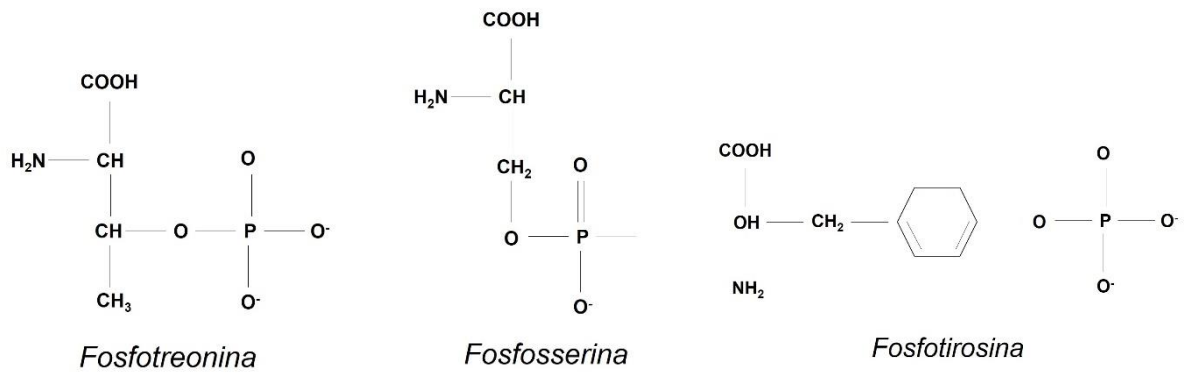


FIGURA 4: Organização estrutural da treonina, serina, tirosina e processo de fosforilação da tirosina (JOHNSON, L. N.; LEWIS, 2001) ADAPTADO.

Esse fato deve-se as propriedades especiais do PO_4 , que possui um pK_a de 6,7 e carrega duas cargas negativas quando em pH neutro, isto é, ele gera duas cargas negativas na cadeia lateral do aminoácido fosforilado, como elucidado anteriormente (FIGURAS 4 e 5). Por conta da presença desse fosfato e de quatro átomos de oxigênio, surge uma forte interação por meio do hidrogênio de outros resíduos, permitindo que ocorram ligações entre diferentes regiões da cadeia carbônica. Grupos duplamente carregados com carga negativa não ocorrem em outros elementos estruturais de proteínas. Os ésteres de fosfato de serina, treonina e tirosina são bastante estáveis a temperatura ambiente e pH neutro; raramente hidrolisam espontaneamente. Por esse motivo, esse processo de fosforilação reversível é catalisado por enzimas quinases que incorporam fosfato (proveniente de uma molécula de ATP) por meio de sua atividade de fosfotransferase e por enzimas fosfatases que o hidrolisam. Esse processo é facilmente visualizado abaixo (FIGURA 5) que mostra a ativação ou inativação proteica por meio da atividade enzimática (KRAUSS, 2003).

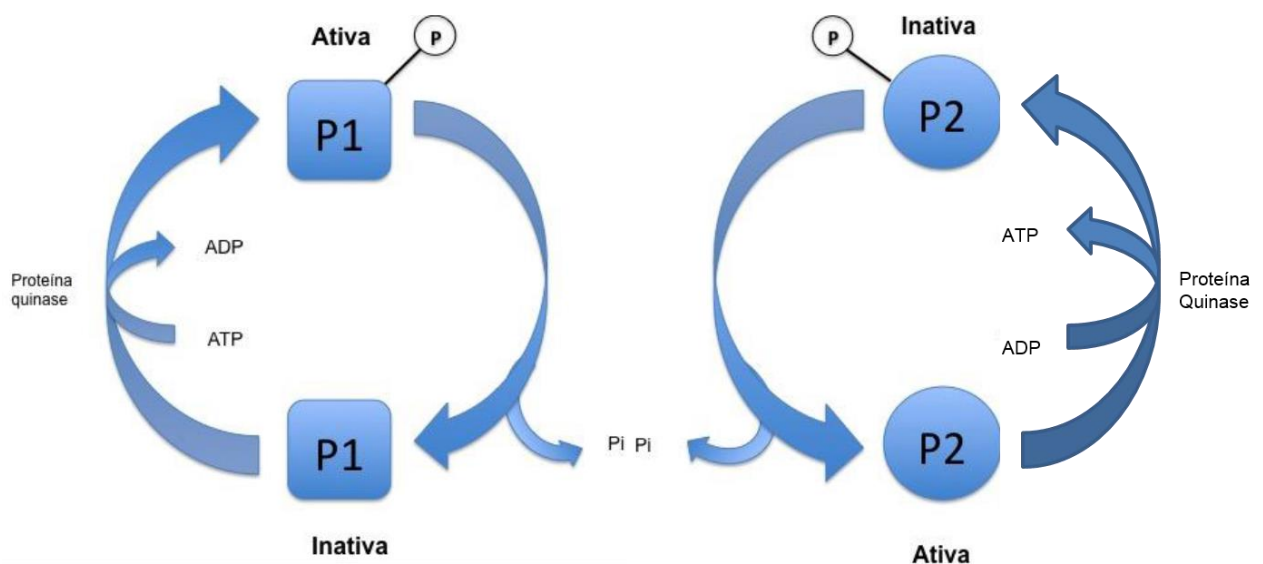


FIGURA 5: - Função de proteínas quinases e fosfatases. Sua fosforilação pode ativar ou inativar sua função de acordo com a proteína alvo. No caso de P1, a fosforilação a torna ativa, enquanto o contrário acontece em P2 (KRAUSS, 2003) ADAPTADO

A fosforilação é realizada de acordo com a especificidade da estrutura dos aminoácidos, por enzimas que fosforilam serinas e treoninas ou tirosinas, dividindo-as em quatro grupos principais: Ser/Tre e Tir quinases e fosfatases.

Até pouco tempo, acreditava-se que o processo de fosforilação de serinas/treoninas era um episódio exclusivo dos organismos eucariotos, enquanto apenas a fosforilação de histidinas e aspartato eram presentes em procariotos (WOLANIN; THOMASON; STOCK, 2002). Entretanto, com o avanço da genômica, descobriu-se que procariotos possuem genes de proteínas quinases e fosfatases de Ser/Tre e Tir, com estrutura e função semelhante a enzimas eucarióticas, porém com sequências primárias variáveis (SHI; POTTS; KENNELLY, 1998).

1.3.2 Proteínas quinases e seu valor terapêutico

Como apontado por Wood (1987), as PK estão intimamente relacionadas a muitas doenças conhecidas como a asma, câncer, doenças do sistema nervoso central (SNC), cardiovasculares, diabetes, dentre muitas outras. Dessa forma, as quinases são motivo de pesquisa e nos últimos anos, de maneira mais expressiva, devido ao seu envolvimento em processos de proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão, apoptose, desregulação ou super-expressão de receptores (BASELGA, 2000).

Baselga (2000) complementa textualmente, afirmando que em tumores malignos humanos, sobretudo no que tange ao seu desenvolvimento e manutenção, a inclusão das proteínas quinases, pode acontecer por um rearranjo genômico, como por exemplo, translocação cromossomal em leucemias, como a dos genes Bcr-Abl e mutações que conduzem a uma desregulação na atividade fisiológica dessas quinases, que podem levar ao desenvolvimento de perda da função de supressores tumorais e como resultado, *sine qua non*, a atividade de oncogenes. Esse ocorrido é pautado, por exemplo, como o que sucede com o oncogene Ras, que é ativado em 30-50% dos cânceres humanos conhecidos, assim como, descontrole na atividade da

quinase Raf, as dependentes de ciclinas e ainda desregulação por expressão imódica dos receptores de EGF (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001)

1.3.3 Quinase celular intestinal (ICK)

A ICK é uma proteína quinase do tipo serina/treonina, evolutivamente conservada no quinoma proteico que é altamente expressa no epitélio intestinal. No intestino, o RNAm da ICK localiza-se especificamente na região das criptas onde as células intestinais progenitoras também conhecidas como células-tronco, e células epiteliais transitórias de rápida replicação residem, implicando um papel importante para ICK na regulação da replicação epitelial e atividades celulares relacionadas às células-tronco. A presença da expressão de ICK foi identificada, nos últimos anos, em uma gama de tecidos, sendo mais frequente no cérebro, medula espinal, testículo, e ovários, embora o nível de expressão pode variar dramaticamente entre diferentes regiões, em alguns indivíduos. Entre as regiões específicas do cérebro, foi detectada, de maneira mais significativa, a presença na região conhecida por corpo caloso (TOGAWA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2009).

A supressão de expressão de ICK *in vitro* é capaz de bloquear significativamente a proliferação das células epiteliais do intestino (FU *et al.*, 2009). O gene do ICK em camundongos codifica uma proteína de 629 resíduos de aminoácidos, composta de um domínio catalítico N-terminal altamente conservado e um domínio C-terminal longo e único (FU *et al.*, 2005, 2006). A ICK pode ser ativada por uma quinase a montante relacionada ao ciclo celular da quinase (CCRK) por meio da fosforilação do resíduo essencial Thr-Treonina-158 na MAPK-like sítio TDY (Treonina-ácido aspártico-Tirosina) (FU *et al.*, 2006).

Ainda segundo Togawa *et al.*, (2000), ICK compartilha similaridade de sequência com a família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). A atividade catalítica da ICK é regulada por dupla fosforilação de um sítio TDY MAPK-like no circuito de ativação T, bem como a fosforilação dos resíduos de

Tre no sítio TDY por quinases relacionadas com o ciclo celular (CCRK) (CHEN *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2009).

No quinoma humano, ICK pertence a uma família mal compreendida de quinases RCK (quinase de hibridização cruzada do gene *v-ros* tirosina quinase), que incluem a quinase MAK, envolvida com a regulação do ciclo celular e expressa quase que exclusivamente em células germinativas primárias de testículos e MOK (MAPK/MAK/MRK quinases relacionadas) também conhecidas como RAGE1 (Antígeno de tumor renal). Todas as quinases da família RCK são compostas de um domínio catalítico N-terminal com um sítio TDY e comprimentos variáveis de um domínio C-terminal com função desconhecida. Recentemente, as funções biológicas de ICK e MAK têm sido associadas às doenças humanas. Uma mutação recessiva na perda da função de ICK R272Q foi identificada como sendo a causadora de uma síndrome letal em neonatos, ECO (*endocrine-cerebro-osteodysplasia*) (CHEN *et al.*, 2013; MIYATA; NISHIDA, 1999). Embora as proteínas quinases ICK, MAK e MOK sejam semelhantes em seus domínios catalíticos N-terminais, elas diferem marcadamente na organização estrutural em seus domínios não catalíticos C-terminal como indicado na ilustração em seguida (FIGURA 6) (CHEN *et al.*, 2013).

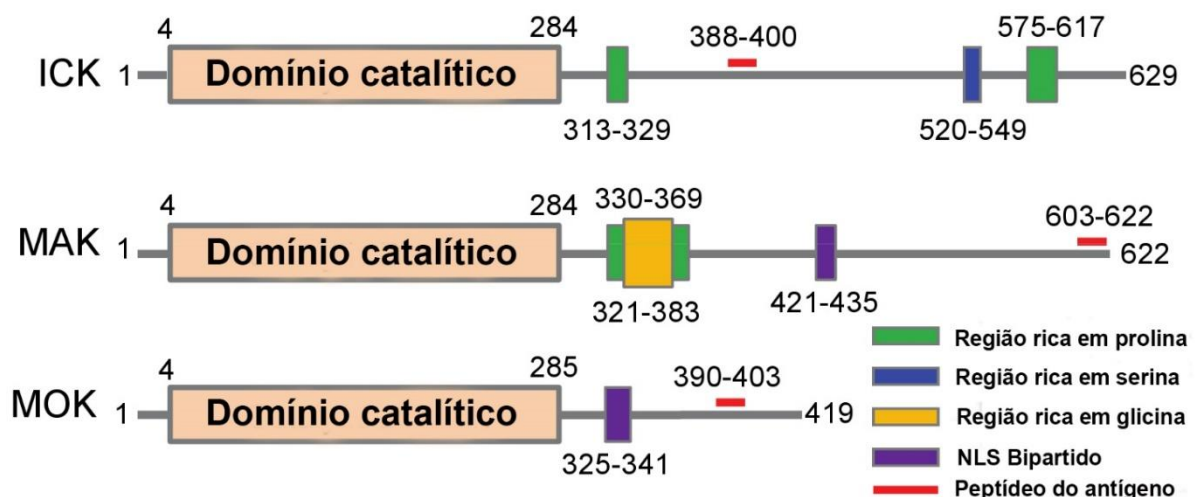


Figura 6: Ilustração esquemática dos domínios e funções estruturais das proteínas quinases ICK, MAK e MOK (CHEN *et al.*, 2013).

A expressão de RNA mensageiro (RNAm) de ICK parece estar mais direcionada ao compartimento proliferativo das criptas intestinais onde residem as células progenitoras (TOGAWA *et al.*, 2000). A localização específica do RNAm de ICK na cripta sugere uma função importante dessa proteína, em algum aspecto, sobre a atividade das células-tronco e progenitoras. Várias cascatas de sinalização Wnt, incluindo, Hedgehog, BMP e Notch têm sido implicadas no controle da atividade das células-tronco, proliferação, comprometimento de linhagem, diferenciação terminal e a sobrevivência das células durante o desenvolvimento e regeneração dos tecidos normais do epitélio do trato gastrointestinal (DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003; PERRYMAN; SYLVESTER, 2006).

Recentemente, a ICK também foi destacada como responsável, juntamente com Cdk20, também conhecida como quinase relacionada com o ciclo celular ou CCRK, pela progressão do ciclo celular para a fase S, aumentando a capacidade proliferativa das células (MALUMBRES, 2014; YANG; ROINE; MÄKELÄ, 2013). A desregulação das vias de sinalização que controlam estes processos biológicos pode levar a neoplasia intestinal (BEACHY; KARHADKAR; BERMAN, 2004; PERRYMAN; SYLVESTER, 2006; REYA; CLEVERS, 2005; YANG; ROINE; MÄKELÄ, 2013). Recentemente, também surgiu, um papel para a via de sinalização alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) durante o desenvolvimento e morfogênese do epitélio intestinal (LONG *et al.*, 2002; MAKKY; TEKIELA; MAYER, 2007).

1.4. Vias de sinalização e proliferação celular.

Nas palavras de Togawa *et al.* (2000), os organismos respondem a estímulos endógenos e exógenos, graças a uma intrínseca rede de comunicação, que ativam um complexo circuito de sinais que são transmitidos a alvos intracelulares, por interações proteicas, que por sua vez, estão envolvidas em um vasto número de processos celulares tais como a proliferação, diferenciação e apoptose.

Esse é o princípio da sinalização celular, onde células se comunicam por meio de ligantes, secretadas ou expostas em sua superfície. O desenvolvimento desses

organismos e a manutenção de suas funções vitais dependem de uma cooperação das células que os constituem, na medida em que os processos realizados por essas células têm que ser desempenhados de maneira coordenada (SOUZA *et al.*, 2014). Na maneira apresentada por Souza *et al.* (2014), as moléculas-sinal são reconhecidas por receptores, geralmente proteínas que podem estar expostas na superfície celular ou presentes no interior das células. Esses receptores, após se unirem aos ligantes, transmitem a informação para outras proteínas presentes no interior da célula, mecanismo conhecido como transdução de sinal. Esse mecanismo pode desencadear diferentes respostas, como alteração da função de uma proteína (resposta rápida e passageira) ou modificação de expressão gênica, levando a uma alteração na quantidade de proteína dentro da célula (resposta lenta e mais prolongada). Essas modificações levam a alterações no comportamento da célula, visto que as proteínas são as responsáveis por dirigir as funções celulares (FIGURA 7).

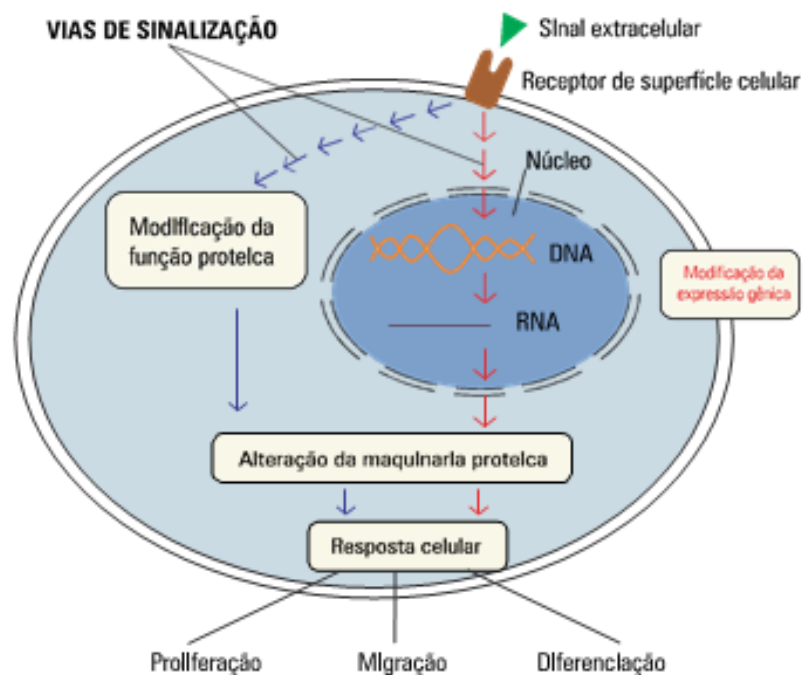


FIGURA 7: Transdução de sinais. O estímulo de um receptor de superfície celular por um sinal extracelular desencadeia uma cascata de sinalização intracelular (via de sinalização), transferindo a informação do meio extracelular para o meio intracelular. As vias de sinalização promovem uma resposta celular que pode ser dependente ou independente de modificações da expressão gênica (SOUZA *et al.*, 2014).

A transdução de sinal ocorre pelas vias de sinalização, as quais geralmente são constituídas por proteínas comprometidas com a regulação de eventos da fisiologia celular, como proliferação, migração, diferenciação celular, etc. A maior parte das proteínas que participam das vias de sinalização são enzimas, biocatalizadores, que atuam na aceleração das reações bioquímicas. Dentre elas encontram-se as quinases, que constituem uma das principais famílias de proteínas em mamíferos. Elas são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfatos de moléculas do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) para outras moléculas orgânicas, como lipídeos e proteínas. Como exemplo, podem ser citadas as quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (*ERK1/2, Extra cellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), proteínas serina/treonina quinase que atuam na fosforilação de aminoácidos serina e treonina presentes em seus alvos proteicos; e a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase), que atua na fosforilação do fosfolípido fosfatidilinositol presente nas membranas celulares (SOUZA *et al.*, 2014).

Outras proteínas com importante participação em vias de sinalização são as que abrangem a família das GTPases, enzimas que quando ativas operam na hidrólise da molécula do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP), gerando como produto guanosina difosfato (GDP) e fosfato inorgânico. As GTPases são enzimas que ciclam entre um estado ativo ligado à GTP e um estado inativo ligado à GDP, mecanismo controlado por proteínas regulatórias. Quando ativadas, as GTPases podem se associar às proteínas efetoras regulando sua atividade. Como exemplo de GTPases podemos citar dois membros da superfamília Ras de pequenas GTPases: a Ras que atua na ativação de várias vias de sinalização, como aquelas relacionadas às proteínas ERK1/2 e PI3K; e a Rho, relacionada com a ativação de moléculas efetoras como a Rho quinase (ROCK), (MELOCHE; POUYSSEGUR, 2007). A desregulação das vias de sinalização celular, causada geralmente por aumento/diminuição da atividade ou expressão de seus constituintes proteicos, pode levar ao descontrole de eventos fisiológicos e desencadear doenças, incluindo o câncer (LEVE; MORGADO-DIAZ, 2012).

No organismo adulto, a maioria das células se encontra em um estado chamado G₀ ou quiescente. A determinação iniciar ou não a proliferação celular é influenciada por uma gama de sinais exógenos incluindo: fatores mitóticos como EGF

e PDGF, nutrientes, e fatores de inibição como a influência mútua célula-célula ou com a matriz extracelular subjacente. A célula é responsável por integrar todos esses sinais. Quando o equilíbrio é adequado, ela inicia o mecanismo de proliferação (WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Williams e colaboradores (2012) enumeram 4 fases sequenciais do ciclo celular (FIGURA 8): G1,S,G2 e M. O período inicial onde a célula inicia a síntese necessária para a fase seguinte é a G1, onde sua massa é visivelmente aumentada para suportar a divisão. Na fase S ocorre a duplicação da fita de DNA e logo em seguida a célula entra em uma fase chamada G2 para que as proteínas importantes para o aparelhamento da cromatina e mitose sejam sintetizadas. A fase M vem em seguida, onde ocorre a mitose, com a divisão do material genético, garantindo a formação de duas células idênticas.

Basicamente, o processo de regulação do ciclo celular é feito pela ação das proteínas-chave que monitoram a sequência de episódios que o distinguem, organizado por meio da formação de complexos entre a família das quinases dependentes de ciclina (CDK) e suas reguladoras, as ciclinas. Os inibidores CDK (CKIs) que compreendem a família CIP/KIP (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) e INK4 (*Inhibitor of Kinase 4/Alternative Reading Frame*) são os responsáveis pela regulação da atividade desses complexos (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A família CIP/KIP inclui os genes p21, p27 e p57. Eles interrompem o ciclo celular na fase G1, ligando-se e inativando complexos ciclina-CDK. A p21 é ativada por p53 (que, por sua vez, é desencadeada por danos no DNA, por exemplo, devido à radiação). Em seguida p27 é ativada pelo fator de crescimento transformante β (TGF β), um inibidor de crescimento. Já a família INK4a / ARF inclui p16^{INK4a}, que se liga a CDK4 e detém o ciclo celular na fase G1 e p^{19ARF} que evita a degradação da p53 (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

As proteínas Retinoblastoma (RB) e a supressora tumoral p53 são outras importantes proteínas que regulam negativamente a progressão da fase G1 para a S. Proteínas RB quando inativadas causam ruptura de suas interações com o fator de

transcrição E2F, ocorrendo uma estimulação de transcrição de genes intrincados na progressão do ciclo celular (HARBOUR; DEAN, 2000). A proteína p53 responde à mutações no DNA, fazendo parte dos mecanismos de checagem celular, promovendo transcrição de proteínas como CDKI p21, que intervém na parada do ciclo celular, ou outras proteínas que estão envolvidas na promoção da apoptose (KO; PRIVES, 1996).

Para Williams (2012) qualquer mutação nos genes que codificam as proteínas responsáveis pela cascata de sinalização da mitose, como PI3K/AKT, p53 e CDKs, pode resultar no distúrbio do ciclo celular e no desenvolvimento de neoplasias. O desequilíbrio do ciclo é um dos principais fatores que influenciam a propensão ao câncer.

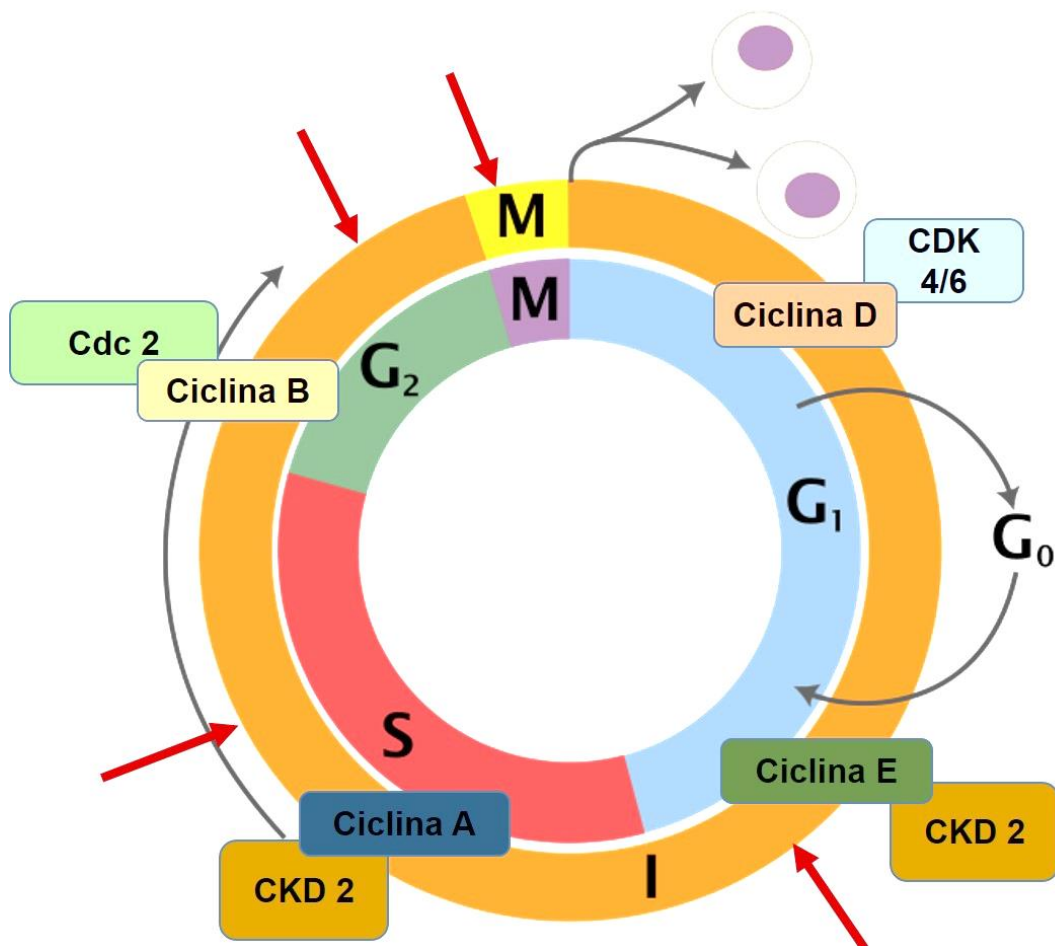


FIGURA 8: Representação do ciclo celular. O ciclo progride em eventos sequenciais e definidos que são controlados pelos complexos de proteínas ciclinas e CDKs. As setas em vermelho mostram os pontos de checagem de danos no DNA, assim como anormalidades estruturais (JOHNSON; LEWIS, 2001) ADAPTADO.

1.4.1 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é uma superfamília de quinases serina/treonina envolvida na regulação de uma vasta gama de respostas celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. É outra via efetora desencadeada pela sinalização mitogênica de RTKs no câncer (SU; KARIN, 1996).

As vias MAPK são compostas por um de três níveis de quinase: Uma MAP3K, ao ser ativada por estímulos extracelulares, fosforila a MAP2K em seu resíduo de serina e treonina, e então a MAP2K ativa a MAPK por meio de fosforilação em seu resíduo de serina e tirosina. Essa cascata de sinais por MAP quinase tem sido evolutivamente bem conservada desde leveduras até mamíferos (COBB, 1999).

Esse processo é facilmente representado adiante (FIGURA 9), onde a cascata inicia com a ativação de um receptor de membrana transmembranar, o receptor do fator de crescimento (EGF), que por sua vez ativa a proteína RAS por meio da molécula adaptadora GRB2 e um fator de troca do nucleotídeo guanina SOS, induzindo RAS a trocar GDP por um GTP (SILVA *et al.*, 2009).

O processo segue com uma estimulação sequencial de proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (específica para Ser/Thr), MEK e MAPK. A proliferação celular é então iniciada no núcleo pela migração dessas proteínas que fosforilam um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição (DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005).

Para elucidar, várias quinases MAP distintas foram identificadas atuando em vias de sinalização independentes e com funções pleiotrópicas. Estas incluem as quinases extracelulares p42/p44, (ERK 1 e 2), proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) / proteína quinase ativada por estresse (SAPK) e quinase MAP p38 (HAN *et al.*, 1994; KYRIAKIS *et al.*, 1994). Estas quinases representam os estágios terminais de cascatas de sinalização, iniciadas pela ligação de receptores de crescimento/fatores de sobrevivência ou de morte (BOING *et al.*, 2006; WIDMANN *et al.*, 1999).

A ativação das quinases JNK/ SAPK e p38 MAP está geralmente associada com a promoção da apoptose, enquanto a atividade de ERK p42/44 com a inibição (FIGURA 10)

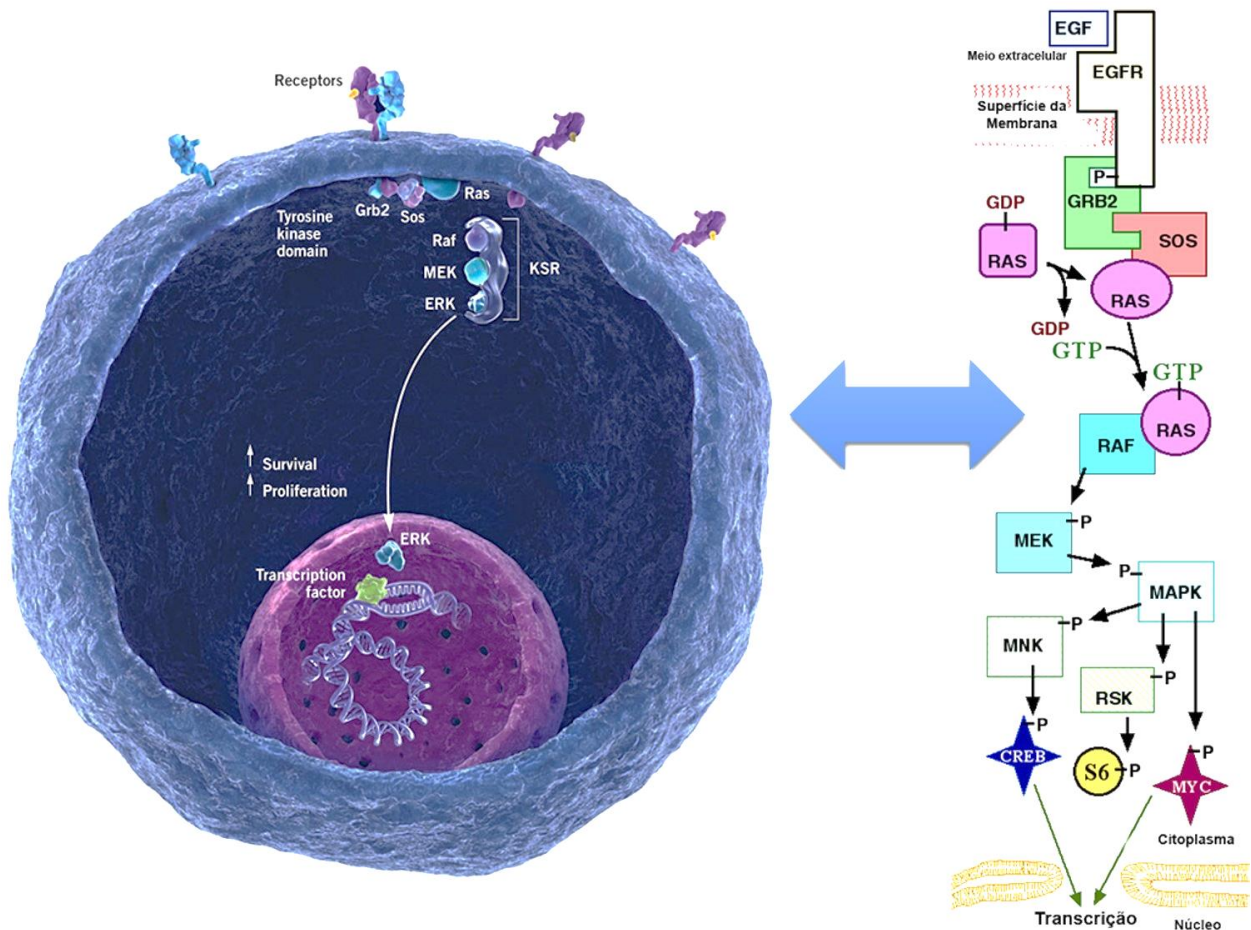


FIGURA 9: Cascata da MAPK. A proteína Ras é ativada mediante fosforilação do receptor tirosina quinase. Ras ativa então a proteína quinase Raf-1 que por sua vez ativa ERK1/2. ERK pode então ativar alvos citoplasmáticos ou nucleares que regulam a proliferação celular e promovem sobrevivência controlando a ação de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (MCCUBREY et al., 2007a, 2007b) ADAPTADO

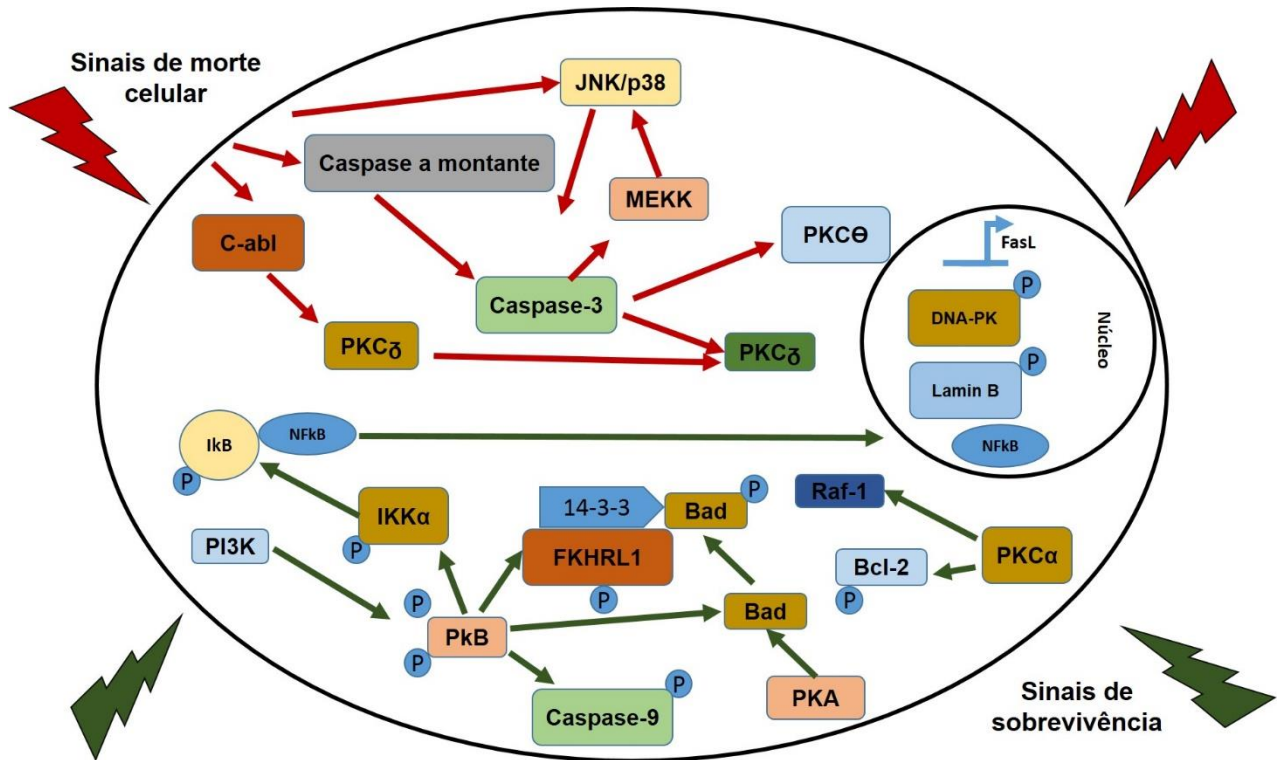


FIGURA 10: Vias de sinalização envolvidas diretamente na regulação da cascata apoptótica. Fatores extracelulares induzindo a apoptose (mostrado em vermelho) induz a ativação de JNK e MAPK p38 além de vias que levam à ativação de efetoras de caspases (caspase3) por meio de caspases a montante (caspase 8 e 9). A ativação da JNK leva à indução de genes pró-apoptóticos, incluindo Fas ligante (FasL). Sinais de morte também são repassadas via ativação de c-abl levando a translocação nuclear de PKC-d e ativação subsequente pela caspase 3. Outros alvos de caspase 3 incluem PKC-u e MEKK. A ativação de MEKK fornece novos sinais por meio da via da JNK e PKC-d estando envolvidos em efetuar mudanças nucleares apoptóticas pelos substratos, tais como DNA-PK e lamina B. Sinais para a sobrevivência da célula (em verde) incluem a ativação de PKB, via de PI3K, que conduz à fosforilação e inativação de Bad, caspase 9 e fator de transcrição forkhead FKHRL1. A sobrevivência também pode ser induzida pela ativação de PKC-a, cujo alvos são mitocondriais e incluem bcl-2 e possivelmente Raf-1. PKA também é capaz de evitar a apoptose e seus alvos podem também incluir Bad (CROSS et al., 2000).

Como exatamente os vários caminhos de sinalização MAPK modificam a taxa de apoptose não é ainda conhecido; embora o seu papel fundamental como modulador da atividade dos fatores de transcrição seja indubitavelmente importante. No caso da via ERK, deve-se ter em mente que sua atividade é mais intimamente associada com a proliferação de células e vários autores sugerem que a inibição da apoptose pela ERK é uma função secundária ao seu papel na proliferação. ERK-1 e ERK-2 translocam para o núcleo após ativação corroborando com evidências que mostram que essa ação seja necessária para a indução da expressão gênica e regulação do ciclo celular. Por exemplo, a expressão de uma MEK1 ativa, a quinase a montante de ERK, em células NIH 3T3, induz a entrada da célula na fase S, regula a jusante p27kip1 e aumenta a regulação da expressão de proteína ciclina D1. No entanto, outros alvos potenciais de ERK que são diretamente envolvidos na apoptose estão sendo identificados (GREULICH; ERIKSON, 1998).

1.4.2 Via ERK

A via de sinalização ERK é um dos mais estudados, no que se refere a via MAPK em mamíferos e sua “desregulação” é responsável por aproximadamente, um terço de todos os cânceres em humanos. Historicamente, a via ERK era sinônimo de proliferação celular, mas agora, fica claro, que a desregulação desta via é associada a muitos outros aspectos do fenótipo tumoral. No módulo MAPK-ERK, ERK (ERK1 e ERK2) é ativado após a fosforilação por MEK (MEK1 e MEK2), que é ativado quando fosforilada por Raf (Raf-1, B-Raf e A-Raf).

A sinalização ERK é ativada por numerosos estímulos extracelulares onde fatores intrínsecos que envolvem a presença de fatores de crescimento e mitógenos, tornam ERK de particular relevância para o estudo do câncer. Nesta via, o receptor tirosina quinase ativa a guanosina trifosfato (GTP) carregando GTPase Ras, que, em seguida recruta as Raf quinases na membrana para a ativação. A maioria das lesões associadas ao câncer que levam à ativação constitutiva da sinalização de ERK ocorrem nessas etapas precoces da via (MCCUBREY *et al.*, 2007a, 2007b).

1.4.3 Via mTOR/PI3K/AKT

As enzimas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), Akt, e (mTOR) alvo da rapamicina em mamíferos, compreendem três principais cruzamentos da via de sinalização PI3K e normalmente são ativados pela sinalização a montante da tirosina quinases e outros receptores de moléculas (LIU *et al.*, 2009).

A classe IA PI3Ks são um subgrupo da família PI3K que são ativadas por receptores tirosina quinases, sendo uma das vias fundamentais efetoras, desencadeadas pela sinalização mitogênica de RTKs em processos oncogênicos (TOKER, 2012). Sua principal função é converter PIP2 em PIP3. Como apontado por Nieto-Sampedro (2011), Akt é ativada após ser recrutada para a superfície celular por PIP3 e age a jusante na PI3K regulando muitos processos celulares, incluindo os de regulação, proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência. mTOR, por sua vez, é uma proteína chave na via que atua tanto a montante como a jusante de Akt (VIVANCO; SAWYERS, 2002), sendo ativa em dois complexos multiproteicos diferentes, TORC1 e TORC2, que regula a síntese de proteínas necessárias para a célula desempenhar processos como, crescimento, proliferação e angiogênese dentre outros (BHASKAR; HAY, 2007; LEE; HUNG, 2007; VIVANCO; SAWYERS, 2002).

A ativação da via de sinalização PI3K regula: proliferação e sobrevivência celular pela via AKT (FIGURA 11). O aumento da atividade desta via no câncer pode não ser resultado apenas do aumento da ativação dos receptores, mas também da super-expressão ou deleção de alguma proteína importante para a via (OGITA; LORUSSO, 2011; TOKER, 2012). Como mostram os estudos feitos por Weichhart (2012), a desregulação da via mTOR também é frequentemente observada em vários tipos de câncer e em doenças genéticas, como a doença renal cística complexa ou esclerose tuberosa também conhecida como Síndrome de Bourneville-Pringle.

Na maneira apresentada por Lucas (2011); Sarbassov *et al.* (2005) e em uma contribuição mais recente por Toker (2012), o receptor uma vez ativado, recruta fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) para próximo da membrana plasmática. Por sua vez, a PI3K fosforila o fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) gerando

fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). PIP₃ recruta a proteína AKT/PKB (*Protein Kinase B*) para perto da membrana, onde ela é em seguida fosforilada pelo complexo mTORC2 (mTOR-*Rictor Kinase Complex 2*) na posição Serina 473 e por PDK (3-*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*) na posição Treonina 308, tornando-se ativa, de acordo como simplificado abaixo (FIGURA 11).

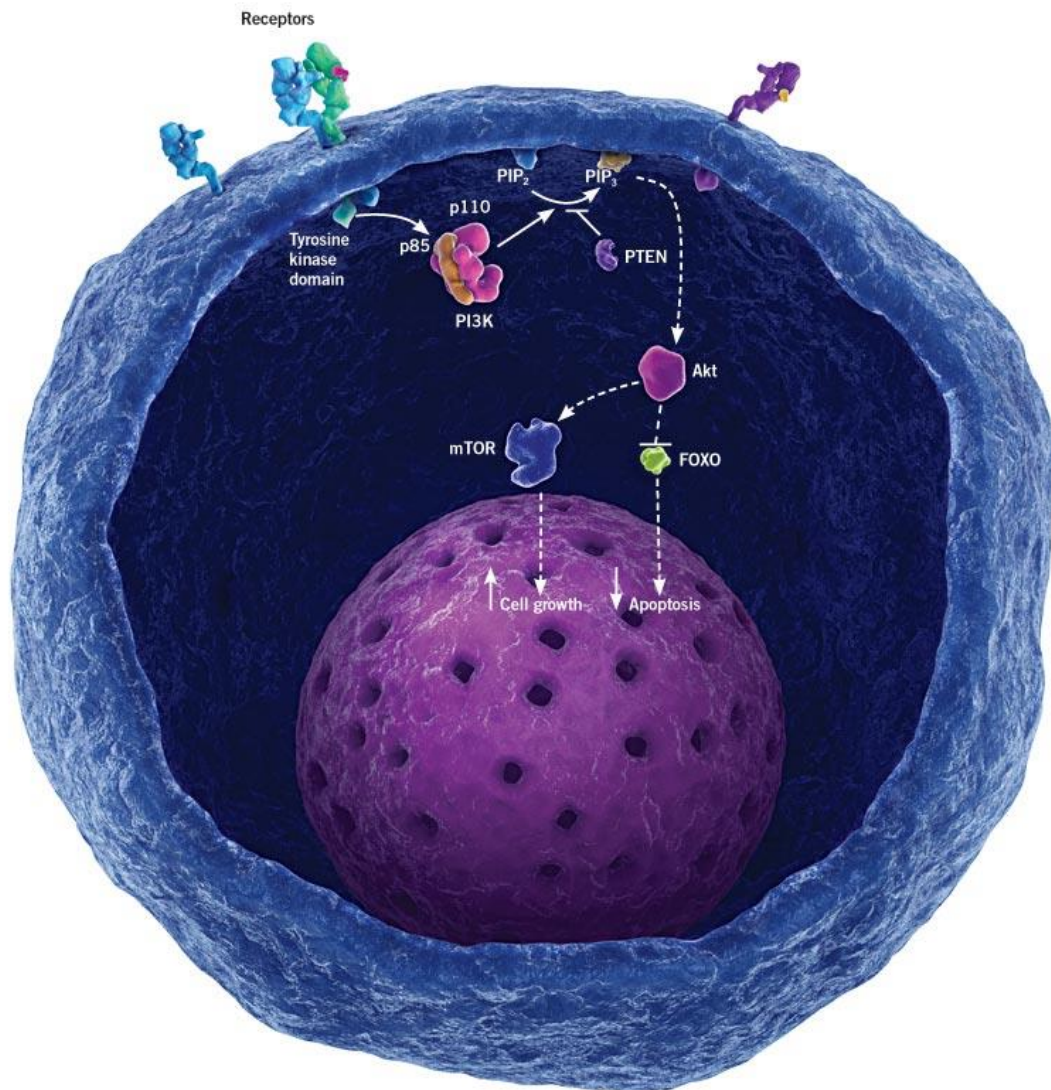


FIGURA 11: Via de sinalização simplificada mTOR/PI3K/AKT. O receptor recruta PI3K para perto da membrana, que por sua vez, fosforila PIP₂ gerando PIP₃ que recruta AKT para perto da membrana onde é posteriormente ativada por fosforilação pelo mTORC2. AKT pode também fosforilar o fator de transcrição FOXO1 suprimindo a sinalização apoptótica e promovendo sobrevivência (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010; SARBASSOV et al., 2005) ADAPTADO.

Depois de sua ativação, a proteína quinase B (AKT) pode fosforilar e ativar ou inibir de forma direta ou indireta uma grande quantidade de proteínas como por exemplo, mTOR, Bad, caspase-9, MDM2, p21Waf1/Cip1, GSK-3 β , FOXO1, NF-k β , etc. Como produto da sinalização mediada por essas proteínas podemos citar, proliferação e sobrevivência (BRUNET *et al.*, 1999; CARDONE *et al.*, 1998; KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010).

Nas declarações de Skurk *et al.* (2005), a proteína AKT tem como principal alvo a quinase glicogênio sintetase 3 (GSK-3 β). Quando ativada AKT pode fosforilar a GSK-3 em Serina 9, tornando-a inativa (WANG *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). A quinase glicogênio sintetase 3 é uma proteína pró-apoptótica com capacidade de regulação dos níveis intracelulares da proteína β -catenina, componente da via de sinalização Wnt. Muitos trabalhos já demonstraram que a ativação exacerbada do caminho de sinalização Wnt pode estar envolvido com o processo de oncogênese e progressão tumoral, já que a proteína β -catenina hipofosforilada consegue se translocar para dentro do núcleo estimulando a expressão de genes importantes que codificam proteínas como c-myc, ciclina D1 e survivina (HATSELL *et al.*, 2003; SHTUTMAN *et al.*, 1999), envolvidas em processos de sobrevivência e proliferação celular. No momento em que GSK-3 β está ativa, essa consegue fosforilar β -catenina, marcando-a para ubiquitinação e degradação proteolítica, inibindo sua atividade (DOBLE; WOODGETT, 2003; RAYASAM *et al.*, 2009). Além de interação com as vias Wnt, GSK-3 β também é capaz de fosforilar e inibir diretamente a proteína ciclina D1 e a proteína Mcl-1, que estão envolvidas com os processos de progressão do ciclo celular e apoptose, respectivamente, ou ainda inibindo e interagindo com os fatores de transcrição c-myc e c-jun (DOBLE; WOODGETT, 2003; OPFERMAN, 2006).

1.4.4 Via Wnt/ β -Catenina

A família Wnt de proteínas de sinalização, participa ativamente de inúmeros eventos durante a embriogênese e também na homeostase de tecidos adultos. Os sinais da via Wnt/ β Catenina são pleiotrópicos, possuindo efeitos que incluem estímulo mitótico, especificação de destino celular e diferenciação. Os efeitos de Wnt em

fatores proto-oncogênicos foram descobertos há quase vinte anos, o que gerou uma vasta investigação sobre o papel desses genes específicos em neoplasias humanas (ESPADA *et al.*, 2009).

Basicamente, a sinalização Wnt, pode ocorrer por duas vias distintas: a canônica e não canônica. A via canônica é muitas vezes referida como a via Wnt/ β -catenina, e acontece quando os sinais de Wnt são estimulados e desencadeiam a ativação da β -catenina dependente de transcrição. Em contraste, as vias de Wnt não canônicas, incluindo Wnt/ Ca^{2+} (cálcio) e vias Wnt/JNK (quinase c-Jun N-terminal), Essas vias são β -catenina independente e normalmente dão origem a uma variedade de diferentes cascatas de sinalização intracelular (FIGURA 12) (LIEN; FUCHS, 2014).

A sinalização Wnt canônica tem um importante papel na manutenção da proliferação celular nas criptas intestinais, diferenciação das células de Paneth e em direcionar a migração celular ao longo do eixo do vilos (BAKSH; BOLAND; TUAN, 2007; RICHMOND; BREAUULT, 2010). A via canônica é caracterizada pela estabilização da β -Catenina no citoplasma, com translocação nuclear posterior da mesma, o que facilita a ativação de genes-alvo dos fatores de transcrição TCF/LEF, finalizando com a indução transcricional de genes alvos efetores. Na ausência de ligantes Wnt, a β -catenina, uma proteína solúvel no citoplasma, é rapidamente degradada pelo seu complexo de destruição, formado por axina, APC (Adenomatous Polyposis /coli) e GSK3 β (glicogênio sintetase quinase-3 beta) (RICHMOND; BREAUULT, 2010).

Mutações que causam ativação constitutiva da via Wnt podem levar a uma grande variedade de neoplasias, pela deleção do complexo de destruição da β -catenina, o que leva a um aumento aberrante das criptas, diminuição do tamanho dos vilos, causando uma fusão das criptas levando ao aparecimento de grandes pólipos adenomatosos compostos de várias criptas aberrantes. O melhor exemplo conhecido é a Polipose Familiar Adenomatosa (FAP), uma doença autossômica dominante em que os pacientes apresentam múltiplos pólipos no cólon associados à estabilização exacerbada de β -Catenina (ANDREU *et al.*, 2005; SANSOM *et al.*, 2004).

Levando em consideração que a via Wnt não canônica regula células-tronco, é possível especular que essa via também desempenhe um papel importante em processos oncogênicos. Como essa via mantém quiescência de células-tronco e inibe a via de sinalização Wnt canônica, tem sido considerada principalmente uma via supressora de tumores. A via Wnt também parece ter influência sobre a diferenciação celular, com a ablação condicional do receptor Frizzled5, levando ao surgimento de células de Paneth imaturas, que não se encontram mais restritas a base da cripta, mas dispersas por todo o eixo vilo-cripta, enquanto a deleção do gene Sox9, um fator de transcrição dependente de Wnt, leva a formação de um epitélio desprovido de células de Paneth e com 40% a menos de células caliciformes (ESPADA *et al.*, 2009; VAN ES *et al.*, 2005).

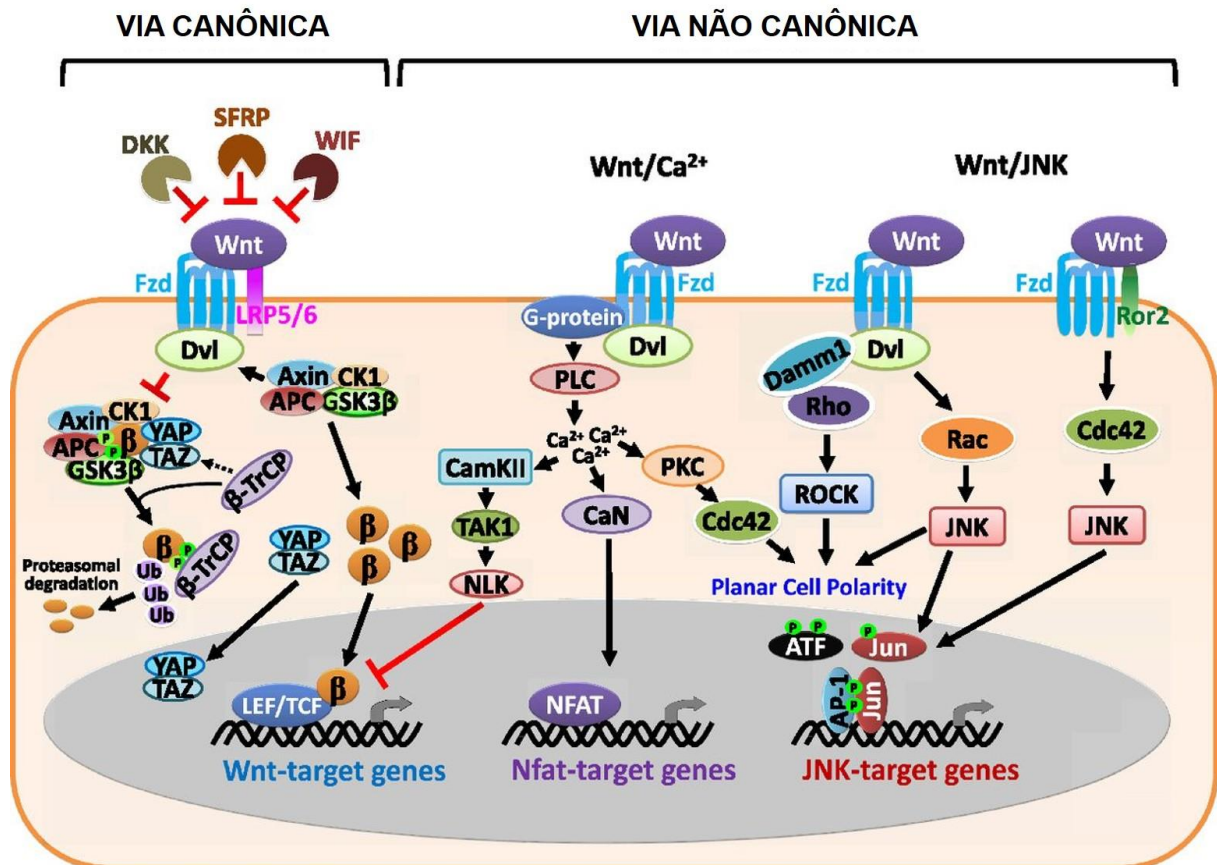


FIGURA 12: Visão geral das vias de sinalização Wnt. Este diagrama esquemático exibe de forma simplificada as vias Wnt canônica e não-canônicas (β -catenina-dependente/independentes). Na ausência de Wnt, β -catenina é alvo de um complexo destrutivo que fosforila β -catenina para a sua degradação. Este complexo é composto pelas proteínas do núcleo Axin, CK1 α , APC, e GSK3 β . Assim como β -catenina, YAP/TAZ também pode se associar a este complexo e de fato é essencial para o seu recrutamento da ubiquitina ligase β -TRCP E3, que marca a de β -catenina para sua degradação. A ligação de Wnt com FZD e LRP5/6 ativa a proteína citosólica Dvl, que conduz à inibição do complexo. A acumulação de β -catenina estabilizada na presença de fatores de transcrição LEF/TCF, resulta na sua translocação para o núcleo para ativar genes Wnt-responsivos. Esta ativação pode ser suprimida por TAK1-NLN, que é ativado pelas vias Wnt não-canônicas. Aqui também são delineadas as vias Wnt/Ca²⁺ e vias Wnt/JNK, os quais são β -catenina-independentes. A ligação de isoformas Wnt, seja FZD ou outros receptores de quinase como tirosina (por exemplo, Ror2) pode desencadear várias cascatas de sinalização. Algumas delas resultam na ativação de GTPase Rho, Rac e Cdc42 que regulam o rearranjo do citoesqueleto e a polaridade planar da célula (PCP); algumas das cascatas desencadeiam eventos de transcrição por ativação dos fatores de transcrição (por exemplo, NFAT e AP-1). Os mecanismos subjacentes de β -catenina independente e de sinalização Wnt também são suscetíveis e determinados pelo contexto celular.

2. JUSTIFICATIVA

A quinase celular intestinal (ICK) é um componente-chave recentemente descoberto na rede de sinalização intestinal que promove a proliferação celular na cripta intestinal (FU *et al.*, 2009; TOGAWA *et al.*, 2000).

O eixo de sinalização de CCRK-ICK desempenha um papel importante na regulação da progressão do ciclo celular em G1 (AN *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2009; LIU; WU; GALAKTIONOV, 2004). No entanto, ao contrário das MAPKs, a atividade da ICK não foi agudamente estimulada por soro ou fatores de crescimento (TOGAWA *et al.*, 2000). Fica, portanto, uma grande dúvida sobre quais estímulos ou fatores ambientais podem regular a expressão e ou atividade ICK. As funções fisiológicas e substratos para ICK no intestino ainda são pouco conhecidos, embora tenham sido identificados dois reguladores chave do crescimento e sobrevivência celulares conhecidos por *Scythe* e *Raptor*, em substratos de ICK *in vitro* (FU *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2012).

Portanto, ainda há uma escassez de literatura sobre o papel da ICK na resposta compensatória do epitélio intestinal após deprivação de proteína e ainda não se sabe quais os mecanismos e processos de sinalização associados à ICK que regulam o *turnover* do epitélio intestinal, favorecendo a viabilidade e sobrevivência das células.

Este estudo pretende avaliar se o estresse nutricional (deprivação de proteína), tanto *in vivo* como *in vitro*, como uma agressão ambiental, é capaz de regular de forma aguda e transitória o nível de atividade proteica e de transcrição da ICK intestinal e seu envolvimento com importante vias de sinalização que regulam proliferação e apoptose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o papel da quinase celular intestinal (ICK) em modelos de desnutrição *in vitro* e *in vivo* e o envolvimento na regulação de vias celulares que modulam os processos de viabilidade, proliferação e apoptose.

3.2. Objetivos Específicos

- Testar um modelo experimental de desnutrição em camundongos C57BL6/J com uso de ração contendo 2% de proteína, afim de avaliar alterações na expressão e regulação da ICK e seu transcrito de RNAm no intestino.
- Avaliar as alterações da expressão e regulação da ICK e seu transcrito de RNAm com uso da linhagem epitelial de adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8) após restrição de soro fetal bovino (0-1%), como forma de deprivação proteica.
- Analisar a expressão e regulação da ICK em modelo de desnutrição *in vivo* e *in vitro* por meio de testes de *western blot*.
- Promover a atenuação da proteína ICK com uso de técnicas de transfecção viral pelo uso de RNA de interferência (*small hairpin RNA / short hairpin RNA (shRNA)*) em células HCT-8, regulando a expressão do gene.
- Associar o envolvimento da ICK com a ativação de vias de sinalização relacionadas com a proliferação e sobrevivência celular incluindo Wnt/ β -catenina, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteína quinase B (PKB/Akt), bem como a expressão de marcadores para células-tronco intestinais Bmi1 e Lgr5 por *western blot*.

- Avaliar a ocorrência de apoptose pela técnica de Anexina V por citometria de fluxo e o mecanismo de apoptose dependente de caspases pela quantificação da expressão de caspase 3, 9 e PARP-clivada por *western blot*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo animal e aspectos éticos

Sessenta fêmeas de camundongo C57BL/6 (FIGURA 13) com 24 dias pós-natal foram adquiridas do Laboratório Charles River, Inc. (Wilmington, MA, EUA). Os animais foram aclimatados e alimentados com uma dieta normal por 7 dias, no biotério da Universidade da Virginia, onde receberam água e ração *ad libitum*, que posteriormente foram atribuídos a grupos experimentais pareados por peso corporal.

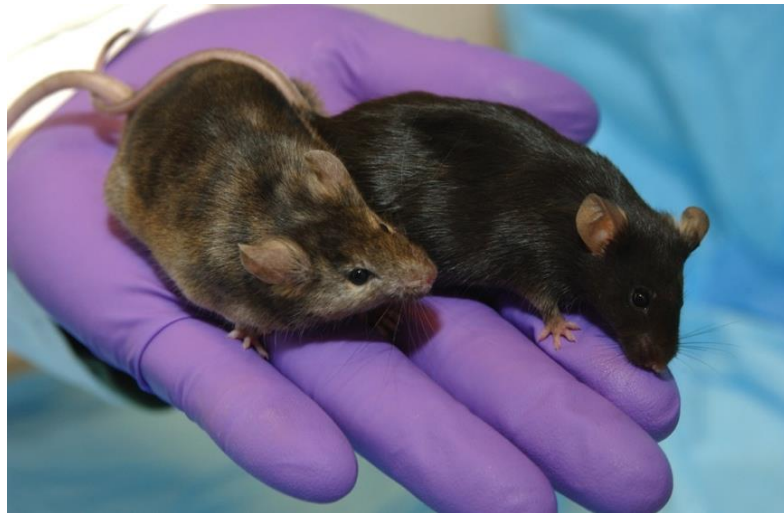


FIGURA 13: Fêmeas de camundongos C57BL6/J (Fonte: Arquivo próprio)

Foram utilizados dois grupos de camundongos C57BL6/J, alimentados com duas dietas isocalóricas (em relação ao conteúdo não proteico) distintas: uma chamada padrão, com 20% de proteína (grupo nutrido) e uma outra de baixo teor proteico, com apenas 2% (grupo desnutrido) (Harland Labs, WY, EUA). Esses animais foram mantidos nestas condições durante um período de 5 dias, onde durante o decurso, tecidos intestinais foram colhidos em múltiplos pontos temporais e avaliados para as grandes vias de sinalização celular (Wnt/ β -catenina, mTOR/S6K1, MAPK, PI3K/Akt) que são vias notadamente conhecidas como importantes para a proliferação celular, crescimento e sobrevivência da mucosa intestinal.

É importante salientar, que todos os experimentos em animais foram realizados de acordo com o Guia do Direitos dos Animais do *National Institutes of Health* (NIH), após a aprovação pelo Comitê Institucional de Cuidado Animal da Universidade da Virginia

Tabela 1: Informação nutricional das dietas padrão e especial contendo 20 e 2% de proteína utilizadas nos protocolos.

Fórmula	g/Kg	
	2% Proteína	20% Proteína
Caseína	23	230
D,L Metionina	3	3
Sacarose	150	150
Amido de milho	349,5	349,5
Maltodextrina	120	120
Óleo de milho	52,3	52,3
Celulose	50	50
Mix de vitaminas	10	10
Mix de minerais	13,3	13,3
Cálcio fosfato dibásico	16,6	16,6
Carbonato de cálcio	5,1	5,1
Etoxiquinina antioxidante	0,001	0,001

Fonte: Harlan Laboratories (Nova Iorque, Estados Unidos)

4.2. Modelo de desnutrição *in vitro*

Para o experimento *in vitro* foram utilizadas linhagens de células de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8 de acordo com Tompkins *et al.* (1974) cultivada em meio RPMI 1640 (com fenol vermelho 11875-093 - Life Technologies) contendo 2% de glutamina (300mg/L 2mM), 10% de soro fetal bovino (FBS), 50U/mL

de PenStrep® (Penicilina/Streptomicina 15140-122 Gibco®) e 1mM de piruvato de sódio (11360-070 - Life Technologies).

Para simular a desnutrição, as células HCT-8 foram cultivadas em meio RPMI 1640 com as mesmas condições acima, exceto pelo uso do FBS que foi utilizado na concentração de 1% para mimetizar a desnutrição proteica *in vivo*.

A linhagem de células humanas foi adquirida do *American Type Culture Collection* (ATCC) e utilizado em nosso estudo, após aprovação pelo Comitê de Biossegurança Institucional da Universidade da Virginia.

4.3. Extração de tecidos e células

Após decorrido o período experimental de 1, 3 e 5 dias de ração pobre contendo 2% de proteína, os animais foram anestesiados com uma mistura composta por ketamina e xilazina, e colocados em câmara de CO₂ de modo a evitar qualquer estresse. Após sacrifício, foi feita uma dissecação rápida do tubo intestinal dos animais, os segmentos do íleo foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até à sua utilização. Os tecidos congelados foram então triturados de forma a obter um produto final semelhante a um pó fino. Todo o processo foi realizado em cima de uma placa de 5Kg de gelo seco para evitar uma variação brusca de temperatura (LIMA *et al.*, 2014).

As amostras foram posteriormente fragmentadas em tampão RIPA (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sódio, 1 mM de EDTA e SDS a 0,1%) contendo inibidores de protease (Roche®) e inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio a 1 mM, 5 mM de fluoreto de sódio, 1 µM de microcistina LR, e 5 mM de β-glicerofosfato).

Para o estudo *in vitro*, células HCT-8 submetidas à desnutrição, assim como as placas controle nutridas, foram lisadas diretamente em tampão RIPA. Todos os tecidos e células foram em seguida clarificados por centrifugação, e o sobrenadante

foi posteriormente armazenado congelado em freezer -20°C até à sua utilização (FU *et al.*, 2009).

4.4. Anticorpos

Para este estudo, foi produzido um anticorpo policlonal em coelho, tal como descrito na pesquisa de Fu *et al.* (2009), contra o peptídeo C-terminal (resíduos 388-400) de ICK de camundongo, e um outro contra o peptídeo C-terminal (resíduos 319-332) CCRK, também de camundongo, pela *GenScript, USA, Inc.*

Os anticorpos policlonais para Akt, fosfo-Akt S473, fosfo-Akt S308, β -Actina, β -catenina, ERK1/2, fosfo-ERK1/2, p38 MAPK, fosfo-p38 MAPK, Bmi1, ciclina D1, caspase-9, caspase-3 clivada e PARP clivada, foram obtidos da empresa americana *Cell Signaling Technology*. Enquanto o anticorpo para β -catenina ativa (clone 8E7) foi adquirido da *Millipore®* e o Anti-GPCR GPR49 (Lgr5) anticorpo monoclonal de coelho (clone EPR3065Y), obtido da empresa *Abcam, Cambridge, UK*.

4.5. Western blot

A concentração proteica total foi determinada por ensaio colorimétrico, conforme Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Em seguida, extratos de tecidos ou de células foram misturados com um volume igual de tampão de amostra (120 mM Tris - HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas durante um período de 5 minutos em uma solução tampão, contendo corante sulfuroso e dodecil sulfato de sódio (SDS), onde posteriormente foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970) com géis de concentração e separação a 3% e 10% respectivamente (FIGURA 14). Após a corrida e separação por peso molecular, as proteínas contidas no gel foram

transferidas para uma membrana *Immobilon*TM-P 0.45µm de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) por ação de uma corrente elétrica de forma a manter a mesma disposição que continham no gel.

Posteriormente a membrana foi bloqueada durante uma hora com uso de leite em pó desnatado a 5%, para impedir interações não específicas. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário (1-2 µg), utilizando anticorpos citados de acordo com o item 4.4 deste trabalho, durante 90 min a temperatura ambiente ou durante toda a noite a 4°C em TBS (*Tris-Buffered Saline*) pH 7,6 contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de albumina sérica bovina (BSA), logo em seguida a membrana foi submetida a extensas lavagens com posterior incubação em anticorpo secundário conjugado *anti-rabbit* e peroxidase por 60 minutos, na diluição de 1:10.000.

Passados os 60 minutos de incubação com anticorpo secundário a membrana foi novamente submetida a extensas lavagens e os sinais de quimiluminescência desenvolvidas, foram interpretados utilizando reagentes *Millipore Immobilon ECL*.



FIGURA 14: Equipamento de Western blot (Arquivo próprio)

4.6. RNA de interferência (shRNAi)

Para esta etapa, foi utilizado o kit obtido da empresa Sigma-Aldrich®, (MISSION™ The RNA Consortium - TRC) RNA de interferência de ICK que contém quatro curtas sequências humanas de grampo CCRK RNAm: 5'-TCTTGAGGAGT CGCTGTTGAA-3 (TRCN2215), 5'-AGAACGATATTGAACAGCTTT-3' (TRCN2216), 5'-CCCAATATAATCCCAGCTAGT-3' (TRCN2217), e 5'-TGCCGGACTACAACAAGA TCT-3' (TRCN2218) para os controles infectados pelo lentivírus e que tiveram seus genes silenciados. Para os controles que foram infectados, mas não apresentaram seus genes silenciados, foi utilizado uma sequência de inserção de grampo (5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAA-3') que contém inadequações de 4 pares de bases para quaisquer genes humanos ou de camundongo conhecidos, tal como descrito em (FU *et al.*, 2009).

Vetores de partículas lentivirais foram gerados em células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), também chamadas por HEK 293 ou células 293 que são uma cultura celular específica originalmente composta de células de um rim pertencente a um embrião humano crescidas em cultura de tecidos (FIGURA 15), no qual foi empregado um protocolo de fosfato de cálcio como também descrito nas referências, (FU *et al.*, 2006, 2009).

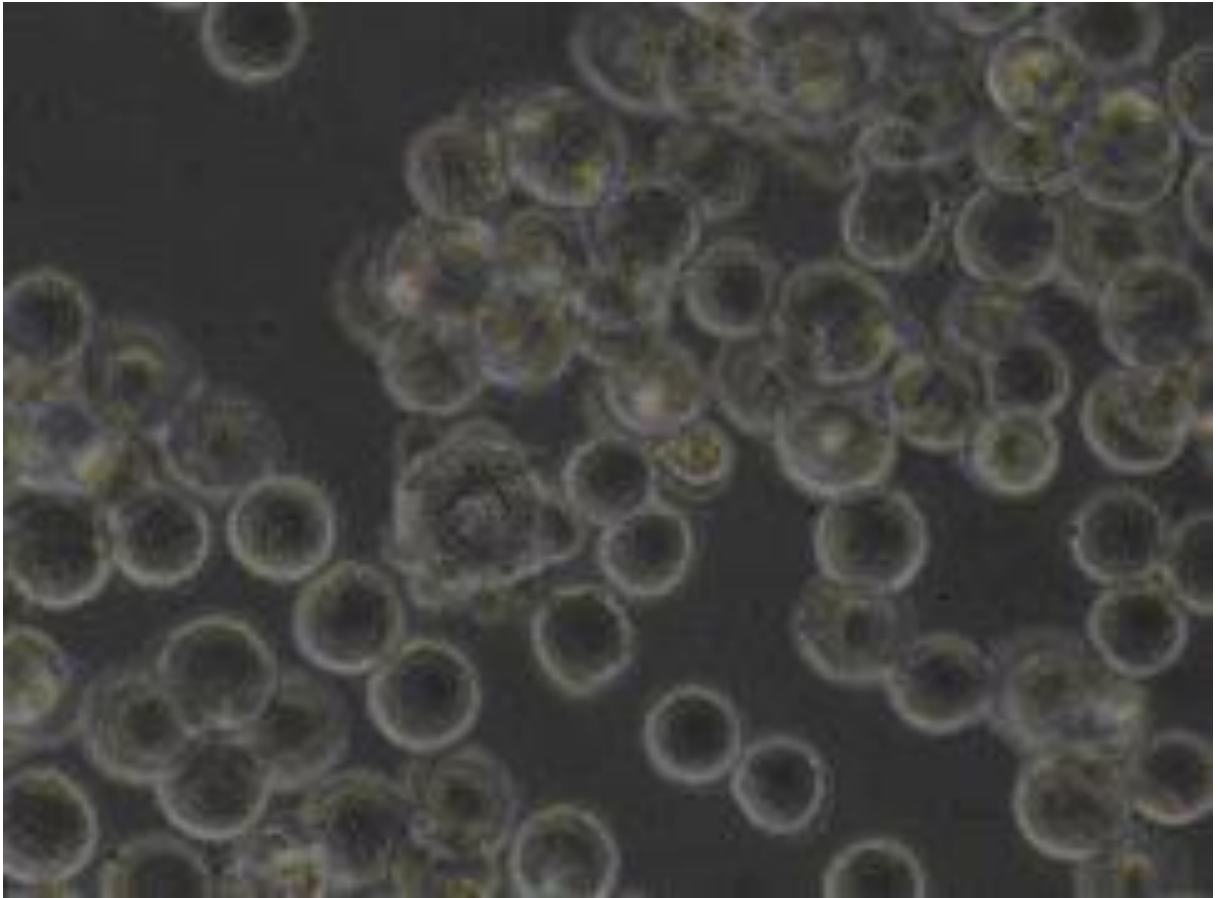


FIGURA 15: Células embrionárias HEK 293T (Fonte: Arquivo próprio)

As células HCT-8 foram induzidas ao crescimento exponencial até atingir um patamar de aproximadamente 50% a 60% de confluência (FIGURA 16) e foram infectadas com o lentivírus obtido das células HEK293T que expressavam ou não ICK (Controles silenciados e não-silenciados) durante um período de 12 a 14 horas antes da mudança do meio de cultivo.

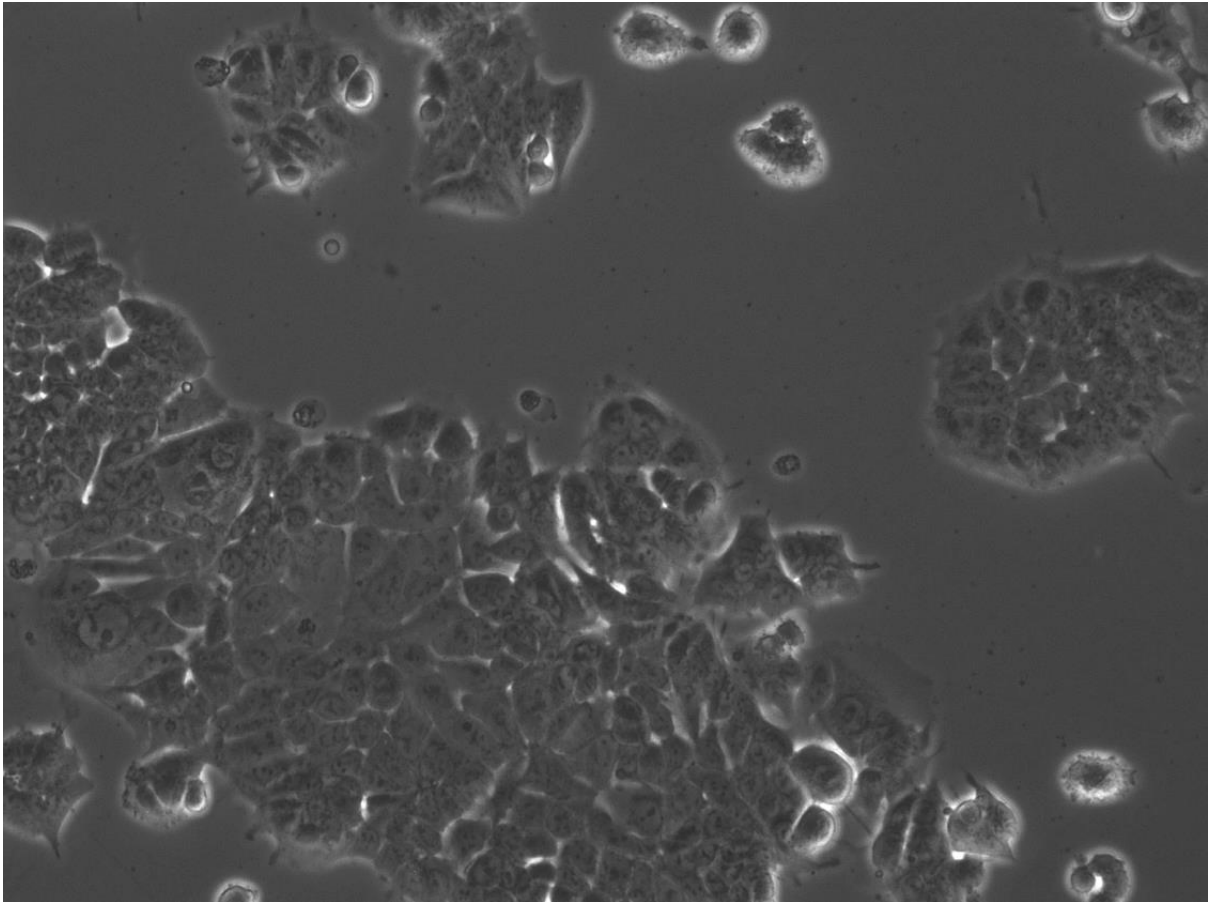


FIGURA 16: Células de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8 com 60% de confluência (Fonte: Arquivo próprio)

Vinte e quatro horas após a infecção pelo lentivírus, as células foram plaqueadas na concentração de $6-8 \times 10^5$ células/ml em placas de 10 cm e cultivadas durante 3-4 dias na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de puomicina. As células infectadas foram posteriormente colhidas para determinação do número de células viáveis, apoptose e para extração de proteínas.

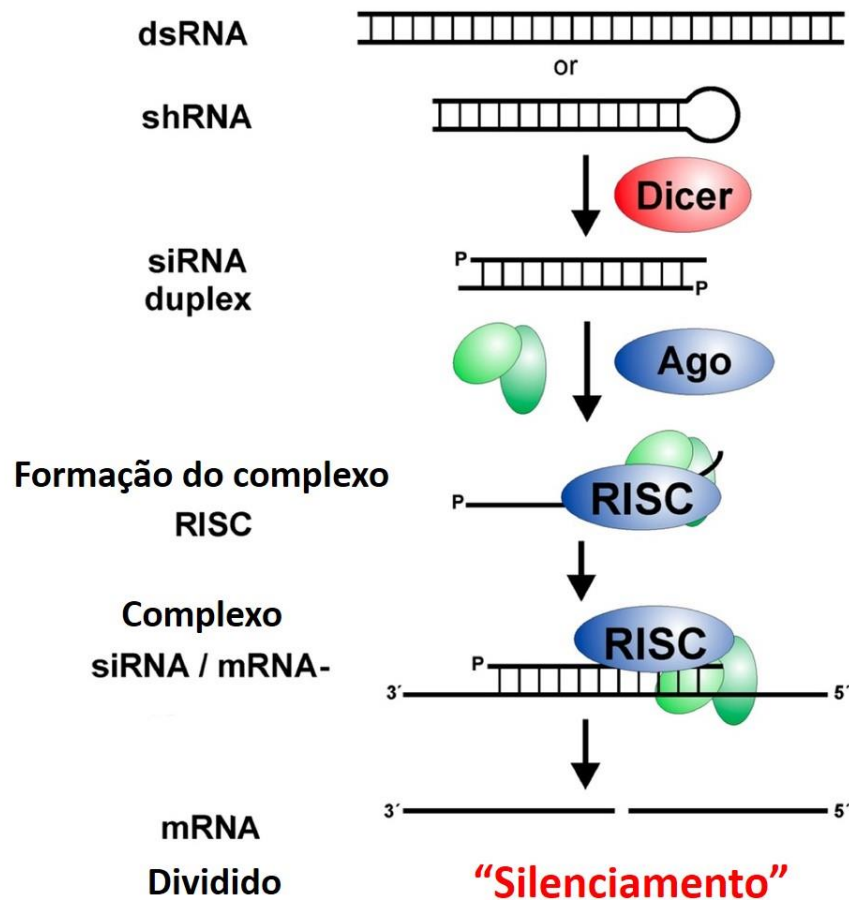


FIGURA 17: Diagrama ilustrando os principais passos da formação do grampo e subsequente silenciamento mediado pelo shRNA. Após o processamento pela enzima Dicer, o complexo shRNA-Dicer é exportada por meio do complexo do poro nuclear (NPC) para o citosol, onde a Dicer recruta a proteína Argonata e o RISC é montado. A enzima argonata possui atividade de helicase e capacidade para detectar a estabilidade térmica das extremidades do duplex do RNA de interferência. A argonata identifica o final com menor estabilidade térmica e prossegue desenrolando o duplex de siRNA, gerando duas fitas de siRNAs em cadeia simples. A cadeia que é retida como um componente funcional do complexo de silenciamento induzido do RNA (RISC) é referida como o guia, ao passo que a outra cadeia, irá ser rapidamente degradada por exonucleases, é conhecida como a cadeia passageira. A guia de fio recruta o RISC para a superfície do RNAs que são homólogos à sequência de siRNA. O siRNA reconhece o alvo do RNAm, um trecho de seis nucleotídeos correspondendo às posições 2-7 na cadeia antisense do siRNA. Após o anelamento dessa região composta por 6 nucleotídeos, o domínio catalítico RNase H da argonauta cria um RNAm perfeitamente complementar as 10 primeiras sequências de nucleotídeos da extremidade 5' da cadeia de siRNA incorporada à degradação nucleolítica, resultando na inibição da tradução do RNAm alvo (HANNON; ROSSI, 2004) ADAPTADO.

4.7. Determinação do número de células viáveis.

Após o período de crescimento de três a quatro dias, as células HCT-8 infectadas que estavam em suspensão e aderidas às placas, foram removidas com uso de tripsina e contadas utilizando uma câmara de Neubauer, também referida como hemocítmetro, com base na exclusão de azul de tripan, conforme protocolo descrito por Barile (1994). Para tanto, alíquotas de 50µL foram coletadas de cada placa e adicionadas ao mesmo volume de solução azul de tripan (Merck) 0,2% (V/V). Alíquotas de 10µL da solução resultante foram imediatamente transferidas para contagem de células em câmara de Neubauer (L-OPTK) por meio de microscópio de luz invertida (Olympus IX51, TK, Japão), com contagem mínima de aproximadamente 100 células.

Os dados obtidos foram expressos como porcentagens do total de células viáveis, considerando células coradas em azul como não viáveis. A média de contagem foi obtida tanto nas células infectadas silenciadas (ICK shRNA) como também nas células infectadas não silenciadas (shRNA). O procedimento de contagem foi repetido duas vezes.

4.8. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo de anexina V

As células HCT-8 infectadas foram sedimentadas por centrifugação a 300xg, durante 5 minutos, lavadas uma vez com PBS frio e ressuspensas em tampão de ligação. As células foram então coradas com anticorpo de anexina V e iodeto de propídio, durante 20 minutos de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Após a marcação (gating) da população de células individuais, foram analisados 150.000 células por amostra. As amostras foram analisadas no Centro de Citometria de Fluxo da Universidade da Virgínia – EUA utilizando o instrumento *Becton Dickinson FACSCalibur™*, New Jersey, EUA (FIGURA 18).



FIGURA 18: Equipamento de citometria de fluxo (BD® - Becton Dickinson FACSCalibur™) (ARQUIVO PRÓPRIO).

4.9. PCR quantitativo para ICK

4.9.1. Extração de RNA

As bancadas foram limpas com álcool a 70% juntamente com solução eliminase *Nuclease Eliminator* (Amresco, Ohio, EUA). Em seguida, amostras de 1cm de íleo de camundongo, aproximadamente de 10-25 mg de peso, foram trituradas com grãos de vidro adicionados em criotubos com 450µl de tampão RTL (Qiagen, Maryland, EUA) e alocados em máquina batidora de esferas, conhecida por “*bead bater*” (FIGURA 19). Da mesma forma, as de células HCT-8 todas em triplicatas, foram raspadas com uso de espátula de plástico estéril em tampão RTL e transferidas para tubos eppendorff®.

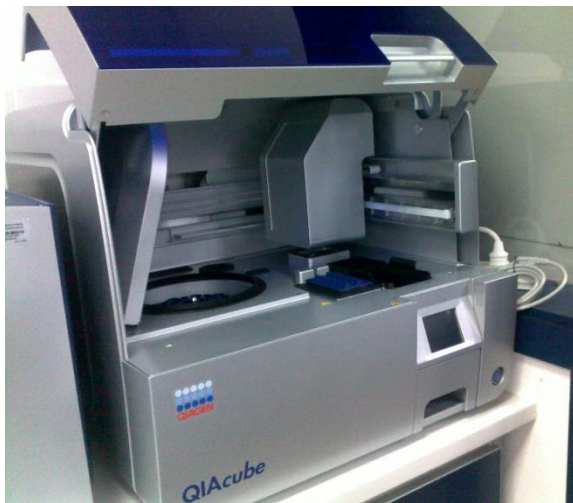
Ambas as amostras, tecido e células foram submetidas a extração de RNA total utilizando o (QIAamp RNA Mini Kit, Alemanha) para posterior reação da transcriptase reversa (RT-PCR), seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR),

para obtenção do DNA complementar (cDNA) de acordo como citado em (AZEVEDO *et al.*, 2014), sendo posteriormente submetido à técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR) para ICK. Na figura abaixo está demonstrado o kit utilizado na extração do RNA total das amostras analisadas e o robô QIAcube utilizado na extração (FIGURA 20).



FIGURA 19: Batedor de esferas ou “*bead bater*” usado no rompimento ou “lise” de células nas fases iniciais de extração. Microesferas de vidro são adicionadas a um tubo com rosca contendo a amostra de interesse. O batedor vibra vigorosamente, fazendo com que as esferas de vidro quebrem fisicamente as células expondo seu conteúdo. (ARQUIVO PRÓPRIO)

A



B



FIGURA 20: (A) equipamento QIAcube® para extração automatizada de DNA e RNA; (B) Kit de extração de RNA (ARQUIVO PRÓPRIO).

4.9.2. Análise Espectrofotométrica

Para quantificação do RNA extraído foi usada uma solução de água destilada como controle (branco), adicionando 200 μ L de água livre de RNase em um Uvette® (Eppendorf, Alemanha), selecionando-se o ensaio de RNA no espectrofotômetro (Biophotometer®). Para a análise de cada amostra, procedeu-se adicionando um volume de 2 μ L de amostra com 198 μ L de água livre de RNase para se obter uma leitura a partir de uma diluição (1:100) (AZEVEDO *et al.*, 2014).

4.9.3 Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa foi utilizado o kit da Invitrogen (Nova Iorque, EUA) contendo dNTP's DTT, *RNase out* tampão FS. Dessa forma adicionou-se o conteúdo de 2µL de Oligo dT, 2µL de dNTP mix 10µM (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Invitrogen) com 2µg de RNA total previamente calculado. A mistura foi aquecida por 5min a uma temperatura de 65°C. Adicionou-se 8µL de tampão FS 5X, 4µL DTT 0.1M, 2µL RNaseOUT, misturou-se o conteúdo em tubo eppendorf sendo então deixado no banho maria a 37°C por 2 min. Adicionou-se 1µL de SuperScript Transcriptase Reversa. Os tubos foram então inseridos no termociclador e deu-se início o programa com 50min a 37°C e logo após 70°C durante 15min.

4.9.4. PCR quantitativo para ICK

A reação em cadeia da polimerase em tempo real para ICK foi realizada em um sistema de detecção de PCR em tempo real *CFX-96 (BioRad, Hercules, EUA)*, sistema que utiliza a interpolação dos valores de CT de cada corrida com uma curva padrão de quantidades previamente conhecidas de DNA. As quantidades de “*master mix*” e os iniciadores ou “*primers*” que foram utilizados no PCR, foram as seguintes 5µL de amostra de DNA total foi adicionada a 20µL de mistura principal (consistindo em 12,5µL de *SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, Califórnia)*, 1,0µL de Iniciador senso, 1.0 µL do iniciador antisenso (Tabela 2), e 5,5µL de água livre de enzimas (DNase e RNase) para se obter um volume final de 25µL. A amplificação consistiu do seguinte protocolo de termociclos; 15 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15' a 95°C, 30' a 60°C, e 30' a 70°C. A amplificação e detecção foram realizadas com a utilização do *iCycler* em tempo real do sistema de detecção (*iCycler IQ, Biorad*). A fluorescência foi medida durante a etapa de anelamento de cada ciclo. Os números de ciclos de cada reação foram comparados com uma curva padrão conhecida, seguido de uma análise de curvas de fusão. Os dados são apresentados com base no método de expressão relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A fórmula

que foi utilizada é expressa por meio do cálculo de Expressão Relativa = $2^{-(\Delta\text{CT}-\text{C}\Delta\text{CT})}$, onde é ΔCT a diferença de limiar de ciclos entre o gene de interesse e o gene com expressão padrão naquele tecido. Os genes de referência utilizados foram a β -actina e GAPDH como citado em Azevedo (2014). Para avaliação de ICK foram utilizadas as sequências de bases nitrogenadas de éxon 6 13 e 14 de ICK como estão demonstradas na (Tabela 2).

Tabela 2: Iniciadores usados nos protocolos de q-PCR.

Iniciadores	Senso	Antisenso
ICK exon 6	CGGTCCTAGCAGGGATTGTC	AAATCAGTCCTTCTGCTGGCG
ICK exon 13/14	AACCCGGTGCCACTTCTTAC	GTGAATGTAGCGTCCTGGCT

4.10. Análise Estatística

O programa utilizado para análise estatística foi o *GraphPad Prism*, versão 6,0, (La Jolla, CA, EUA). Os dados foram previamente submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliação da distribuição normal. A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. O teste *T de Student* não pareado foi usado para algumas análises. O $p < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. Foram considerados como significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. A desnutrição proteica induz um aumento robusto e transitório da expressão da proteína ICK, associada à ativação de vias de sinalização que regulam a proliferação e sobrevivência celular, assim como o aumento da expressão dos marcadores de células-tronco intestinais.

A fim de obter novas ideias sobre mecanismos de respostas de sinalização celular intestinal e adaptação ao estresse nutricional, um modelo animal *in vivo* foi previamente estabelecido, para avaliar as respostas das células de forma que se pudesse analisar a sinalização por desnutrição proteica (COSTA *et al.*, 2011).

A via canônica de sinalização Wnt é crítica para a manutenção da homeostase e de todas as atividades funcionais das células-tronco intestinais (FEVR *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2003). β -catenina citoplasmática sem a devida fosforilação na Ser33/37/Thr41 (β -catenina ativa) é estável e age como o efetor do sinal de Wnt por ativação da transcrição, após a sua translocação nuclear (CADIGAN; NUSSE, 1997; NUSSE *et al.*, 2008; YOST *et al.*, 1996).

A via mTOR é um regulador chave da proliferação e sobrevivência em resposta a estímulos hormonais e nutricionais e S6K1 é um alvo da mTOR, que regula a tradução da proteína de genes específicos relacionados com o ciclo celular. (BHASKAR; HAY, 2007; FINGAR *et al.*, 2004; HALL, 2008; LAPLANTE; SABATINI, 2009; MA; BLENIS, 2009).

Ao fim do período de 24 horas de desnutrição com uso da dieta contendo 2% de proteína, as vias β -catenina e mTOR foram supra-reguladas no intestino delgado, resultado este determinado pela expressão proteica observada nos testes de *Western blot* para as bandas de β -catenina ativa e fosfo-S6K1 Thr-389, que receberam quantidades iguais de proteínas totais de íleo contra anticorpos que distinguem componentes-chave nas vias de sinalização Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt, mTOR/S6K1 e MAPKs (FIGURA 21).

Passado esse período, por volta do terceiro dia do período experimental de desnutrição, as atividades de sinalização referentes às vias β -catenina e mTOR foram diminuídas, retornando ao seu nível basal. Já as vias de sinalização MAPK, indicados por fosforilação aumentada de MAPK, ERK e p38 em seus sítios de ativação, tornaram-se evidentes após um período de 72 horas (dia 3) de desnutrição proteica, onde também, por volta do quinto dia, sob mesma desnutrição, estes sinais fosfo-MAPK foram reduzidos a níveis basais.

Assim como as mudanças ocorridas nos níveis proteicos das vias Wnt/ β catenina e mTOR/S6K1, as alterações na via MAPK em resposta à desnutrição ocorreram principalmente nos níveis de atividade dependente de fosforilação.

O estado da via PI3K/Akt, um regulador importante da sobrevivência celular, também foi avaliada durante a desnutrição, com uso da ração a 2% (FIGURA 21). Um aumento expressivo no nível de proteína total de Akt foi induzido após 24 horas e persistiu até o dia 5 (120 horas) de desnutrição. A ativação da Akt/PKB pode ser regulada por meio da fosforilação de Ser-308 pelo PDK1 e fosforilação de Ser-473 pela via mTORC2 (ALESSI *et al.*, 1996; SARBASSOV *et al.*, 2005).

Em resposta a esse protocolo experimental, a via de sinalização referente a fosfo-Akt S473, mostrou-se elevada e com sinal evidente do dia 1 persistindo até o dia 5 de desnutrição, enquanto o sinal de fosfo-Akt S308 diminuiu gradualmente em direção à linha de base do dia 1 ao dia 5 de desnutrição. Este resultado é consistente com os relatórios de Larson *et al.* (2007), que indicam a ativação da via PI3K/Akt durante privação de glutamina em células epiteliais do intestino de ratos.

Juntos, estes dados sugerem que o intestino delgado responde à desnutrição proteica, ativando as principais vias de proliferação e sobrevivência celular, pelas regulações dos componentes-chave de sinalização.

A quinase celular intestinal (ICK) é um elemento novo da rede de sinalização celular intestinal (TOGAWA *et al.*, 2000). Esta evidência, foi observada em experimentações *in vitro* realizadas por Fu *et al.* (2009) no qual se nota ICK atuando em um papel potencializador da proliferação do epitélio intestinal. O estímulo *upstream* para a expressão ou atividade de ICK é completamente desconhecido.

Curiosamente, neste estudo, os níveis de proteína ICK, observada nos testes de *Western blot*, foi aumentada significativamente 24 horas após a desnutrição proteica, concomitantemente com expressão elevada de marcadores Lgr5 (BARKER, 2014; BARKER *et al.*, 2007) e Bmi1 para populações de células-tronco intestinais ativas e inativas, respectivamente (FIGURA 21) (SANGIORGI; CAPECCHI, 2008; YAN *et al.*, 2012). No entanto, este aumento foi notadamente atenuado após 72 horas (dia 3) e totalmente revertido após 120 horas ou quinto dia de desnutrição. Resultados similares foram observados para CCRK, o que sugere que tanto a expressão da quinase a montante para ICK, como sua atividade, pode ser regulada por nutrientes no intestino delgado.

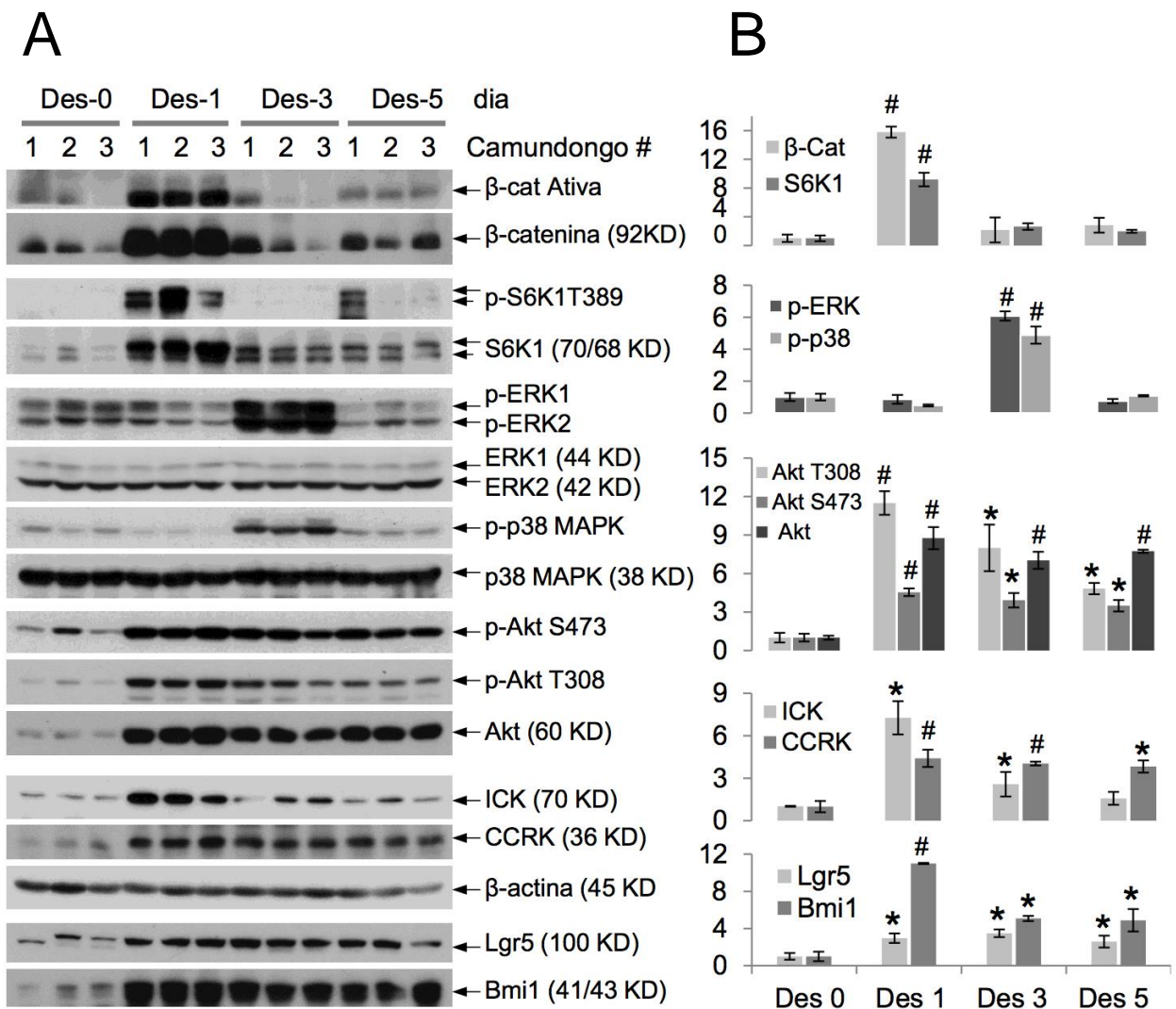


FIGURA 21: A desnutrição proteica induz um aumento da regulação de vias de sinalização importantes que estão relacionados com a sobrevivência e proliferação das células do intestino. Camundongos C57BL/6J fêmeas com 28 dias de nascidos, foram alimentados com dietas isocalóricas contendo 2% e 20% de proteína durante um período de 5 dias. (A) Após padronização de proteínas totais de tecido ílico, quantidades iguais de proteínas totais de íleo foram submetidas ao teste de *Western blot* contra os anticorpos que reconhecem os componentes principais em várias vias de sinalização, tal como indicado, assim como marcadores de células-tronco intestinais Lgr5 e Bmi1. O sinal de β-actina foi utilizado para indicar carga igual de proteínas totais de extratos de tecido intestinal. As bandas duplas reconhecidas pelo anticorpo S6K1 pode representar duas isoformas de *splicing* alternativo. (B) Depois da quantificação densitometria e normalização contra β-actina, a alteração do nível de proteínas em relação ao dia controle (Des-0) foi mostrado como média ± EP, n=3, *P<0,05, #P<0,01. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de três experiências independentes.

5.2. A privação de soro fetal bovino (FBS) no meio aumenta de forma significativa a expressão da proteína ICK em células HCT-8 de forma aguda e de uma maneira reversível.

Costa *et al.* (2012) definiram em seus experimentos, um modelo *in vitro*, realizado com células imortais de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8, no intuito de compreender o ciclo vicioso da desnutrição e infecção. Empregando o mesmo artifício científico, aproveitamos o modelo HCT-8 para explorar a cinética na regulação nutricional da expressão de ICK, que mostrou uma resposta imediata à deficiência de FBS, com resultados apontando acréscimos consideráveis, de coeficientes proteicos alcançando quantidades 10 vezes superiores as contagens iniciais em apenas 20 minutos de desnutrição (FIGURA 22A). Este aumento dramático, embora reduzido em magnitude em pontos de tempo posteriores, persistiu durante pelo menos 24 horas durante a privação de soro. Em contrapartida, ao readicionar, neste ensaio, meio de cultura contendo 10% de FBS, observamos um rápido reparo trazendo as bandas de ICK a níveis basais (FIGURA 22B). Estes dados sugerem que a regulação nutricional de ICK é um processo agudo e reversível.

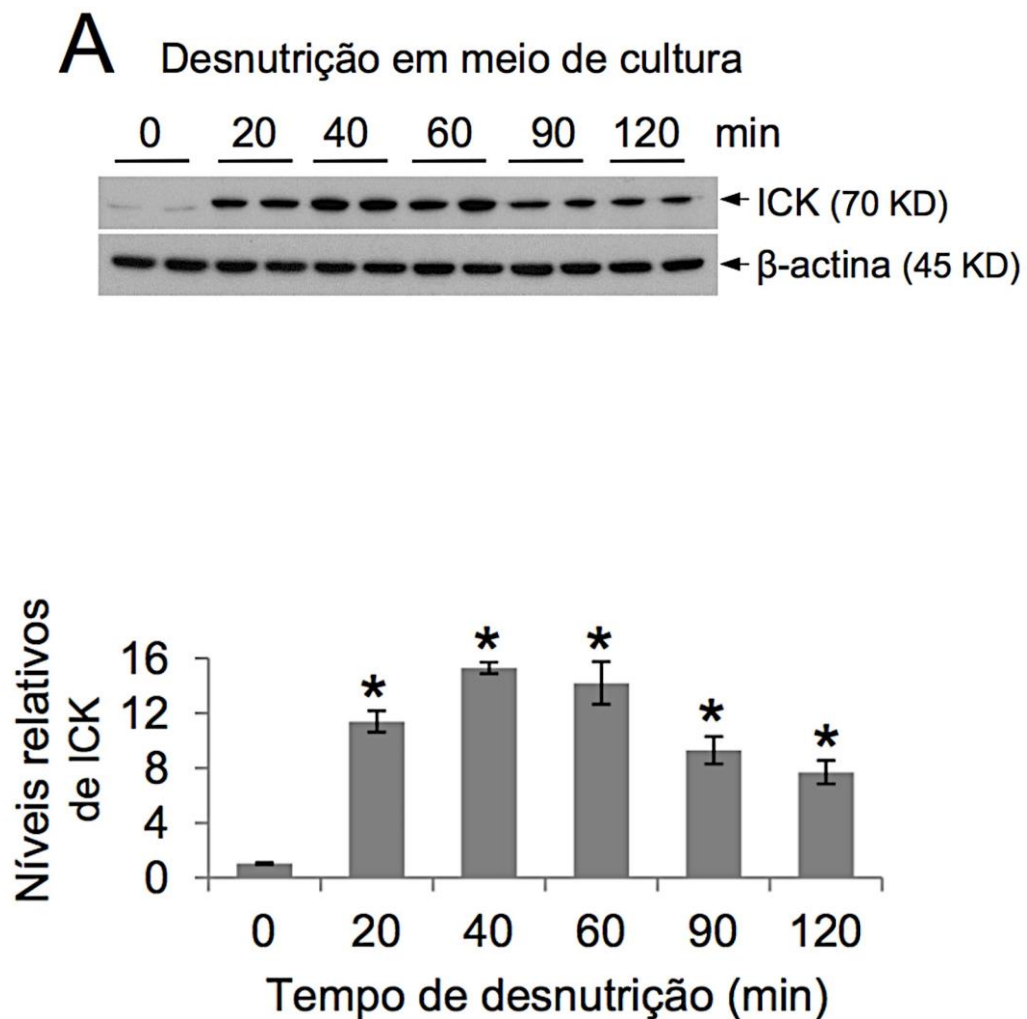


FIGURA 22: A desnutrição em células epiteliais ileocecais HCT-8 *in vitro* induz uma regulação positiva (*up-regulation*) aguda de proteína ICK de uma maneira reversível. (A) Células HCT-8 foram privadas de meio de crescimento contendo 1% de soro e avaliados em vários pontos de tempo. Após padronização de proteínas totais, as amostras foram submetidas ao teste de Western Blot contra os anticorpos ICK e β -actina, como indicado. Os resultados foram quantificados por densitometria e normalizados contra β -actina. A mudança da quantidade relativa de proteína ICK em relação ao tempo zero durante a privação de soro foi demonstrado como média \pm EP, n=2, *P<0,05. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de três experiências independentes.

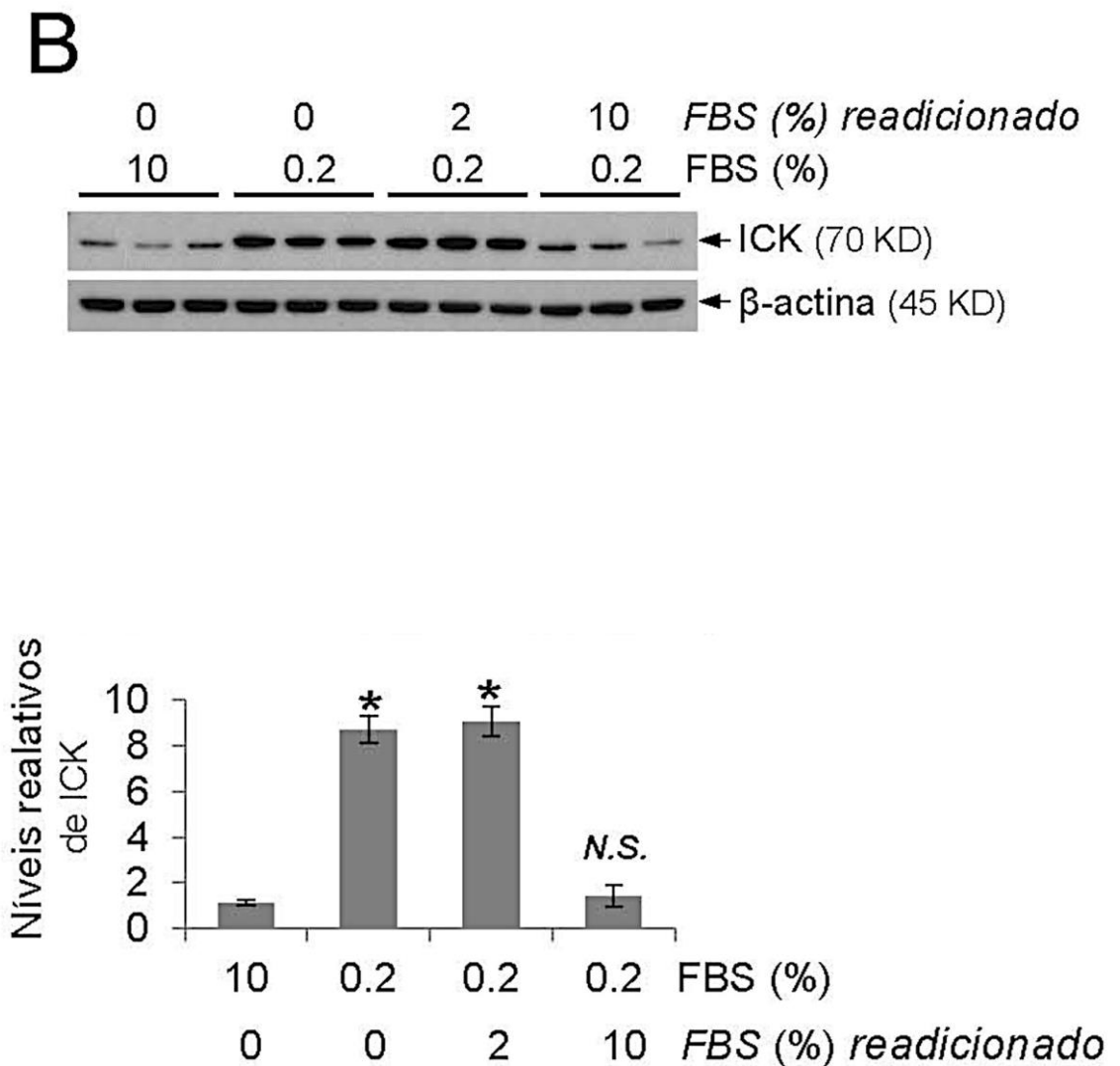
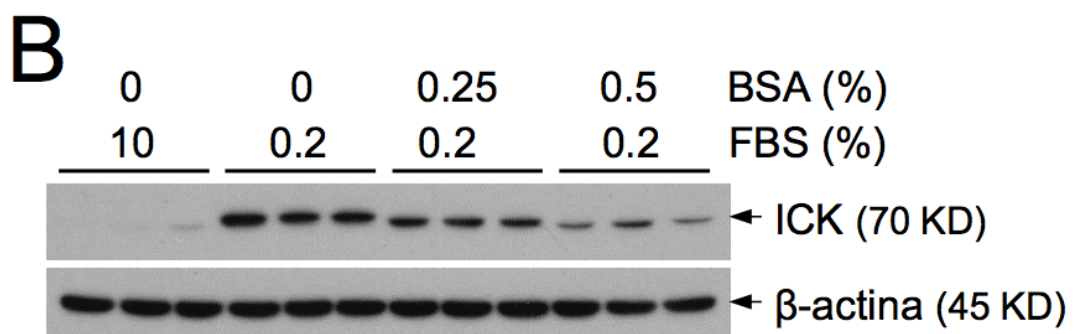
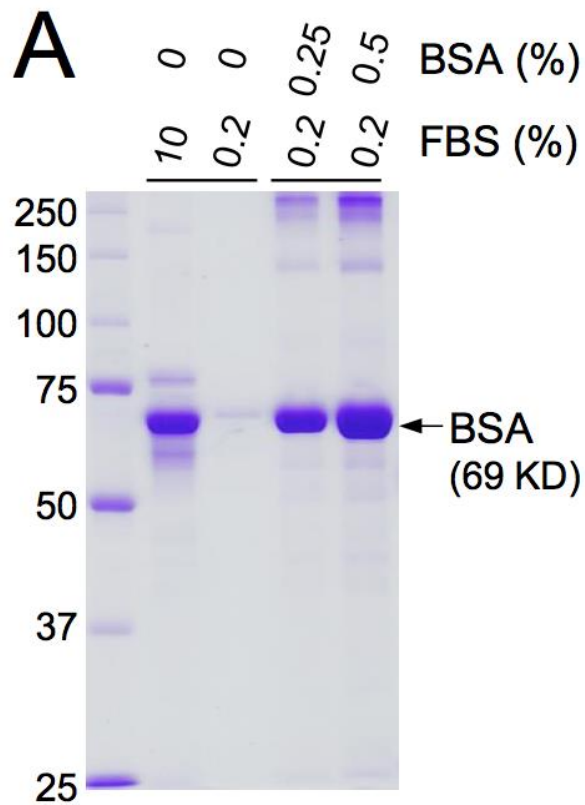


FIGURA 22. A desnutrição em células epiteliais ileocecais HCT-8 *in vitro* induz uma regulação positiva (*up-regulation*) aguda de proteína ICK de uma maneira reversível. (B) Células HCT-8 foram cultivadas em meio completo contendo 10% de FBS, em meio de privação que continha 0,2% de soro durante 40 minutos, ou em meio de privação durante 20 min, seguido por recuperação em meio contendo 2% ou 10% de soro durante 20 min. Os resultados foram quantificados por densitometria e normalizados contra os anticorpos ICK e β-actina, respectivamente. Depois da quantificação densitometria e normalização contra β-actina, a mudança da quantidade relativa de proteína ICK em comparação ao meio completo foi mostrado como média ± EP, n=3, *P<0,05, NS=não significativo. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de três experiências distintas.

5.3. A privação de soro fetal bovino (FBS) no meio induz um aumento agudo da expressão (*up-regulation*) dos níveis de ICK em células HCT-8, com esse efeito sendo revertido pela adição da albumina sérica bovina (BSA) e caseína.

Conforme definido por Nicholson (2000), a desnutrição, especificamente aquela causada por carência proteica, corrobora negativamente com uma forte redução na produção de albumina. Nessa perspectiva, examinamos se a adição de albumina sérica bovina purificada no meio de cultura utilizado para desnutrição, era capaz de restaurar os níveis de ICK em células HCT-8

A adição de 0,25% de albumina sérica bovina purificada (BSA) em meio de cultura contendo 0,2% de FBS foi capaz de restabelecer a quantidade de albumina encontrada no meio completo contendo 10% de FBS (FIGURA 23A). O nível de proteína ICK em células do meio de privação, suplementado com 0,25% e 0,5% de BSA foram capazes de diminuir em cerca de 30% e 60% respectivamente, em comparação com a das células do meio de privação, ditas controle, sem suplementação (FIGURA 23B). Esta observação implica a albumina como um importante, mas certamente não o único, fator no soro, que contribui para a regulação da abundância de proteínas ICK. Curiosamente, um efeito semelhante sobre a regulação dos sinais de proteína ICK foi observado quando foi adicionado, como um suplemento em meio pobre de FBS, a caseína, uma proteína importante encontrada no leite. Esse achado corrobora ainda mais com os resultados *in vivo* já que a caseína é a proteína padrão utilizada na formulação das rações distribuídas comercialmente (FIGURA 24).



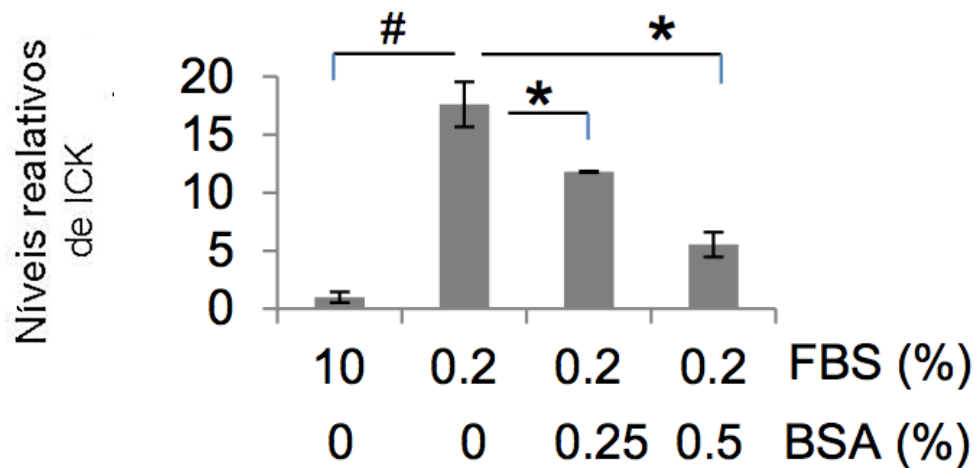


FIGURA 23: A Albumina Sérica Bovina, como um suplemento para o meio de privação, reduz significativamente os níveis de ICK induzida pela desnutrição. (A) Teor de BSA analisado a partir de 1 μ L de meio completo (10% de FBS), meio de privação (0,2% de FBS) e meio de privação, suplementado com 0,25% ou 0,5% de BSA analisado pela técnica de azul de Coomassie em Gel SDS. (B) Células HCT-8 cultivadas em meio completo contendo 10% de soro, em meio de privação que continha 0,2% de FBS durante 40 minutos, ou em meio de desnutrição durante 20 min seguido por suplementação de 0,25% ou 0,5% de Albumina de Soro Bovino purificada (BSA), durante 20 min. Após padronização de proteínas totais, as amostras foram submetidas ao teste de *Western Blot* contra os anticorpos ICK e β -actina, respectivamente. Após quantificação densitometria e normalização contra β -actina, a mudança da quantidade relativa de proteína ICK em comparação a condição de meio completo, foi mostrado como média \pm EP, n=3, *P<0,05, #P<0,01. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de dois experimentos independentes.

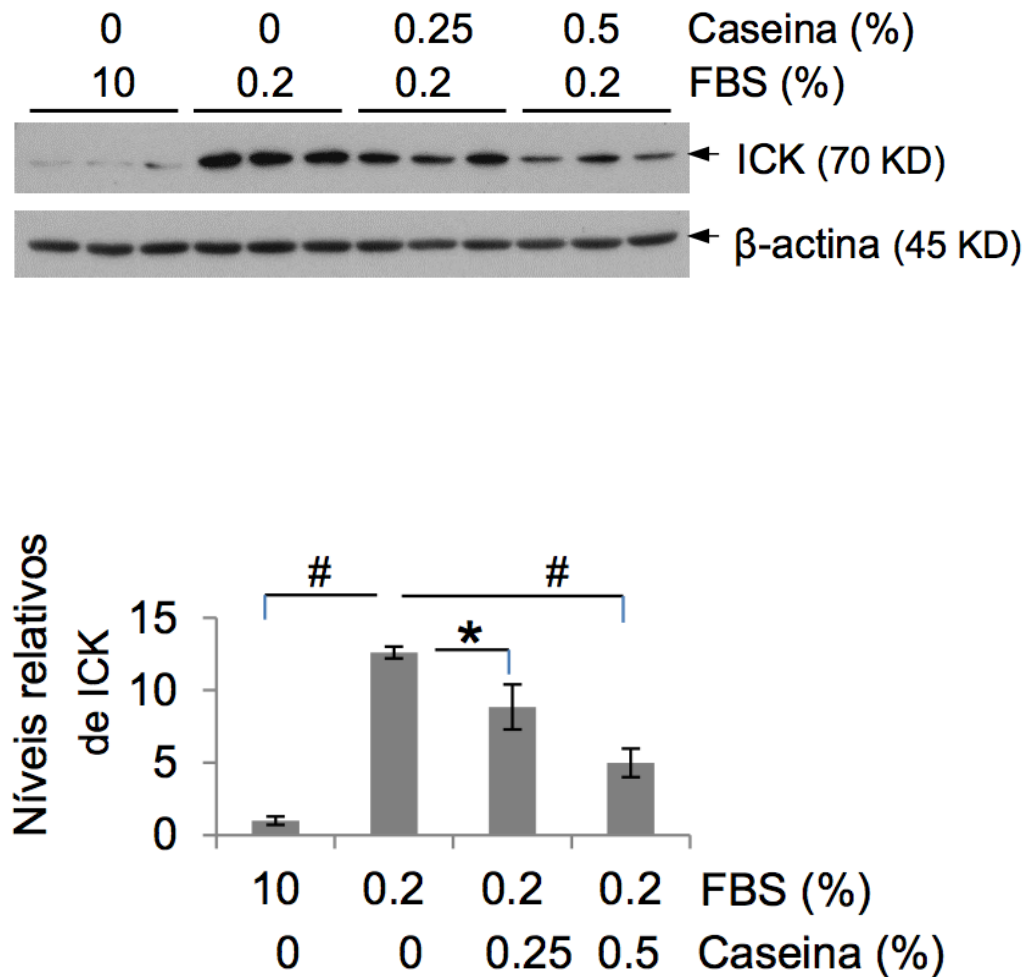


FIGURA 24: Regulação negativa (*down-regulation*) de proteína ICK, induzida por privação de soro em células HCT-8, pode ser parcialmente revertida por adição de caseína, uma importante fonte de nutrientes no leite, usada como suplemento. Células HCT-8 foram cultivadas em meio completo contendo 10% FBS e em meio de privação com 0,2% de FBS durante 40 minutos, ou ainda, em meio desnutrido por 20 min, sendo posteriormente suplementado com 0,25% e 0,5% de caseína durante mais 20 minutos. Após padronização de proteínas totais, as amostras foram submetidas ao teste de *Western Blot* contra os anticorpos ICK e β -actina, respectivamente. Após quantificação densitométrica e normalização contra β -actina, a mudança da quantidade relativa de proteína ICK em comparação a condição de meio completo, foi mostrado como média \pm EP, $n=3$, $*P<0,05$, $\#P <0,01$. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de dois experimentos independentes.

5.4. O silenciamento do gene da ICK diminui a viabilidade celular e regula negativamente (*down-regulation*) a via canônica Wnt/ β -catenina em células HCT-8.

Partindo do princípio de que a elevação do sinal ICK é um dos mecanismos de defesa que as células intestinais utilizam para promover o crescimento celular compensatório de sobrevivência, células HCT-8 foram infectadas usando um alvo-ICK shRNA com especificidade validada nos estudos de Fu *et al.* (2009), na tentativa de esclarecer os efeitos biológicos do silenciamento dos genes de ICK sobre a sobrevivência e proliferação celular. A expressão reduzida ICK levou a uma diminuição de 60% no número de células viáveis, associada com uma regulação negativa e significativa do sinal de β -catenina ativa e sua jusante efetora, ciclina D1 (FIGURA 25), que foi posteriormente confirmada por uma segunda análise de ICK shRNA. (FIGURA 26). Estes resultados indicam que ICK pode regular a proliferação celular intestinal por meio de interações funcionais com eventos de sinalização Wnt/ β -catenina.

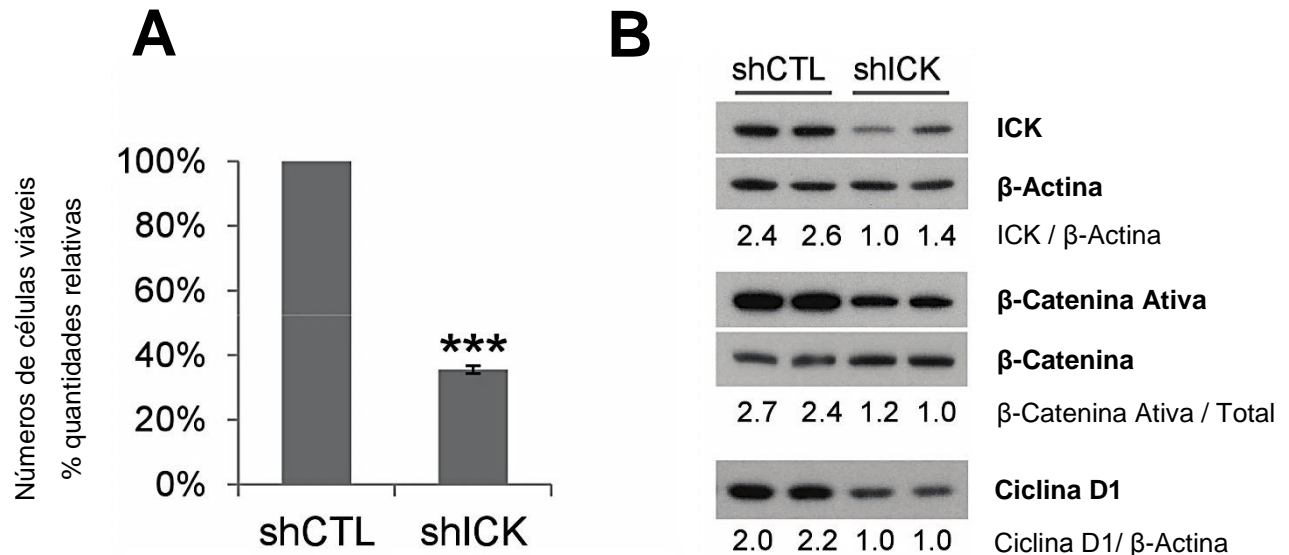


FIGURA 25: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 prejudica significativamente a proliferação celular regulando negativamente (*down-regulation*) a via Wnt/ β -catenina. (A) células HCT-8 foram infectadas com o shRNA ICK-específica (shICK) ou com controle de shRNA (shCTL). O número total de células viáveis foi determinada pelo teste de exclusão de azul tripan e apresentados como média \pm EP, n=3, ***P <0,001, com resultados similares em dois experimentos distintos. (B) Quantidades iguais de proteínas totais dos extratos de células foram usados para os testes de *Western blot* contra anticorpos que reconhecem ICK, β -actina, β -catenina, ativo β -catenina e ciclina D1, como indicado. Os sinais do *Western blot* foram quantificadas por densitometria e mostrados em quantidades relativas após a normalização.

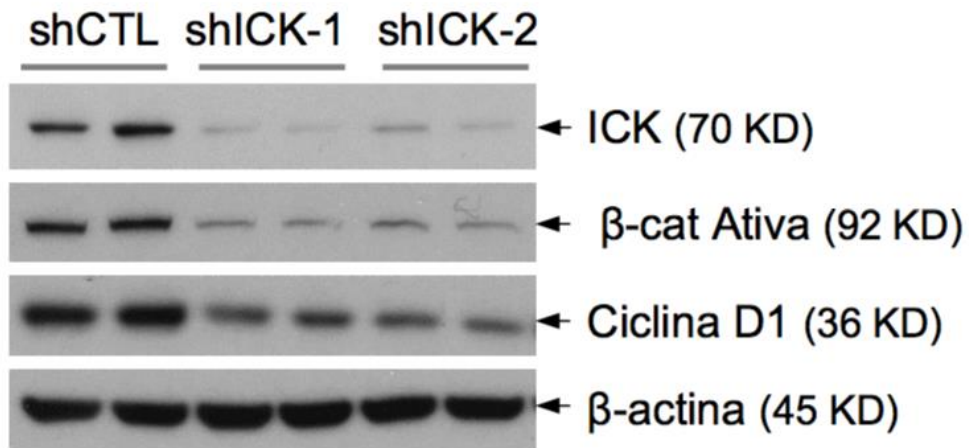


FIGURA 26: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 induziu uma regulação negativa significativa do sinal de β -catenina ativa, bem como do alvo ciclina D1. Células HCT-8 foram infectadas com o shRNA ICK-específica (shICK) ou com controle de shRNA (shCTL) utilizando para tanto os reagentes de diagnóstico da empresa *Sigma* (MISSION®) como supra citado em métodos. Quantidades iguais de proteínas totais dos extratos de células foi usado para os testes de *Western blot* contra anticorpos que reconhecem as vias descritas acima, com sinal de β -actina indicando carga igual de proteínas totais.

5.5. O silenciamento do gene da ICK induz apoptose pela ativação de uma via dependente de caspase em células HCT-8.

Neste trabalho, também foi analisado se o silenciamento do gene da ICK poderia induzir a apoptose, o que pode contribuir para a viabilidade celular intestinal diminuída. Foi demonstrado que células HCT-8 que expressam ICK shRNA específico, exibiram um aumento de aproximadamente 4 vezes no número de células apoptóticas (detectado por coloração de anexina V), quando comparado às células HCT-8 que expressam o controle shRNA (FIGURA 27A). Este aumento da apoptose induzida pelo silenciamento de ICK foi associado com um aumento de 2 a 4 vezes na expressão de componentes-chave na via da caspase, tais como caspase-9 clivada, caspase-3 clivada e PARP (FIGURA 27B). Desse modo, os dados sugerem que ICK pode promover a sobrevivência de células do intestino por meio da supressão da via apoptótica dependente de caspases.

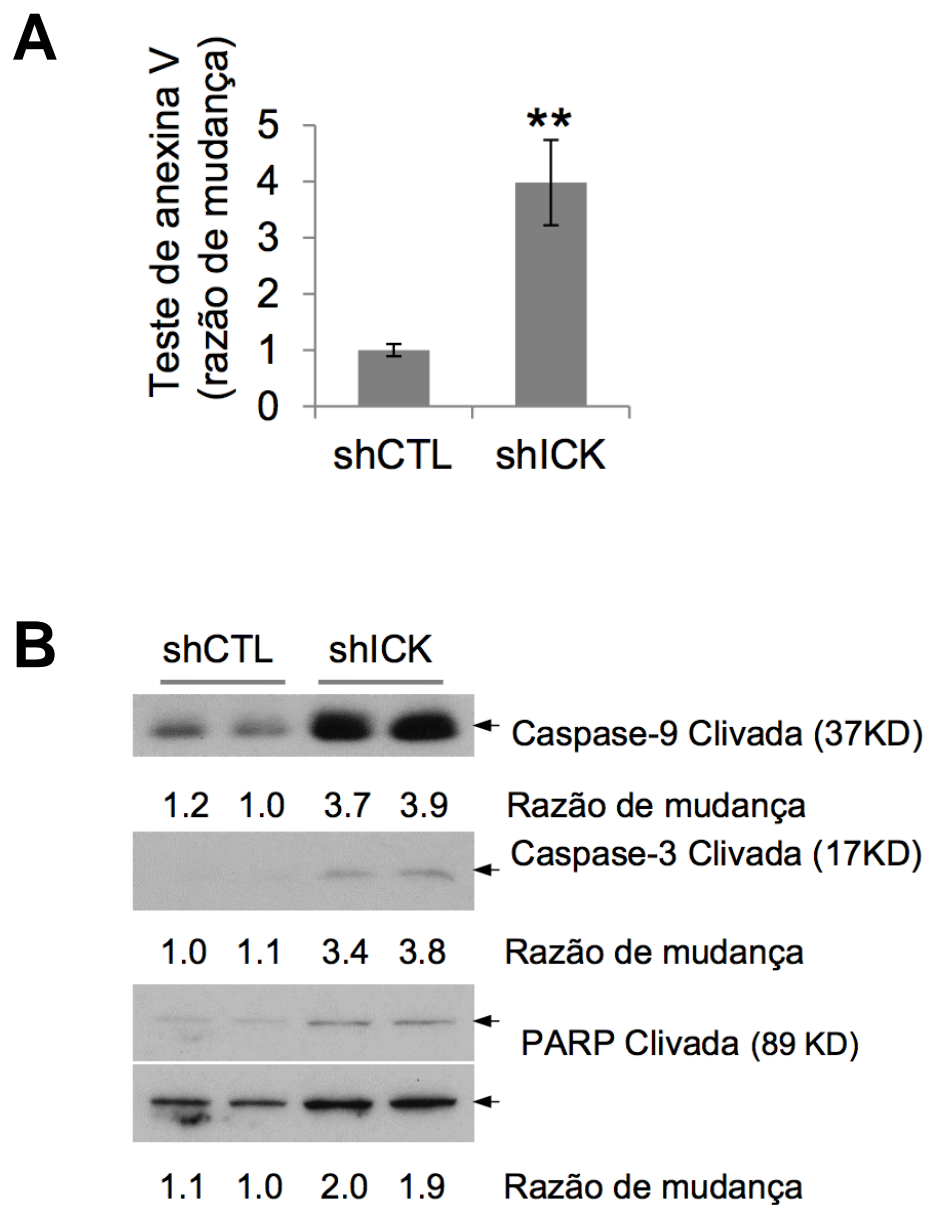


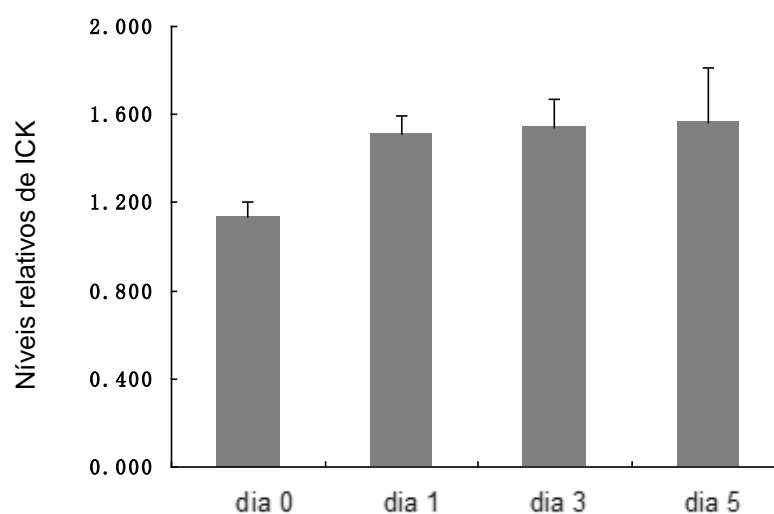
FIGURA 27: O silenciamento do gene da ICK em células HCT-8 induziu apoptose pelo mecanismo dependente da caspase. (A) Células HCT-8 que foram silenciadas com shRNA ICK-específica (shICK) e o grupo controle, composto por cultivo infectado e não silenciado, ou shRNA (shCTL) foram avaliadas para o número de células apoptóticas por meio da coloração de anexina V. A mudança da quantidade relativa de células marcadas positivamente para anexina V é mostrada como média \pm EP, $n=4$, $**P<0,01$, com resultados similares em dois experimentos distintos. (B) Após padronização de proteínas totais do extrato de células, estas foram submetidas ao teste de Western blot contra os anticorpos que reconhecem os componentes-chave na via da caspase como indicado. Os sinais foram quantificados por densitometria e mostrados em quantidades relativas após a normalização.

5.6. O rápido aumento proteico da ICK, induzido pela desnutrição, não é devido ao acréscimo da transcrição celular.

É sabido que o RNAm é o responsável pela transferência de informação do DNA até ao local de síntese de proteínas, na célula. Partindo desse ponto, investigando a expressão do RNAm em amostras de íleo de camundongos, submetidos a desnutrição proteica por até 5 dias e por até 60 minutos em células HCT-8, que foram usadas nos grupos experimentais, utilizando iniciadores específicos, conhecidos, para o *exon 6* ou *exon 13/14* de ICK em resposta a desnutrição. Os níveis de expressão encontradas nas amostras submetidas a q-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa), permaneceram próximas, sem diferença estatística, do dia 0 (controle) ao dia 5 (FIGURAS 28 A, B, C) assim como nas células HCT-8 (FIGURA 28 D) em desnutrição por até 60 minutos, sugerindo que as mudanças no período de desnutrição não são devidas à um aumento significativo na expressão da ICK.

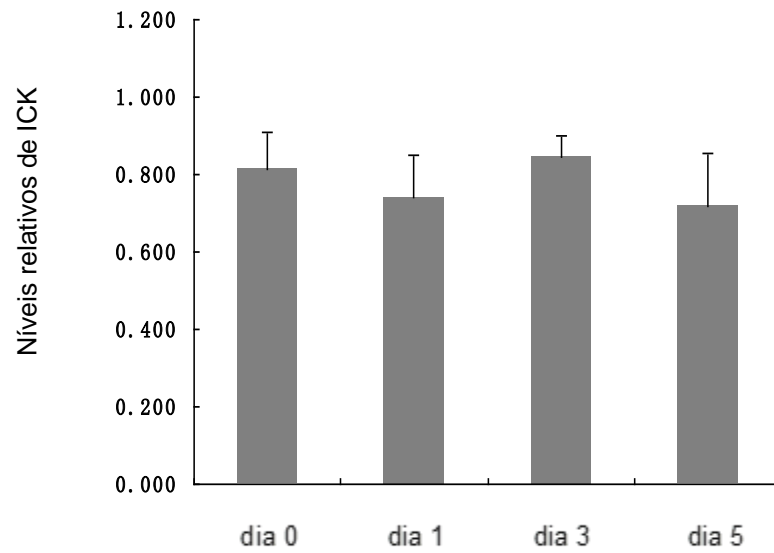
A

ICK *exon 6* relativo à β -actina em íleo de camundongo

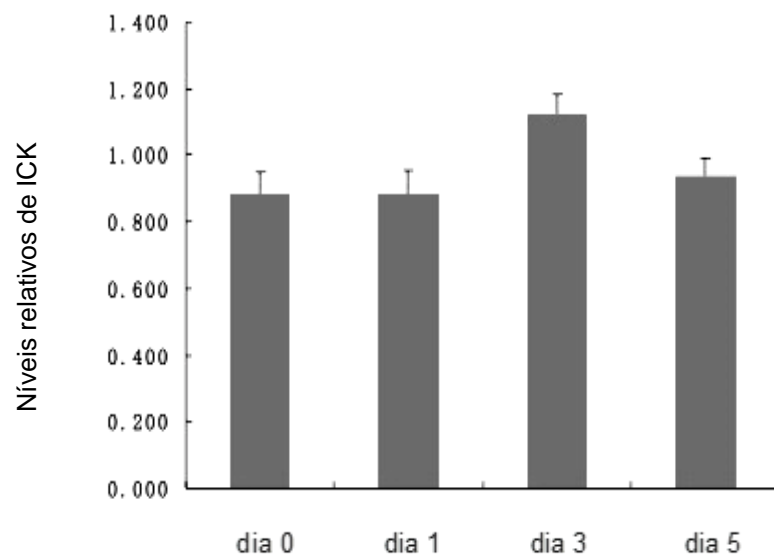


B

ICK exon 6 relativo à GAPDH em íleo de camundongo

**C**

ICK exon 13/14 relativo à GAPDH em íleo de camundongo



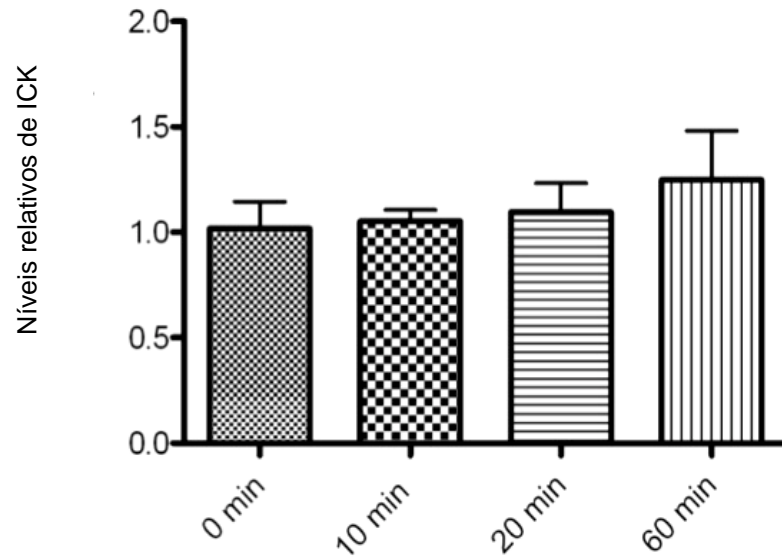
D**ICK exon 6 relativo à β -actina em células HCT-8**

FIGURA 28: Os níveis de expressão encontrados pela PCR em tempo real, permaneceram sem diferença estatística nos grupos experimentais *in vitro* e *in vivo* sugerindo que às mudanças proteicas observadas nas células e tecidos durante o período de desnutrição não são devido à mudança significativa na expressão de RNAm. FIGURAS (28 A, B e C), Níveis relativos de ICK relativos a β -actina e GAPDH em íleo de camundongos C57BL6J submetidos a uma dieta de desnutrição proteica de 5 dias. FIGURA (28 D), Níveis relativos de ICK relativos a β -actina analisados em células HCT-8 submetidas a desnutrição por até 60 minutos com uso de meio de cultura contendo 1% de soro fetal bovino (FBS).

5.7. O efeito do BSA sobre as concentrações de ICK não é devido às mudanças de osmolaridade do meio de cultura.

A albumina sérica bovina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo bovino e serve como depósito, assim como transporte de proteína para numerosos componentes. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue e também para o transporte de proteínas para numerosos compostos endógenos e exógenos. Em meio de cultivo, essa substância torna o meio hipertônico, permitindo a passagem de água do interior da célula para o meio extracelular. Para provar que o efeito do BSA não era devido à mudança de osmolaridade, foi manipulado, dentro do meio, diferentes concentrações de sorbitol, um poliálcool obtido pela hidrogenação da glucose. Os níveis de ICK continuaram elevados usando 1, 2 e 4% de sorbitol comparado com as células tratadas com 1% de BSA (FIGURA 29), confirmando que os efeitos do BSA sobre ICK não são devidos à mudança de osmolaridade.

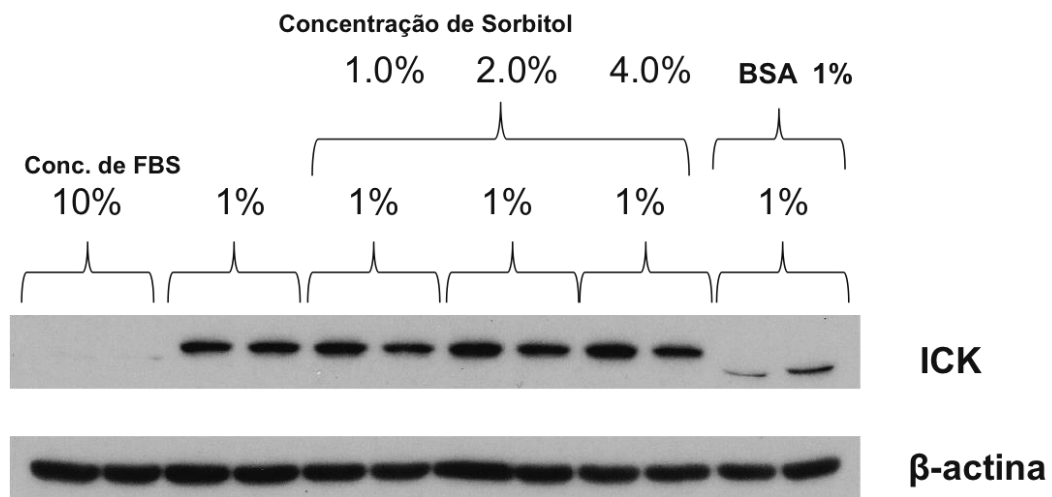


FIGURA 29: Efeito do D-sorbitol em células HCT-8 expostas a 1% de soro fetal bovino, comparado com células tratadas com 1% de BSA, mostrando que mudanças na osmolaridade pela adição de sorbitol (1,2 e 4%) não modificam os níveis de ICK *in vitro*.

5.8. Outros resultados que não influenciam mudanças de ICK *in vitro*.

Efeito da Glutamina em ICK usando células HCT-8 desnutridas.

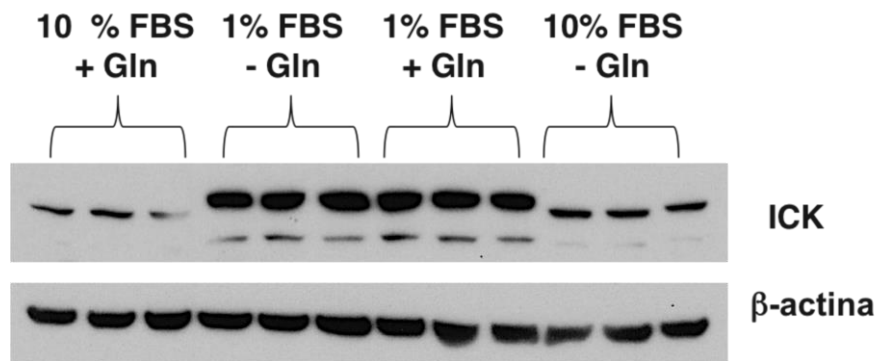


FIGURA 30: A suplementação de glutamina 2mM não corrobora para a diminuição da concentração proteica de ICK em condição de 1% de desnutrição. Entretanto, a falta de glutamina no meio causa um pequeno, mas insignificante aumento nos níveis de ICK nos grupos tratados com 10% de FBS.

Efeito da Alanil-glutamina (L-ALA-GLAN) nos níveis de ICK usando células HCT-8 desnutridas

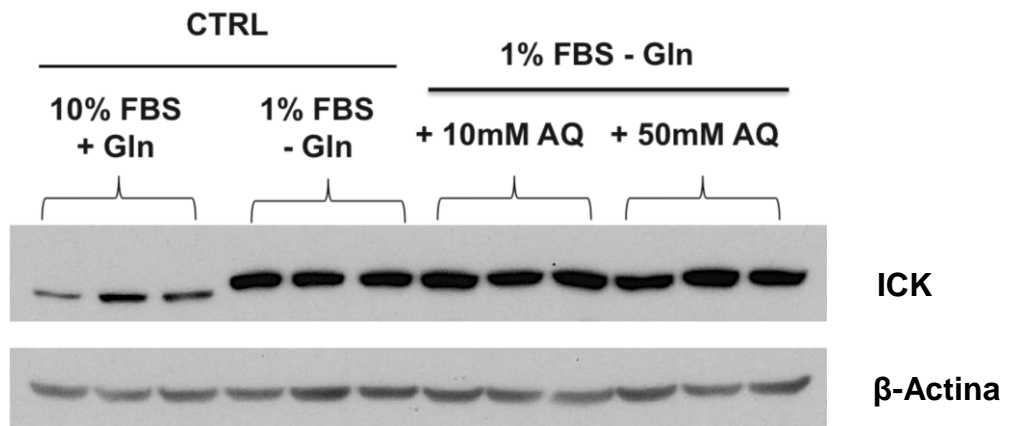


FIGURA 31: Suplementação com AQ nas concentrações de 10mM e 50mM, também não reduziram significativamente os níveis de ICK *in vitro*.

Efeito do Zinco nos níveis de ICK usando células HCT-8 desnutridas em 1% FBS, com suplementação de 10 e 50 μ M de Zn²⁺ por 20 minutos.

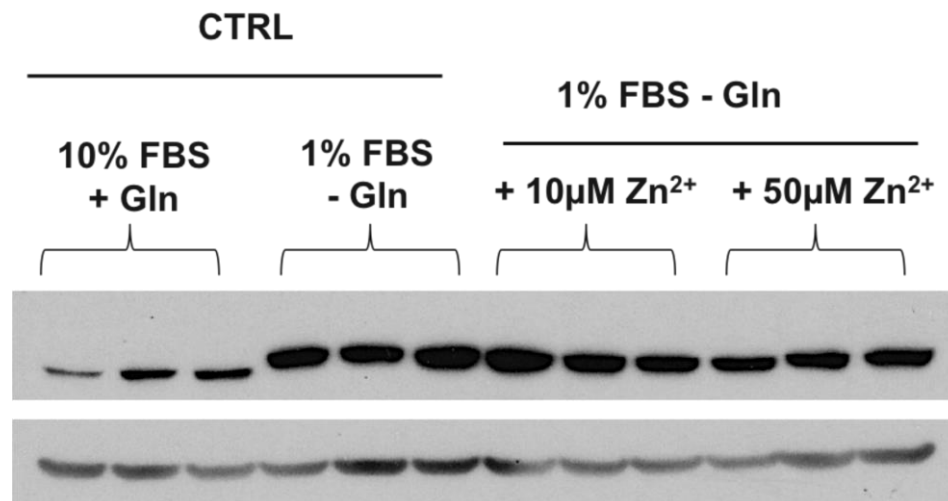


FIGURA 32: A Suplementação de zinco, que é conhecido por intervir no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, diminui as concentrações de ICK *in vitro*, mas não mostra uma diferença estatística significativa nos experimentos usando 10 e 50 μ M Zn²⁺.

Segundo o argumento de Jenkin (1994), as principais funções do intestino delgado são a digestão e absorção de nutrientes, que por sua vez constituem o principal estímulo para o crescimento das células intestinais e da mucosa, quer diretamente pelo efeito no sítio de absorção ou indiretamente pela regulação da liberação de hormônios, que são essenciais para o crescimento e reparação da mucosa. (CLARKE, 1977; JOHNSON, 1988; MCCOLE; BARRETT, 2007; WILLIAMSON; BUCHHOLTZ; MALT, 1978).

A desnutrição é capaz de provocar atrofia da mucosa do intestino delgado, enfraquecimento das funções intestinais e alteração de estruturas morfológicas que incluem: diminuição da altura das vilosidades, profundidade das criptas, área de superfície e número de células epiteliais (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; RAUL; SCHLEIFFER, 1996; SHAW; GOHIL; BASSON, 2012; TAPPENDEN, 2006).

Em uma contribuição mais recente, De Queiroz *et al.* (2014) alerta que a falta de proteínas interfere no desenvolvimento tecidual por privar o órgão de ingredientes críticos, necessários para a estrutura e crescimento celular. As consequências da desnutrição dependem do tempo, período e intensidade de privação. Dentre as adaptações fisiológicas de animais em fase de crescimento submetidos à desnutrição, como aumento da reciclagem de aminoácidos para a síntese proteica e a redução do catabolismo de aminoácidos, está incluída a redução na velocidade de crescimento. Essas adaptações têm papel importante em sua sobrevivência. Com uma restrição energética prolongada, o organismo lança mão de gliconeogênese, glicogenólise e lipólise. A musculatura esquelética, maior compartimento corporal de proteínas, e o tecido adiposo, principal reserva energética, são consumidos para que seja mantida a homeostase.

Em resposta a restrição da ingestão de alimentos, o intestino delgado exibe uma notável capacidade de adaptação para evitar a atrofia e manter normais a arquitetura e funções da mucosa. No entanto, pouco se sabe sobre a base molecular subjacente às respostas celulares intestinais ao estresse nutricional.

Um estudo de proteômica comparativa realizado por Lenaerts *et al.* (2006), revelou que proteínas envolvidas na glicólise e metabolismo de aminoácidos e energia foram reguladas negativamente enquanto que as proteínas com um papel de proteção ou de sobrevivência, tal como os genes de regeneração Litostatina 1 e 2 e os genes antioxidantes glutathiona peroxidase 3 e anidrase carbônica 3, foram positivamente regulados após desnutrição.

Várias pesquisas já definiram que as vias de sinalização, como Wnt / β – catenina (FEVR *et al.*, 2007; GREGORIEFF; CLEVERS, 2005; PINTO *et al.*, 2003; VAN ES *et al.*, 2005), PI3K/Akt (LARSON *et al.*, 2007; SHENG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004), mTOR/S6K1 (FUJISHITA *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2012; RHOADS *et al.*, 2006; YILMAZ *et al.*, 2012) e MAPKs (ALIAGA *et al.*, 1999; HOUDE *et al.*, 2001; SANCHO *et al.*, 2009), conduzem o crescimento intestinal celular, a migração e a sobrevivência na mucosa intestinal, porém, não existe ainda uma definição plena sobre como essas cascatas cruciais de sinalização respondem à deficiência nutricional e se verdadeiramente estão ou não envolvidas no processo.

Em seus artigos, Drozdowski (2006) e Tappenden (2006) mostraram que a deficiência nutricional pode induzir alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas em humanos e em modelos animais. A mucosa do intestino delgado resiste à atrofia durante a privação de proteína por um tempo mais longo do que a maioria dos outros tecidos. Essa resiliência tem um papel complementar importante para reservar nutrientes e aumentar a absorção por um maior tempo possível. As principais características estruturais da mucosa intestinal, incluindo a altura das vilosidades, profundidade de criptas, o número de células do epitélio por vilosidades ou cripta e alocação de várias linhagens celulares, são alterados, pelo menos inicialmente, por deficiência de proteína ou desnutrição experimental em modelos animais (CHAPPELL *et al.*, 2003; COUTINHO *et al.*, 2008; HILL JR. *et al.*, 1968; LIPKIN; QUASTLER, 1962; SOKOLOVIC *et al.*, 2007). Entretanto, os mecanismos que podem ser responsáveis pela preservação da arquitetura intestinal não estão completamente compreendidos.

Uma supressão da renovação celular, que normalmente é rápida, no epitélio intestinal foi observada durante a desnutrição, como anteriormente apontaram Deo (1965) e Hooper (1958), implicando um papel importante para a proliferação e sobrevivência celular compensatória ao estresse nutricional. Neste estudo, nossos achados ilustram novos mecanismos para a adaptação intestinal à desnutrição proteica, mostrando uma rápida, mas transitória ativação, de múltiplas vias de sobrevivência e proliferação concomitantemente com uma expressão elevada de células-tronco intestinais.

As respostas de sinalização celular à desnutrição proteica parecem ser diversificadas. A ativação da via Wnt/ β -catenina, mTOR/S6K1, PI3K/Akt e caminhos CCRK/ICK ocorreu na fase inicial, em 24 horas de jejum de proteína, enquanto que a ativação das vias MAPK ERK e p38 ocorreu na fase tardia, às 72 horas seguintes. Este resultado presta uma relevante contribuição a um conceito intrigante, revelado em prévias análises, de proteômica global e metabólica que indica que a resposta intestinal e adaptação ao jejum/desnutrição é um processo que consiste em várias fases (LENAERTS *et al.*, 2006; SOKOLOVIC *et al.*, 2007). Em comparação com a ativação transiente da Wnt/ β -catenina, mTOR/S6K1, MAPKs e vias de sinalização da ICK, a ativação da via PI3K/Akt foi mantida por um período de tempo mais longo.

Mecanicamente, a ativação dessas vias pró-proliferação e pró-sobrevivência ocorreram, quer por meio de uma maior abundância de proteínas (por exemplo, β -catenina, mTOR, ICK, Akt) ou elevada fosforilação de locais-chave de regulação (por exemplo, ERK1/2, p38 MAPK).

No presente modelo animal de desnutrição por deficiência de proteína (1-5 dias) induziu um aumento significativo nos níveis de expressão de marcadores de células-tronco intestinais Lgr5 e Bmi1, sugerindo uma atividade elevada dessas células, em resposta ao estresse nutricional. Em estudos elegantes, Mcleod *et al.* (2010) e O'Brien *et al.* (2011) revelaram a dinâmica de células-tronco intestinais em resposta a disponibilidade de nutrientes em modelo de *Drosophila*. A desnutrição crônica proteica (15-20 dias) em moscas, reduziu o número de células-tronco intestinais disponíveis para a homeostase e reparação tecidual. Por outro lado, a evidência mostrada por Carlone (2012) e Montgomery *et al.* (2011) em suas pesquisas, utilizando um modelo de rato em jejum por curto prazo (2 dias), revelou a uma robusta indução na quantidade de células-tronco intestinais expressando telomerase (mTert), um biomarcador para uma rara e lenta população cíclica de células-tronco intestinais dormentes que podem desempenhar um papel importante na resposta regenerativa após lesão ou estresse fisiológico. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que as células-tronco intestinais são sensores nutricionais e podem responder rapidamente e de forma dinâmica à ausência de nutrientes durante a adaptação intestinal.

Em relação à suplementação com zinco, De Queiroz *et al.* (2014), relataram que a suplementação alterou de forma significativa a morfologia da mucosa intestinal com aumento na espessura e a altura do vilos, assim como a profundidade das criptas que também aumentou quando comparados com grupos desnutridos. No presente estudo essa razão de mudança esperada em níveis proteicos de ICK *in vitro* não foi observada. Isso indica que a suplementação de zinco altera a morfologia do intestino delgado, o que pode influenciar a absorção e digestão de nutrientes, embora essa mudança não seja detectável, com precisão, em nível molecular usando a ICK como parâmetro. Achados semelhantes foram encontrados com outros suplementos nesse estudo como a glutamina e alanil-glutamina (AQ). Um paradoxo que vai de encontro com outros estudos como os de Costa *et al.*, (2012) e Lima (2014) que demonstram

com sucesso a utilização de aminoácidos na desnutrição e diarreia, associada com benefícios no crescimento físico e na integridade da mucosa intestinal.

Rhoads *et al.* (2006), complementam afirmando que a presença de glutamina, em níveis fisiológicos (1-4 mM) é efetiva na prevenção da apoptose de células intestinais.

Neste estudo, ICK foi identificada como novo componente nas respostas de sinalização celular ao estresse nutricional. Entretanto, seu rápido aumento proteico, induzido pela desnutrição, não é devido ao acréscimo da transcrição celular. Dados quantitativos de q-PCR não revelaram nenhuma mudança significativa nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) da ICK durante o jejum. Lipkin (1962); Muramatsu (1963) e Waterlow (1959) mostraram que um intestino delgado com uma rápida taxa de síntese de proteínas em indivíduos com alimentação normal e com percentagens similares durante a desnutrição proteica. É provável que a desnutrição induzida aumente a expressão de proteína ICK no interior do intestino como resultado do aumento da síntese e ou estabilidade da proteína. Um gene candidato que pode estar envolvido na regulação da degradação/estabilidade da proteína ICK é o gene *FBXO9* (Proteína 9F-box), que é conhecido por possuir um papel funcional na diferenciação de adipócitos, servindo como uma ligase de ubiquitina E3 para regular os níveis de proteína C/EBP durante adipogênese (LEE *et al.*, 2013). Mais estudos serão destinados futuramente a investigação da interação entre *FBXO9* e ICK e como eles interagem para regular a estabilidade proteica durante a desnutrição.

Os presentes dados mostram que ICK funcionalmente interage com as vias Wnt/ β -catenina e caspase proporcionando novos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares pelos quais ICK regula a proliferação das células do intestino e a apoptose. Atualmente, os substratos diretos de ICK que mediam a interação entre as vias Wnt/ β -catenina ou a via caspase ainda são difíceis de localizar. É digno de destacar que o promotor de ICK contém sítios de ligação funcionais para TCF4 e β -catenina exógena que é capaz de ativar de forma robusta a atividade do promotor de ICK *in vitro* (STURGILL *et al.*, 2010). Portanto, ICK pode ser um alvo direto da transcrição do sinal Wnt/ β -catenina. Os dados do estudo indicaram claramente um impacto negativo do silenciamento de ICK nos sinais de β -catenina

ativa e de ciclina D1. É concebível que possa existir um circuito de regulação de *feedback* positivo entre ICK e vias de Wnt/ β -catenina.

Este trabalho contribuiu com novas ideias sobre os mecanismos moleculares que regulam a adaptação intestinal de proteínas ao estresse nutricional. Foi demonstrado que a carência de proteína induz a ativação aguda, mas transitória, de importantes vias de proliferação e sobrevivência simultâneas, como por exemplo a via canônica Wnt, que é crítica para a manutenção da homeostase de todas as atividades funcionais das células-tronco intestinais, assim como a via mTOR que se destaca como reguladora chave da tradução de proteínas e genes relacionados com o ciclo celular. Juntos, estes dados sugerem que o intestino delgado responde a desnutrição proteica, ativando as principais vias de proliferação e sobrevivência, pelas regulações a montante dos componentes-chave de sinalização.

O estímulo indutor para a expressão ou atividade de ICK é completamente desconhecido, entretanto identificamos uma nova via de sinalização funcional, envolvendo relações cruzadas, onde ICK interage com os caminhos da Wnt/ β -catenina e caspase como um importante participante na sinalização celular em resposta à desnutrição proteica. Cumulativamente, esses resultados sugerem que a ativação de vias de sinalização celular intestinais podem servir como gatilhos moleculares importantes para os mecanismos protetores celulares subjacentes de resistência à atrofia intestinal, inclusive com a participação de um aumento elevado na expressão de marcadores de células-tronco intestinais como por exemplo o Lgr5 e Bmi1 após 24 horas de desnutrição.

Outro achado intrigante, foi a participação da albumina sérica bovina, na cinética de regulação nutricional da expressão de ICK. Nicholson *et al.* (2000) já haviam definido em seus trabalhos que a carência causada por um déficit de proteínas, acarretava em uma forte redução na produção de albumina. Esta observação mostrou a albumina e caseína como sendo importantes, mas certamente não os únicos, fatores no soro que contribuem para a regulação da quantidade de proteínas ICK, onde em apenas 20 minutos de tratamento com uso de solução contendo 0,25 e 0,50% de BSA e caseína, foram capazes de reestabelecer em cerca de 30 e 60% respectivamente a quantidade de ICK encontrada no meio completo com

10% de FBS em condições iniciais de nutrição. Corroborando dessa forma com os achados *in vivo*, dado que a caseína foi a proteína usada na fabricação da ração controle. Outros aditivos foram incluídos nesse estudo com a mesma finalidade, como a glutamina, zinco e alanil-glutamina em concentrações que demonstraram efeitos promissores como os achados nos trabalhos de Braga-Neto *et al.*, (2012); Castro *et al.*, (2012); Chen *et al.*, (2003); De Queiroz *et al.*, (2014) e LIMA *et al.*, (2014), entretanto estes não apresentaram resultado significativo sobre ICK, o que demanda a necessidade estudos mais aprofundados sobre a relação existente entre essa quinase e componentes *ad praedictae* em modelos de desnutrição *in vivo* e *in vitro*.

O silenciamento do gene da ICK foi capaz de prejudicar a proliferação celular e induzir a apoptose. Isso mostra que a ICK participa dos mecanismos de defesa das células intestinais na promoção do crescimento compensatório e sobrevivência em episódios de desnutrição. A expressão reduzida da quinase em questão, levou a uma diminuição de 60% de células viáveis, tudo isso associado à uma regulação negativa das vias β -catenina ativa e sua jusante efetora, ciclina D1, revelando que ICK pode regular a proliferação celular intestinal por meio de interações com as vias de sinalização Wnt/ β -catenina. O silenciamento também induziu a apoptose, aumentando em até quatro vezes a expressão de componentes-chave da via da caspase. Esse achado corrobora ainda mais com a ideia que mostra ICK como condição *sine qua non* para a sobrevivência das células intestinais, pois atua de forma efetiva na supressão das vias apoptótica dependentes de caspase.

O rápido aumento proteico, induzido pela desnutrição, não é devido ao acréscimo da transcrição celular *in vitro* ou *in vivo*. Dados quantitativos de q-PCR não revelaram mudanças significativas nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) ICK durante o período de desnutrição. Esse resultado sugere que as alterações ocorridas nos níveis de ICK possam ser pós-traducionais, o que merece especial atenção e futura investigação, principalmente na interação de ICK com outros genes que podem estar envolvidos na regulação da degradação/estabilidade da proteína ICK.

6. CONCLUSÕES

1. A privação de proteína causa um aumento significativo e robusto da expressão da proteína ICK tanto *in vivo* quanto *in vitro*.
2. A desnutrição proteica induz um aumento robusto e transitório da expressão da proteína ICK associada com a ativação de importantes vias de sinalização que regulam proliferação e sobrevivência assim como a expressão de marcadores de células-tronco intestinais em camundongos.
3. A suplementação proteica com albumina reduz a ativação de ICK de modo substrato dependente em células HCT-8.
4. Os aumentos de ICK em resposta à privação de proteína foi associada com melhor viabilidade celular e menor atividade de caspase 3, 9 e PARP-clivada em células HCT-8, sugerindo uma resposta compensatória.
5. A privação de proteína, com uso de meio de cultura contendo 1% de FBS, eleva a expressão da proteína ICK em células HCT-8.
6. O silenciamento do gene da ICK diminui a viabilidade celular e induz a apoptose com ativação das vias de caspases em células HCT-8.
7. Albumina sérica bovina (BSA) e caseína podem reverter os efeitos provocados pela privação do soro *in vitro* causando uma redução significativa nos níveis proteicos de ICK.
8. Os efeitos da regulação negativa (down-regulation) causados pela albumina e caseína não são devidos às mudanças de osmolaridade no meio de cultivo.
9. A adição de fatores tróficos intestinais como a glutamina, zinco e alanil glutamina ao meio de cultura não foram capazes de diminuir a expressão aumentada da proteína ICK *in vitro* de maneira significativa, após privação do soro fetal bovino.
10. O rápido acréscimo nos níveis proteicos de ICK, induzido pela desnutrição, não é pode explicada apenas pelo aumento da transcrição celular *in vitro* ou *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSI, D. R. et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J**, v. 15, n. 23, p. 6541–6551, 1996.

ALIAGA, J. C. et al. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **Am J Physiol**, v. 277, n. 3 Pt 1, p. G631–41, 1999.

AN, X. et al. Functional characterisation of cell cycle-related kinase (CCRK) in colorectal cancer carcinogenesis. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 9, p. 1752–1761, 2010.

ANDREU, P. et al. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. **Development**, v. 132, n. 6, p. 1443–1451, 2005.

AZEVEDO, O. G. et al. Apolipoprotein E plays a key role against cryptosporidial infection in transgenic undernourished mice. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89562, 2014.

BAKSH, D.; BOLAND, G. M.; TUAN, R. S. Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. **J Cell Biochem**, v. 101, n. 5, p. 1109–1124, 2007.

BARILE, F. A. **Introduction to in vitro cytotoxicology : mechanisms and methods**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 222 p.

BARKER, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 1003–1007, 2007.

BARKER, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 19–33, 2014.

BASELGA, J. New therapeutic agents targeting the epidermal growth factor receptor. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 21 Suppl, p. 54S–9S, 2000.

BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. On the relation of enterokinase to trypsin. **J Physiol**, v. 32, n. 2, p. 129–136, 1905.

BEACHY, P. A.; KARHADKAR, S. S.; BERMAN, D. M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 324–331, 2004.

BERGELSON, J. M. Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 6, p. 517–521, 2009.

BHASKAR, P. T.; HAY, N. The two TORCs and Akt. **Dev Cell**, v. 12, n. 4, p. 487–502, 2007.

BOING, I. et al. Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. **Cell Signal**, v. 18, n. 1, p. 50–61, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BRAGA-NETO, M. B. et al. Protective effects of alanyl-glutamine supplementation against nelfinavir-induced epithelial impairment in IEC-6 cells and in mouse intestinal mucosa. **Cancer Biol Ther**, v. 13, n. 14, p. 1482–1490, 2012.

BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–868, 1999.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes Dev**, v. 11, n. 24, p. 3286–3305, 1997.

CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1318–1321, 1998.

CARLONE, D. L.; BREAUULT, D. T. Tales from the crypt: the expanding role of slow cycling intestinal stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 2–4, 2012.

CASTRO, I. C. et al. Arginine decreases *Cryptosporidium parvum* infection in undernourished suckling mice involving nitric oxide synthase and arginase. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 678–685, 2012.

CHAPPELL, V. L. et al. Effects of incremental starvation on gut mucosa. **Dig Dis Sci**, v. 48, n. 4, p. 765–769, 2003.

CHEN, P. et al. Association of vitamin A and zinc status with altered intestinal permeability: analyses of cohort data from northeastern Brazil. **J Health Popul Nutr**, v. 21, n. 4, p. 309–315, 2003.

CHEN, T. et al. Distinct Expression Patterns of ICK/MAK/MOK Protein Kinases in the Intestine Implicate Functional Diversity. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79359, 2013.

CLARKE, R. M. “Luminal nutrition” versus “functional work-load” as controllers of mucosal morphology and epithelial replacement in the rat small intestine. **Digestion**, v. 15, n. 5, p. 411–424, 1977.

COBB, M. H. MAP kinase pathways. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 71, n. 3–4, p. 479–500, 1999.

COSTA, L. B. et al. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. **J Parasitol**, v. 97, n. 6, p. 1113–1120, 2011.

COSTA, L. B. et al. Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of Cryptosporidium infection and malnutrition. **J Infect Dis**, v. 205, n. 9, p. 1464–1471, 2012.

COUTINHO, B. P. et al. Cryptosporidium infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. **J Parasitol**, v. 94, n. 6, p. 1225–1232, 2008.

CROSS, T. G. et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 34–41, 2000.

DE QUEIROZ, C. A. et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. **BMC Gastroenterol**, v. 14, n. 1, p. 136, 2014.

DE SANTA BARBARA, P.; VAN DEN BRINK, G. R.; ROBERTS, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 7, p. 1322–1332, 2003.

DEBOER, M. D. et al. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 11, p. 642–653, 2012.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2640–2653, 2005.

DEO, M. G.; RAMALINGASWAMI, V. Reaction of the Small Intestine to Induced Protein Malnutrition in Rhesus Monkeys. A Study of Cell Population Kinetics in the Jejunum. **Gastroenterology**, v. 49, p. 150–157, 1965.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 7, p. 1175–1186, 2003.

DROZDOWSKI, L.; THOMSON, A. B. Intestinal mucosal adaptation. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 29, p. 4614–4627, 2006.

ESPADA, J. et al. Wnt signalling and cancer stem cells. **Clin Transl Oncol**, v. 11, n. 7, p. 411–427, 2009.

FEVR, T. et al. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 21, p. 7551–7559, 2007.

FINGAR, D. C. et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 1, p. 200–216, 2004.

FLOWER, D. R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. **Biochim Biophys Acta**, v. 1422, n. 3, p. 207–234, 1999.

FU, Z. et al. Activation of a nuclear Cdc2-related kinase within a mitogen-activated protein kinase-like TDY motif by autophosphorylation and cyclin-dependent protein kinase-activating kinase. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 14, p. 6047–6064, 2005.

FU, Z. et al. Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 22, p. 8639–8654, 2006.

FU, Z. et al. Intestinal cell kinase, a MAP kinase-related kinase, regulates proliferation and G1 cell cycle progression of intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, n. 4, p. G632–40, 2009.

FUJISHITA, T. et al. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 36, p. 13544–13549, 2008.

GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. **Genes Dev**, v. 19, n. 8, p. 877–890, 2005.

GREULICH, H.; ERIKSON, R. L. An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. **J Biol Chem**, v. 273, n. 21, p. 13280–13288, 1998.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.

GURMINI, J. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 271–278, 2005.

HALL, M. N. mTOR-what does it do? **Transplant Proc**, v. 40, n. 10 Suppl, p. S5–8, 2008.

HAN, J. et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, n. 5173, p. 808–811, 1994.

HANNON, G. J.; ROSSI, J. J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 371–378, 2004.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. **Genes Dev**, v. 14, n. 19, p. 2393–2409, 2000.

HATSELL, S. et al. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 145–158, 2003.

HEYMSFIELD, S. B.; MCMANUS, C. B. Tissue components of weight loss in cancer patients. A new method of study and preliminary observations. **Cancer**, v. 55, n. 1 Suppl, p. 238–249, 1985.

HILL JR., R. B. et al. Protein starvation and the small intestine. I. The growth and morphology of the small intestine in weanling rats. **Exp Mol Pathol**, v. 8, n. 1, p. 66–74, 1968.

HOOPER, C. S.; BLAIR, M. The effect of starvation on epithelial renewal in the rat duodenum. **Exp Cell Res**, v. 14, n. 1, p. 175–181, 1958.

HOUDE, M. et al. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. **J Biol Chem**, v. 276, n. 24, p. 21885–21894, 2001.

JENKINS, A. P.; THOMPSON, R. P. Enteral nutrition and the small intestine. **Gut**, v. 35, n. 12, p. 1765–1769, 1994.

JOHNSON, L. N.; LEWIS, R. J. Structural basis for control by phosphorylation. **Chem Rev**, v. 101, n. 8, p. 2209–2242, 2001.

JOHNSON, L. R. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. **Physiol Rev**, v. 68, n. 2, p. 456–502, 1988.

KO, L. J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes Dev**, v. 10, n. 9, p. 1054–1072, 1996.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol Cancer**, v. 9, p. 135, 2010.

KRAUSS, G. **Biochemistry of signal transduction and regulation**. 3rd. ed. Weinheim Great Britain: Wiley-VCH, 2003. p. xvi, 541 p.

KYRIAKIS, J. M. et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. **Nature**, v. 369, n. 6476, p. 156–160, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAHIRY, P. et al. A multiplex human syndrome implicates a key role for intestinal cell kinase in development of central nervous, skeletal, and endocrine systems. **Am J Hum Genet**, v. 84, n. 2, p. 134–147, 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589–3594, 2009.

LARSON, S. D. et al. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 293, n. 6, p. G1262–71, 2007.

LEE, D. F.; HUNG, M. C. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 24, p. 3011–3014, 2007.

LEE, K. W. et al. F-box only protein 9 is required for adipocyte differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 435, n. 2, p. 239–243, 2013.

LENAERTS, K. et al. Starvation induces phase-specific changes in the proteome of mouse small intestine. **J Proteome Res**, v. 5, n. 9, p. 2113–2122, 2006.

LEVE, F.; MORGADO-DIAZ, J. A. Rho GTPase signaling in the development of colorectal cancer. **J Cell Biochem**, v. 113, n. 8, p. 2549–2559, 2012.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 605–631, 2005.

LIEN, W. H.; FUCHS, E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. **Genes Dev**, v. 28, n. 14, p. 1517–1532, 2014.

LIMA, A. A. et al. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 458–462, 2002.

LIMA, A. A. M. et al. Effects of glutamine alone or in combination with zinc and vitamin A on growth, intestinal barrier function, stress and satiety-related hormones in Brazilian shantytown children. **Clinics**, v. 69, p. 225–233, 2014.

LIPKIN, M.; QUASTLER, H. Studies of protein metabolism in intestinal epithelial cells. **J Clin Invest**, v. 41, p. 646–653, 1962.

LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.

LIU, Y.; WU, C.; GALAKTIONOV, K. p42, a novel cyclin-dependent kinase-activating kinase in mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 4507–4514, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONG, X. et al. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. **Curr Biol**, v. 12, n. 17, p. 1448–1461, 2002.

LUCAS, N.; CHO, W. Phosphatidylserine binding is essential for plasma membrane recruitment and signaling function of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. **J Biol Chem**, v. 286, n. 48, p. 41265–41272, 2011.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2009.

MAKKY, K.; TEKIELA, J.; MAYER, A. N. Target of rapamycin (TOR) signaling controls epithelial morphogenesis in the vertebrate intestine. **Dev Biol**, v. 303, n. 2, p. 501–513, 2007.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biol**, v. 15, n. 6, p. 122, 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MCCOLE, D. F.; BARRETT, K. E. Varied role of the gut epithelium in mucosal homeostasis. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 23, n. 6, p. 647–654, 2007.

MCCUBREY, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1263–1284, 2007a.

MCCUBREY, J. A. et al. Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. **Adv Enzyme Regul**, v. 47, p. 64–103, 2007b.

MCGUCKIN, M. A. et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 1, p. 100–113, 2009.

MCLEOD, C. J. et al. Stem cell dynamics in response to nutrient availability. **Curr Biol**, v. 20, n. 23, p. 2100–2105, 2010.

MELOCHE, S.; POUYSSEGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3227–3239, 2007.

MIYATA, Y.; NISHIDA, E. Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 266, n. 2, p. 291–295, 1999.

MOLOFSKY, A. V.; PARDAL, R.; MORRISON, S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 700–707, 2004.

MONTGOMERY, R. K. et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 1, p. 179–184, 2011.

MURAMATSU, K.; SATO, T.; ASHIDA, K. Dietary Protein Level and the Turnover Rate of Tissue Proteins in Rats. **J Nutr**, v. 81, p. 427–433, 1963.

NAKAMURA, A. et al. Role of the mTOR complex 1 pathway in the in vivo maintenance of the intestinal mucosa by oral intake of amino acids. **Geriatr Gerontol Int**, v. 12, n. 1, p. 131–139, 2012.

NICHOLSON, J. P.; WOLMARANS, M. R.; PARK, G. R. The role of albumin in critical illness. **Br J Anaesth**, v. 85, n. 4, p. 599–610, 2000.

NIETO-SAMPEDRO, M. et al. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. **Clin Med Insights Oncol**, v. 5, p. 265–314, 2011.

NUSSE, R. et al. Wnt signaling and stem cell control. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 73, p. 59–66, 2008.

O'BRIEN, L. E. et al. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 603–614, 2011.

OGITA, S.; LORUSSO, P. Targeting phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs. **Target Oncol**, v. 6, n. 2, p. 103–117, 2011.

OHLSTEIN, B. et al. The stem cell niche: theme and variations. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 693–699, 2004.

OPFERMAN, J. T. Unraveling MCL-1 degradation. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 8, p. 1260–1262, 2006.

PERRYMAN, S. V; SYLVESTER, K. G. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 292–308, 2006.

PINTO, D. et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. **Genes Dev**, v. 17, n. 14, p. 1709–1713, 2003.

RAUL, F.; SCHLEIFFER, R. Intestinal adaptation to nutritional stress. **Proc Nutr Soc**, v. 55, n. 1B, p. 279–289, 1996.

RAVASCO, P. et al. Dietary counseling improves patient outcomes: a prospective, randomized, controlled trial in colorectal cancer patients undergoing radiotherapy. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 7, p. 1431–1438, 2005.

RAYASAM, G. V et al. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 6, p. 885–898, 2009.

RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 256–264, 2011.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843–850, 2005.

RHOADS, J. M. et al. Role of mTOR signaling in intestinal cell migration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 3, p. G510–7, 2006.

RICHMOND, C. A.; BREault, D. T. Regulation of gene expression in the intestinal epithelium. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 96, p. 207–229, 2010.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8th. ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010. p. xiv, 1450 p.

SANCHO, R. et al. JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumorigenesis in mice. **EMBO J**, v. 28, n. 13, p. 1843–1854, 2009.

SANGIORGI, E.; CAPECCHI, M. R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. **Nat Genet**, v. 40, n. 7, p. 915–920, 2008.

SANSOM, O. J. et al. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. **Genes Dev**, v. 18, n. 12, p. 1385–1390, 2004.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 2005.

SATO, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 262–265, 2009.

SEMONT, A. et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 6, p. 952–961, 2010.

SHAW, D.; GOHIL, K.; BASSON, M. D. Intestinal mucosal atrophy and adaptation. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 44, p. 6357–6375, 2012.

SHENG, H. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. **Gut**, v. 52, n. 10, p. 1472–1478, 2003.

SHI, L.; POTTS, M.; KENNELLY, P. J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. **FEMS Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 229–253, 1998.

SHTUTMAN, M. et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 10, p. 5522–5527, 1999.

SILVA, B. V et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, p. 453–462, 2009.

SKURK, C. et al. Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. **Circ Res**, v. 96, n. 3, p. 308–318, 2005.

SOKOLOVIC, M. et al. Fasting induces a biphasic adaptive metabolic response in murine small intestine. **BMC Genomics**, v. 8, p. 361, 2007.

SOUZA, W. F. DE et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 30–33, 2014.

STARLING, E. H. Discussion on the Therapeutic Value of Hormones. **Proc R Soc Med**, v. 7, n. Ther Pharmacol Sect, p. 29–31, 1914.

STURGILL, T. W. et al. The promoter for intestinal cell kinase is head-to-head with F-Box 9 and contains functional sites for TCF7L2 and FOXA factors. **Mol Cancer**, v. 9, p. 104, 2010.

SU, B.; KARIN, M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. **Curr Opin Immunol**, v. 8, n. 3, p. 402–411, 1996.

TAPPENDEN, K. A. Mechanisms of enteral nutrient-enhanced intestinal adaptation. **Gastroenterology**, v. 130, n. 2 Suppl 1, p. S93–9, 2006.

TOGAWA, K. et al. Intestinal cell kinase (ICK) localizes to the crypt region and requires a dual phosphorylation site found in map kinases. **J Cell Physiol**, v. 183, n. 1, p. 129–139, 2000.

TOKER, A. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. **Adv Biol Regul**, v. 52, n. 1, p. 78–87, 2012.

TOMPKINS, W. A. et al. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, n. 4, p. 1101–10, abr. 1974.

VAN ES, J. H. et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. **Nat Cell Biol**, v. 7, n. 4, p. 381–386, 2005.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489–501, 2002.

WANG, C. Y. et al. Dehydrocostuslactone suppresses angiogenesis in vitro and in vivo through inhibition of Akt/GSK-3beta and mTOR signaling pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31195, 2012.

WANG, W. W.; QIAO, S. Y.; LI, D. F. Amino acids and gut function. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 105–110, 2009.

WATERLOW, J. Effect of protein depletion on the distribution of protein synthesis. **Nature**, v. 184(Suppl), p. 1875–1876, 1959.

WEICHHART, T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. **Methods Mol Biol**, v. 821, p. 1–14, 2012.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 143–180, 1999.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352–364, 2012.

WILLIAMSON, R. C.; BUCHHOLTZ, T. W.; MALT, R. A. Humoral stimulation of cell proliferation in small bowel after transection and resection in rats. **Gastroenterology**, v. 75, n. 2, p. 249–254, 1978.

WOLANIN, P. M.; THOMASON, P. A.; STOCK, J. B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. **Genome Biol**, v. 3, n. 10, p. REVIEWS3013, 2002.

WOOD, E. J. Textbook of biochemistry with clinical correlations (Second Edition): Edited by T M Devlin. pp 1016. John Wiley and Sons, New York. 1986. \$39.95 ISBN 0-471-81462-8. **Biochemical Education**, v. 15, n. 1, p. 47, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales** Genève ,World Health Organization, , [s.d.].

WU, D. et al. Intestinal cell kinase (ICK) promotes activation of mTOR complex 1 (mTORC1) through phosphorylation of Raptor Thr-908. **J Biol Chem**, v. 287, n. 15, p. 12510–12519, 2012.

YAN, K. S. et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 2, p. 466–471, 2012.

YANG, Y.; ROINE, N.; MÄKELÄ, T. P. **CCRK depletion inhibits glioblastoma cell proliferation in a cilium-dependent manner**. [s.l: s.n.]. v. 14p. 741–747

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 127–137, 2001.

YILMAZ, O. H. et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 490–495, 2012.

YOST, C. et al. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. **Genes Dev**, v. 10, n. 12, p. 1443–1454, 1996.

ZHANG, H. M. et al. Akt kinase activation blocks apoptosis in intestinal epithelial cells by inhibiting caspase-3 after polyamine depletion. **J Biol Chem**, v. 279, n. 21, p. 22539–22547, 2004.

ZIEGLER, T. R. et al. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annu Rev Nutr**, v. 23, p. 229–261, 2003.

8. ANEXOS



08/29/2014

Dr. Richard Guerrant
Infectious Diseases & International Health
Delivered via email to rlg9a@virginia.edu

Dear Dr. Guerrant,

Re: Protocol No. 3315
"Study of Nutrient Therapy, of Intestinal and Cognitive Function, and of Susceptibility to Infection in Mice Challenged by Malnutrition"

Initial Review Date: 08/21/2012
First Annual Review Date: 08/20/2013
Second Annual Review Date: 08/19/2014

The Animal Care & Use Committee (ACUC) is pleased to inform you that full approval has been given for:

- New Protocol *[Approved for a three year term with annual reviews the month in which the initial approval was given becomes the anniversary month for Annual Review and Continuation after Three Years]*
- Modification *[Approved and added to protocol]*
- Annual Review *[Approved each year in anniversary month during three-year term]*
- Continuation After Three Years *[Approved for additional three year term with annual reviews]*
- Minor Modification *[Approved and added to protocol]*

A copy of the approved protocol is provided for your reference. Notification from the ACUC Office to the Principal Investigator and to the Contact Person will be sent thirty to sixty days prior to the anniversary month. It is the responsibility of the Principal Investigator to ensure that if the protocol is to continue without interruption, Annual Review and Continuation after Three Years proposals must be approved before the end of the anniversary month. **Any change to or deviation from the research described in this protocol must be reviewed and approved by the ACUC prior to implementation!**

Sincerely,

Carl E. Creutz, Ph.D.
Chairman, Animal Care & Use Committee
Professor of Pharmacology
Harrison Professor of Medical Teaching in Pharmacology

Contact Person: Bolick, David (dtb5w)

Cobb Hall | Rm. S-051 | P.O. Box 800720
Charlottesville, VA 22908-0720
Phone: 434-924-0405 | Fax: 434-982-4092
Email: acuc@virginia.edu



Animal Care & Use Committee

UNIVERSITY OF VIRGINIA

Principal Investigator: **RICHARD GUERRANT**
 PI Department: **Md-InmD Infectious Dis**
 Protocol Title: **Study of Nutrient Therapy, of Intestinal and Cognitive Function, and of Susceptibility to Infection in Mice Challenged by Malnutrition**
 Protocol Number: **3315-08-12**
 Protocol Submittal Type: **1st or 2nd annual review - NO modifications (other than personnel & literature search updates)**

PI Training: **PI has valid Animal Research Refresher for PIs**
 (Animal Research Refresher for PIs greater than or equal to 09/03/2011, i.e. training is valid for 3 years)
 Animal Research Refresher for PIs: **06/28/2013**

Cover Letter provided by person who submitted protocol

Date letter (protocol) was submitted: 07/31/2014
 Letter was submitted by: BOLICK, DAVID (dtb5w)
 Dear ACUC,

We have no modifications to this protocol and we have updated the literature searches and animal handlers.

Best Regards, David Bolick

Date letter (protocol) was submitted: 08/22/2014
 Letter was submitted by: BOLICK, DAVID (dtb5w)
 I have removed reference to Dr. Patricia Foley and added the titles of the grants as requested.

Best Regards, David Bolick

SUMMARY OF SPECIES PROCEDURES

Species Procedure # 1: **Adult mouse malnutrition**

Species: **Mice**

- Animal Handler(s):
BARRETT, LEAH (lib6v) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 04/30/15 (4-9672)
BARTELT, LUTHER (lab2za) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 03/17/15 (434-924-9672)
BOLICK, DAVID (dtb5w) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 03/12/15 (924-5630)
CHAPLIN, ASHLEY (asc9h) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 06/17/15 (924-1871)
KOLLING, GLYNIS (alk3a) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 07/17/15 (9245630)
DE OLIVEIRA ALVES, LUIS ANTONIO (ld7cv) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 06/03/15 (227-1386)
SHIN, JAE (jhs9ff) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 07/03/15 (4-5630)
SMIRNOV, IGOR (is4b) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 07/10/15 (982-3859)
WARREN, CIRLE (ca6t) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 11/26/14 (924-9672)
ZAENKER, EDNA (eiz9c) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 11/07/14 (924-9672)

Species Procedure # 2: **Malnutrition and Intranasal inoculation**

Species: **Mice**

- Animal Handler(s):
BARRETT, LEAH (lib6v) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 04/30/15 (4-9672)
BARTELT, LUTHER (lab2za) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 03/17/15 (434-924-9672)
BOLICK, DAVID (dtb5w) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 03/12/15 (924-5630)
CHAPLIN, ASHLEY (asc9h) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 06/17/15 (924-1871)
KOLLING, GLYNIS (alk3a) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 07/17/15 (9245630)
DE OLIVEIRA ALVES, LUIS ANTONIO (ld7cv) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 06/03/15 (227-1386)
SMIRNOV, IGOR (is4b) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 07/10/15 (982-3859)
WARREN, CIRLE (ca6t) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 11/26/14 (924-9672)
ZAENKER, EDNA (eiz9c) - Health Status: **OK FOR WORK** , Must return by: 11/07/14 (924-9672)

Principal Investigator: GUERRANT, RICHARD Dept: MEDICINE-GEOGRAPHIC MEDICINE PO Box: 801379 E-Mail: rlg9a@virginia.edu Work Phone: 924-5242 Fax: 924-0075 Home Phone: 434-973-2590	Contact Person: BOLICK, DAVID Dept: MEDICINE-ENDOCRINOLOGY & METABOL PO Box: 800746 E-Mail: dtb5w@virginia.edu Work Phone: 924-5630 Fax: 924-0075 Home Phone: 434-882-5206
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Protocol Identification: RESEARCH

Current Funding Source	Status	Dates	Description	Grant Numbers
DHHS/NIH	ACTIVE	current thru 2/2018	N/A	N/A

Agency Grant Numbers & Titles:

U54 AI057168 10 NOVEL THERAPEUTICS, MODELS AND IMMUNE INTERACTIONS FOR CRYPTOSPORIDIOSIS
 1 U19 AI109776 01 IMMUNOPROPHYLACTIC STRATEGIES TO CONTROL EMERGING ENTERIC INFECTIONS

Protocol Abstract:

We are interested in determining the effects of malnutrition with regard to the development of intestinal parasitic and bacterial diseases such as Cryptosporidium, Giardia, C. difficile and Enteropathogenic E. coli. We use mice to test these relationships as they provide us the opportunity to explore genetic causes and relationships between a malnourished individual and the progression of disease. In addition, we will be testing the new antibiotic fidaxomicin, and potentially other novel therapeutic agents, to try to rectify C. difficile infections in malnourished mice. These opportunities do not exist in other animal models, as we do not have the same extensive genetic tools, nor the understanding available to us that we do in the mouse. By understanding these relationships we can then better treat those children and adults who suffer from these conditions, sometimes throughout their lives, on a daily basis.

Additionally, a second study of our lab concentrates on alleviating the side effects of the chemotherapeutic drug, 5-fluorouracil (5-FU), in the treatment of cancer, those side effects including; diarrhea, nausea and possible occasional vomiting, mouth sores and poor appetite. We plan to study a mouse model using 5-FU, capable of causing intestinal cell damage and weight loss as would be seen in humans. We then will apply therapeutic interventions in the hopes of creating cancer treatments which would provide better treatment outcomes and quality of life for those patients.

Animal Use Justification:

Transgenic technologies have provided useful and reliable mouse models to study the impact of apolipoprotein E on brain development and neural plasticity. The lack of APOE is related with poor cognitive outcomes during aging, but no studies have addressed the APOE deficiency impact during early postnatal development or under malnutrition, a well-known cause of cognitive impairment. This unique model utilizing APOE knockout mice and their wild-type counterparts will allow us to accomplish this goal and, in addition, follow-up the possible benefits of glutamine and alanyl-glutamine, both alone and in combination with other nutrients, (including zinc and arginine), during brain development challenged by malnutrition in the first postnatal days.

Probiotic microorganisms are defined as viable nutritional agents conferring benefits to the health of the host. Studies have demonstrated that probiotics can ameliorate intestinal inflammation and reduce secretion of proinflammatory cytokines, however, no studies have addressed the probiotic impact in malnourished adult mice or those infected by Cryptosporidium parvum, Enteropathogenic E. coli, Giardia, or C. difficile. This unique model of wild-type versus specific genetic knockout mice will allow us to accomplish this goal.

Additional possible benefits of these nutrients will be examined when malnutrition is accompanied by Cryptosporidium, Giardia, Enteropathogenic E. coli and C. difficile infection. No comparable alternative exists. We will use the minimum number of animals necessary and not duplicate previous work.

Knowledge gained by determining the repair of intestinal cells with arginine/alanyl-glutamine/APOE peptide after damage by cancer drugs (ie. 5-FU) may lead to advancements in human post-cancer treatment.

Alternatives to the Use of Animals:

There are no comparable alternatives to this model. We will only use the minimum number of animals required and not unnecessarily duplicate any previous experiments.

PI Assurance for NON-Duplication:

As Principal Investigator, I have reviewed the literature relevant to my area of investigation, and am providing my assurance that the animal studies proposed in this protocol do not unnecessarily duplicate previous published or unpublished studies.

DEA Controlled Substances:

Will any DEA Controlled Substances be given to LIVE ANIMALS in this protocol? YES

NOTE: DEA Controlled Substances must be securely locked in a manner that cannot be easily removed, and up-to date usage logs (including inventory, amount used and balance remaining) must be maintained.

Location(s) of DEA Controlled Substances:

MR-6 (Carter-Harrison): 2711B

Patient Care Areas:

Will any of your Species Procedures be conducted in patient care areas or require the use of patient care equipment? NO

Breeding & Weaning of Rodents:

Will your breeding of rodents require an exemption to the breeding scheme or weaning age beyond those specified in the ACUC Policy on Breeding and Weaning of Rats and Mice? YES

Molecular Imaging Core:

Will you utilize the Molecular Imaging Core (MIC) in this Protocol? NO

Biological Agents: YES, IBC Number Selected in this Protocol: 009-96.

Name registered to IBC Number (009-96): GUERRANT, RICHARD.

Radioactive Materials: NO

Hazardous Chemicals:

Will any chemicals be administered to LIVE ANIMALS in this protocol that are carcinogenic, mutagenic, teratogenic or otherwise toxic to humans or other animals? YES

Animals with Induced or Spontaneous Genetic Mutations (Transgenic):

Does this research involve the creation (de novo generation by gene manipulation) or generation (creation of novel transgenics by breeding two transgenic lines) of transgenic animals (animals in which the germ line is altered by genomic DNA insertion or removal)? YES

Animals with Induced or Spontaneous Genetic Mutations (Mutations):

Does the animal have a genetic mutation (either induced or spontaneous) that will lead to a phenotype which adversely impacts its health or well-being? YES

Social Housing:

Does the nature of your research require an exemption from Social Housing? YES

Environmental Enrichment (other than social housing):

Does the nature of the research require an exemption from Environmental Enrichment? NO

Satellite Housing:

Does your research require satellite housing (i.e., vertebrate animal species housed either inside or outside the vivaria where research personnel provide animal husbandry and daily observations)? NO

Non-Pharmaceutical Grade Drugs:

Does the nature of the research require the use of Non-Pharmaceutical Grade Drugs? NO

Guillotines:

Will guillotines be used for Euthanasia? NO

Multiple Major Survival Surgical Procedures:

Do animals recover (awaken) from a Major Survival Surgical Procedure on more than one occasion? NO

Tumor Models:

Does your research utilize tumor models in rodents that exceed the parameters outlined as humane endpoints in the ACUC Policy on Tumor Production and Cancer Research? NO

Physical Restraint:

Will any conscious (unanesthetized) animals be kept in a restraint device during the course of these experiments for more than momentary procedures (longer than 5 minutes)? NO

Acclimation Period:

Does your research require the use of animals prior to the standard acclimation period prescribed in the ACUC Policy on Acclimation Period for Laboratory Animals? NO

Toe Clipping:

Does your research require toe clipping as a means of identification outside of the parameters defined in the ACUC Policy on Toe-Clipping (mice older than 10 days of age OR more than one digit per foot)? NO

Ascites Production:

Does your research require ascites production in rodents such that you must obtain fluid more than four times or using humane endpoints other than those defined in the ACUC Policy on Ascites Production in Rats and Mice? NO

Freund's Adjuvant:

Does your research require the use of Complete Freund's adjuvant in a manner that exceeds the volume, number of sites, or frequency of use as outlined in the ACUC Policy on the Use of Freund's Adjuvant? NO

SPECIES PROCEDURE # 1

Species: Mice

Procedure ID: Adult mouse malnutrition

Does this Species Procedure (in part or in whole) contain a Breeding Colony? Yes

Will your breeding of rodents require an exemption to the breeding scheme or weaning age beyond those specified in the ACUC Policy on Breeding and Weaning of Rats and Mice? NO

USDA Pain and Distress Category:

B: 20 Animals/Year

C: 25 Animals/Year

D: 0 Animals/Year

E: 3872 Animals/Year

Anticipated maximum number of animals per year: 3917

Justification for Category E procedures:

In our many studies of Cryptosporidium, Giardia (pilot studies agreed with this data) and EAEC infection in mice, we have found that very little diarrhea and no visible signs of distress, dehydration, pain or discomfort (ie. no hunching over, stomach kicking, reduction in eating or drinking, etc) are displayed by the mice at any age. The mouse fecal pellets (including in pre-weaned pups) are softer and moister than typical but are not liquid in these infected animals, therefore, no analgesia are given to these animals as they do not show signs of pain or other distress. Regarding C. difficile infected mice however, there will be some mice severely affected by the infection, these mice display classic signs of severe diarrhea and other disease associated discomfort mirroring those we see occur in humans, making this model extremely relevant to Clostridium difficile research for cures and therapies in humans. In our attempts to best study this disease we are unfortunately not able to give these animals the benefit of analgesics. All classes of analgesics, (narcotics, non-narcotics and neuroleptanalgesics) have been shown to decrease gastrointestinal motility or provide anti-inflammatory activity, both causing changes upon the true disease course ultimately yielding potentially inaccurate research results.

Justify the Number of Animals Needed:

CATEGORY B: Includes breeding colonies for knockout mice. We will keep 3 breeder pairs going at all times. This will require a total of 6 mice. Breeders will be replaced at the end of 8 months, we will then need a total of 12 mice for the course of a year. It is to be expected that some complications will arise, and we may have to replace certain breeders. We thus estimate the number to be 20.
 CATEGORY C: Includes breeders for PPAR gamma conditional knockout mice which must be genotyped by tail clipping and ear punching prior to setting up. See Main Procedure for more details. We will keep up to three breeding pairs at all times for each line. The total number of breeding lines is 2. Keeping 3 breeder pairs per line will require 12 mice. Breeders will need to be replaced at the end of an 8 month period, thus, for a 12 month period we will require 18 mice minimum. As sometimes females do not breed well, make good moms, or die as a result of pregnancies, we will estimate the number at 25.

CATEGORY E: While all organisms may not be tested in all conditions in all mouse strains, selected organisms may have derivative strains lacking selected virulence traits tested in relevant conditions. Experiments will be designed to evaluate 10% or greater differences in growth outcomes. Our calculations are as follows:

CRYPTOSPORIDIUM, ENTEROAGGREGATIVE E. COLI and C. DIFFICILE: 4 study periods (4d, 7d, 10d, 21d of treatment) X 4 study treatments (APOE peptides, Statin reagents, Antibiotics, negative control) X 2 treatment concentrations X 4 Infectious agents (cryptosporidium or EAEColi [for its attenuated derivatives] or C. difficile or PBS negative control) X 4 nutritional status (nourished, malnourished, Zinc deficient, Western diet) X 6 batches of mice (6 needed to collect enough intestinal tissue for analysis; 3 for PCR/ western blot/ELISA, 3 for morphometry/histology) = 3072 mice

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: 2 groups (nourished or malnourished) x 4 studies per agent x 2 study agents (alanyl-glutamine or fidaxomicin) x 5

dosages per agent x 5 animals per group = 400 mice.

GIARDIA STUDY: 2 groups (nourished or malnourished by 2% protein diet) x 2 study agents (PBS, Giardia) x 2 study agent concentrations x (up to) 3 time points of infection (days 3, 7, 10) x 10 batches of mice (10 needed to collect enough intestinal tissue for analysis; 6 for Lactulose:Mannitol permeability, 2 for PCR/ western blot/ELISA, 2 for morphometry/histology) = 240 mice

5-FU STUDY: 2 groups (nourished or malnourished + 5-FU) x 5 treatment agents (arginine, alanyl-glutamine, zinc, ApoE peptide, PBS control) x 4 treatment agent concentrations x 4 animals (4 endpoints for euthanasia, ie days 3, 6, 9, 14 days) = 160 mice

TOTAL mice = 3917 - Statistical analysis would include repeated measures MANOVA (Multi-variate analysis of variance) to compare growth and bacterial load post-infection.

Alternatives to Painful and Distressful Procedures SEARCH # 1	Alternatives to Painful and Distressful Procedures SEARCH # 2
<p>Database or source consulted: MEDLINE</p> <p>Date search was performed: 07/31/2014</p> <p>Years covered by the search: 09 TO 14</p> <p>Keywords: 1)adult mouse and malnutrition and diarrhea 2)adult mouse and malnutrition and enteroaggregative E. coli 3)adult mouse and malnutrition and giardia 4)adult mouse and malnutrition and C. difficile</p> <p>Summarize your findings:</p> <p>1) 4 results: 1 with a knockout specific model of disease (PI3K) 2) 1 results: our 2013 study 3) 0 results 4) 0 results A less painful model of malnutrition was not found improving upon current model</p>	<p>Database or source consulted: WEB OF SCIENCE</p> <p>Date search was performed: 07/31/2014</p> <p>Years covered by the search: 09 TO 14</p> <p>Keywords: 1)adult mouse and malnutrition and diarrhea 2)adult mouse and malnutrition and enteroaggregative E. coli 3)adult mouse and malnutrition and giardia 4)adult mouse and malnutrition and C. difficile</p> <p>Summarize your findings:</p> <p>1) 5 results: 3 from our lab and 1 with a knockout specific model of disease (PI3K) 2) 1 results: our 2013 study 3) 0 results 4) 0 results A less painful model of malnutrition was not found improving upon current model</p>
<p>Did you find a less painful/less distressful alternative that could accomplish the goals of your animal use protocol? NO</p>	<p>Did you find a less painful/less distressful alternative that could accomplish the goals of your animal use protocol? NO</p>

Molecular Imaging Core:
Will you utilize the Molecular Imaging Core (MIC) in this Species Procedure? NO

Biohazardous Agents: YES

What will be the Animal Biosafety Level for this Species Procedure? **ABSL 2**

I (GUERRANT, RICHARD) accept responsibility for the following:

1. Notifying the vivarium supervisor prior to introducing biohazardous agents (i.e. human materials, microorganisms or biotoxins requiring ABSL 2 or greater containment) into the vivarium.
2. Ensuring that each cage that houses animal(s) harboring experimentally introduced biohazardous agents is properly labeled (contact CCM vivarium supervisor for obtaining labels with the universal biohazard symbol).
3. Removing signage when biohazardous animals have been removed permanently or flipping signs over in between or following short duration ABSL 2 experiments (e.g., 72 hour shedding period).
4. Placing ABSL 2 carcasses in a red bag or opaque bag marked with the universal biohazard symbol and returning to the vivaria freezer/cold room. ABSL 2 caging returned to the vivarium for processing must be placed into an autoclave bag also clearly labeled with the biohazard symbol.

Biohazardous Agent(s) selected to be used in LIVE ANIMALS in this Species Procedure:

1. **Clostridium difficile**
2. **Cryptosporidium parvum**
3. **Escherichia coli - Enteropathogenic (EPEC) includes attaching and effacing (AECC); uropathogenic (UPEC); and enteroadherent (EAEC)**
4. **Giardia lamblia**

Route, volume and frequency of Biohazardous Agent administration AND how contaminated bedding and carcasses will be disposed.

Administration of Cryptosporidium oocysts, Giardia, C. difficile and EAEC bacteria - Of the E. coli strains listed, Enteropathogenic E. coli(EAEC) is the ONLY strain that the lab is working with. Unfortunately, EAEC is not listed as a single option. A modification to the protocol will be added if those other E. coli strains listed will be used in the future.

Duration of hazardous shedding after Biohazardous Agent administration AND any precautionary measures taken to protect personnel.

Cryptosporidium, Giardia, C. difficile and Enteropathogenic E. coli(EAEC) have the potential for fecal shedding post animal inoculation continuously throughout the experiment, thus 6% hydrogen peroxide (for Cryptosporidium and Giardia), 10% bleach (C. difficile) and Cavicide (EAEC) are used as the respective disinfectants. For all procedures inside the BSL2 room a moisture absorbing pad with a fluid resistant backing may be used to avoid potential surface contamination. Gloves and fluid resistant coats are to be worn at all times when handling infected mice or agents - Any instruments used with infected animals are kept in a container identified with an orange BIOHAZARD sticker. All non-disposable materials potentially contaminated are transported in a non-contaminated container and autoclaved. When animals are required to be transported between vivarium and Rm 2711 of MR6, cages will be wrapped in paper bags and labeled with biohazard stickers to provide proper containment. A Contaminated Material Container (CMC) is kept in the biosafety animal room for disposal of contaminated materials. Of the E. coli strains listed, Enteropathogenic E. coli(EAEC) is the ONLY strain that the lab is working with. Unfortunately, EAEC is not listed as a single option. A modification to the protocol will be added if those other E. coli strains listed will be used in the future.

Radioactive Materials: NO

Hazardous Chemicals: YES

I (GUERRANT, RICHARD) accept responsibility for the following:

1. Notifying the vivarium supervisor prior to introducing hazardous chemicals into the vivarium.
2. Ensuring that each cage that houses animal(s) harboring experimentally introduced hazardous chemicals is properly labeled.

3. Contacting the vivarium supervisor for assistance with obtaining hazardous chemical labels, if needed.

Hazardous Chemical(s) to be used in LIVE ANIMALS in this Species Procedure:

Chemical 01: 5-fluorouracil

Route, volume and frequency of Hazardous Chemical administration AND how contaminated bedding and carcasses will be disposed.

Single dose of 150 mg/kg per mouse intraperitoneally

Caution should be exercised during the disposal of this due to potential toxic, mutagenic and carcinogenic properties.

The mouse boxes of 5-FU injected mice will be labeled with a hazardous chemical sticker. Bedding will be disposed of using white hazardous waste buckets provided by EHS. Only the bedding from first cage change after administration is considered a chemical hazard and must not be changed for at least 24 hours after 5-FU is administered.

Carcasses are to be placed in bags and disposed of using hazardous chemical precautions (PPE = gown, gloves, mask).

Duration of hazardous shedding after Hazardous Chemical administration AND any precautionary measures taken to protect personnel.

5-fluorouracil = minimal shedding as administered IP; a chemical fume hood and PPE (gown, gloves, face shield) for chemical hazard protection will be used during administration by IP to protect against accidental splashing.

Caution should be exercised during the handling of this due to potential toxic, mutagenic and carcinogenic properties. The door to the room (in addition to the animal cage) must be labeled with a chemical hazard label stating that 5-fluorouracil is being used.

Does this research involve the creation (de novo generation by gene manipulation) or generation (creation of novel transgenics by breeding two transgenic lines) of transgenic animals (animals in which the germ line is altered by genomic DNA insertion or removal)? YES

Describe the genetic alteration and means by which the alteration will be achieved.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ or PPARG), also known as the glitazone receptor, or NR1C3 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3) is a type II nuclear receptor that in humans is encoded by the PPARG gene. Two isoforms of PPARG are detected in the human and in the mouse: PPAR- γ 1 (found in nearly all tissues except muscle) and PPAR- γ 2 (mostly found in adipose tissue and the intestine). PPARG regulates fatty acid storage and glucose metabolism. The genes activated by PPARG stimulate lipid uptake and adipogenesis by fat cells. PPARG knockout mice fail to generate adipose tissue when fed a high-fat diet. PPARG knockout mice are commercially available and also available from our collaborators at VBI and therefore, genetic alteration will not be performed in house.

Apolipoprotein E (APOE) is a main apoprotein of the chylomicron, and binds to a specific receptor on liver cells and peripheral cells. Likewise, this transgenic mouse is available commercially and therefore, genetic alteration will not be performed in house.

Does the animal have a genetic mutation (either induced or spontaneous) that will lead to a phenotype which adversely impacts its health or well-being? YES

Describe the known or anticipated phenotypic result and any adverse impact on the well-being of the animal.

Except for altered susceptibility to infection or intoxication, that will be investigated on, no other phenotypic result or adverse impact is expected in the research mice. Mice which have been genetically modified, that when infected, WILL NOT pose enhanced risks to personnel.

Defects in the APOE gene result in dyslipidemia. In mice, atherogenesis may be accelerated by concomitant infection. We shall investigate whether APOE transgenic mice are at an increased risk of infection or intoxication. These mice pose no enhanced risks to animal handlers.

- The NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules requires the following:
 - Transgenic experiments involving the generation of transgenic animals require notification of the Institutional Biosafety Committee (IBC) **simultaneous with initiation.**
 - Transgenic experiments involving human or animal pathogens require IBC approval **prior to initiation!**
 - Transgenic experiments using animals which have been genetically modified, that when infected, pose enhanced risks to **personnel (humans)** require IBC approval **prior to initiation!**

Where will the Animals in this Species Procedure be Housed?

MR6 Vivarium

Animal Husbandry (Mice): NON-STANDARD HUSBANDRY

NON-STANDARD Housing and Care: YES

NON-STANDARD Housing and Care description (Mice)

Non-infectious mice will be handled prior to any handling of infected mice.

After infection, mice will be housed in MR6 room B445 in a separate "sashed" BSL2 housing/compartiment for infected mice ONLY.

CGH departmental staff will DAILY check mouse food and water and will WEEKLY (or sooner if needed) change cages during infection experiments (as set-up by Alice Kenney).

RESTRICTED or SCHEDULED ACCESS to Food and/or Water: YES

RESTRICTED or SCHEDULED ACCESS to Food and/or Water description (Mice)

Malnutrition Study #1 (Metabolic cage + reduced normal feed): Mice will be placed in metabolic cages for 3 days of acclimation. During this acclimation period, the food will be given ad libitum as per standard vivarium practices, however, the feed will be weighed each day (at 24 hour intervals) to determine the amount of food each animal routinely devours in a 24 hour period. The average weight of the feed over 3 days is used to calculate the food restrictions imposed on the first day of the study. The food restrictions are a 30% reduction of food on the first day, 40% on the second day and 50% from the third day until the last day of experiment on day 10. This induced mild to moderate malnutrition is necessary for our study. To ensure stable colonization, 0.3mg/mL of Ampicillin will be added to the drinking water of all mice during the entire period (day 1-10).

NON-STANDARD Provision of Food and/or Water: YES

NON-STANDARD Provision of Food and/or Water description (Mice)

Malnutrition Study #2 (no metabolic cage, Malnutrition/Micronutrient Deficient Diets, such as 2% Protein[Harlan Teklad]; 7% protein [RBD]; Zinc deficient [RBD] = The animals will be changed from their normal feed to Malnutrition/Micronutrient Deficient Diet feed for a period of time up to 42 days. The mice will be fed, ad libitum. After this period, the animals will be returned to their normal diet for an additional 7-10 days to monitor weight gain. This induced mild to moderate malnutrition is necessary for our study.

Social Housing:

Does the nature of the research require an exemption for Social Housing? YES

A scientific justification must be provided. Be specific - Are you requesting an exemption for a specific group of animals or all animals? How many animals will be involved? What is the duration of the exemption?

All study mice will be individually housed, the animal's condition recorded (ie. diarrhea, changes in fur quality, general animal appearance) and weighed daily so that individual records can be kept for each mouse. In addition the mice need to be kept separately so that they do not re-infect each other with our infectious agents.

Environmental Enrichment (other than social housing):

Does the nature of the research require an exemption for Environmental Enrichment? NO

Live Animal Work Outside of Vivarium: YES

Location(s) of Live Animal Work:

MR-6 (Carter-Harrison): 2711B

Satellite Housing (Mice):

Does your research require satellite housing (i.e., vertebrate animal species housed either inside or outside the vivaria where research personnel provide animal husbandry and daily observations)? NO

SURGICAL (Survival and/or Non-Survival) Procedures:

Will any SURGERY (Survival and/or Non-Survival) be performed on animals in this Species Procedure? NO

Pharmaceutical(s) Used: (Mice)

Pre-Anesthetic:

NONE SELECTED

Inductional Anesthetic:

NONE SELECTED

Maintenance Anesthetic:

NONE SELECTED

PRIMARY Post-procedural analgesic:

NONE SELECTED

SECONDARY Post-procedural analgesic:

NONE SELECTED

Euthanasia Agent:

Euthanasia Solution IP or IV

Non-Pharmaceutical Grade Drugs:

Does the nature of the research require the use of Non-Pharmaceutical Grade Drugs? NO

Guillotines:

Will guillotines be used for Euthanasia in this Species Procedure? NO

Multiple Major Survival Surgical Procedures:

Do animals recover (wake up) from a Major Survival Surgical Procedure on more than one occasion? (MMSS) NO

Tumor Models

Does your research utilize tumor models in rodents that exceed the parameters outlined as humane endpoints in the ACUC Policy on Tumor Production and Cancer Research? NO

Physical Restraint

Will any conscious (unanesthetized) animals be kept in a restraint device during the course of these experiments for more than momentary procedures (longer than 5 minutes)? NO

Acclimation Period:

Does your research require the use of animals prior to the standard acclimation period prescribed in the ACUC Policy on Acclimation Period for Laboratory Animals? NO

Toe Clipping:

Does your research require toe clipping as a means of identification outside of the parameters defined in the ACUC Policy on Toe-Clipping (mice older than 10 days of age OR more than one digit per foot)? NO

Ascites Production:

Does your research require ascites production in rodents such that you must obtain fluid more than four times or using humane endpoints other than those defined in the ACUC Policy on Ascites Production in Rats and Mice? NO

Freund's Adjuvant

Does your research require the use of Complete Freund's adjuvant in a manner that exceeds the volume, number of sites, or frequency of use as outlined in the ACUC Policy on the Use of Freund's Adjuvant? NO

Main Procedure Description:

Procedures, which require Humane Endpoints and Criteria for Euthanasia, to be performed on animals used in this procedure section:

- infectious disease

BREEDING COLONY Breeding pairs will be established for all knockout and conditional knockout mice. Offspring will be weaned at 3 weeks of age. Between 3 and 8 weeks of age conditional knockout offspring will be genotyped by tail clipping. They will also be ear punched for later identification purposes. Tail clipping and ear punching will occur in room B439 of MR6 vivarium. All offspring will be kept for experimental purposes regardless of genotype. When breeders reach 8 months of age offspring will be genotyped for the purpose of replacing breeders. Those which are heterozygous will be placed as new breeders. Once it is determined that these breeder pairs are successful (birth of 1-2 litters) the old breeders will be euthanized. The remaining littermates will be used for experiments if possible. If there are not enough mice present to carry out an experiment before they are 8 weeks old they will be euthanized. All mice, (retired breeders and 8-10 week old mice not being used for experiments) will be euthanized by cervical dislocation under anesthesia (ketamine/xylazine) given by IP.

PREPARATION OF EXPERIMENTAL ANIMALS If not from our breeding colonies, weaned or older transgenic mice or wild type C57Bl/6 mice, are obtained through transfer by UVA vivarium staff.

MALNUTRITION STUDY: C57Bl/6J mice are received from vendor and acclimated by vivarium. They are caged in regular cages upon arrival and until acclimated.

MALNUTRITION STUDY #1 (Metabolic cages + reduced normal diet): The animals will be moved to individual, identified metabolic cages with free access to food and water for three days (for acclimation) before the beginning of malnutrition. The average food consumption is measured by weighing the feed during the 3 days of acclimation. The malnourished groups will have food restriction (30% reduction of food on Day 1, 40% on Day 2 and 50% on Days 3- 10).

MALNUTRITION STUDY #2 (no metabolic cage, 2% Protein Diet) = The animals will be changed from their normal feed to micronutrient deficient feed (ie. 2% Protein/Harlan Teklad; 7% protein/RBD; Zinc deficient/RBD) for a period of time up to 42 days. The mice will be fed, ad libitum. After this period, the animals will be returned to their normal diet for an additional 7-10 days to monitor weight gain.

MALNUTRITION STUDY #3 (no metabolic cage, no biohazardous agents, 5-FU administration using hazardous chemical precautions) = No special caging will be used, however, mice will be individually housed, the animal's condition recorded (ie. diarrhea, changes in fur quality, general animal appearance) and weighed daily so that individual records can be kept for each mouse. Daily treatment by oral gavage will start 3 days before administration of 5-FU (Day -3) with PBS control, alanyl-glutamine (0,100, 200, 400mM), arginine (0, 100, 200, 400 mM) or ApoE peptide (0, 1, 3, 10 mg/kg). On Day 0, malnutrition will be induced by administration of a single dose of 5-fluorouracil (150mg/kg) intraperitoneally in mice weighing 25-30 g. Daily treatment with PBS, alanyl-glutamine, arginine, ApoE peptide will continue to Day 14. The endpoint for euthanasia (specific for this MN Study#3) will be greater than 5% weight loss 2 days after 5-FU or greater than 12% weight loss at 6 days post administration of 5-FU.

Hazardous chemical safety precautions will be in place during the 5-FU treatment procedures and handling. Disposable, fluid resistant lab pads will be used on any surfaces that could potentially be handled. Upon completion of the testing, areas will be cleaned with SporGon. 5-FU injected mice are transferred to hooded mouse boxes (a hazardous chemical sticker is placed on the exterior of the boxes). The EXTERIOR of these mouse boxes are not touched with potentially contaminated, gloved hands so are non-contaminated and may be transported to the lab (MR6 rm 2711B). The animals will be euthanized IP with euthanasia solution obtained from the vivarium.

Upon euthanasia, urine and small intestinal tissue will be collected for histology, PCR and Western blot. Euthanasia procedures will be done in Center for Global Health Lab MR6 room 2711B. The animal will be bagged, and placed in the MR6 vivarium cold room.

MALNUTRITION TREATMENT STUDIES: Treatment will be concurrent with the induced malnutrition described. Day 1 of malnutrition corresponds to Day 1 of intervention/treatment. Mice from experimental groups will be administered TREATMENTS as follows:

1) By oral gavage once a day starting on Day 1 with 2) By oral gavage once a day starting on Day 21 and ending on Day 28 with alanyl-glutamine (0-200mM), glutamine (0-200mM), zinc (0-200mg/kg) and arginine (0-200mM) each in a volume of 3) Oral administration of oligodeoxynucleotides (50ug) by IP in volume of 4) Oral or parenteral administration of 5) Cog133 APOE mimetic peptide will be administered by IP in volume of

CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION - PREPARATION OF EXPERIMENTAL ANIMALS: If not from our breeding colonies, weaned or older transgenic mice or wild type C57Bl/6 mice, are obtained through transfer by UVA vivarium staff from collaborating investigators or commercially, and allowed to acclimate a minimum of 48 hours in Rm B439 MR6 vivarium. Mice from our own breeding colonies will also be of weaned age or older.

PRE-INFECTION PROCEDURES: STEP#1: Antibiotic Cocktail Administration: There are two antibiotic infection models of *C. difficile* infection listed below. MODEL#1= At Day -6 animals will be started on antibiotic cocktails given either by oral gavage or in their drinking water. Antibiotics to be given include a cocktail of the following: vancomycin (4.5mg/kg), colistin (850U), metronidazole (21.5mg/kg), and gentamicin (3.5mg/kg). New drinking water will be provided daily in 100ml volumes (minimal), gavage will be given daily in STEP#2: Clindamycin Administration: There are two models and control listed below. MODEL#1= At Day -1, those mice receiving the cocktail of vancomycin, colistin, metronidazole, and gentamicin will receive one dose of clindamycin (32mg/kg) by subcutaneous injection of INFECTION PROCEDURE: At Day 0, all mice to be infected will receive Infection will occur in Rooms B443 (procedure room) or B445 (BSL2 housing) of MR6 vivarium. Following infection mice will be housed in room B445 MR6. All cages will be marked with orange biohazard stickers identifying pathogen as *C. difficile*. BSL2 signs will be hung as dictated by MR6 vivarium guidelines for duration of housing.

At day 0 negative control mice will receive TREATMENT PROCEDURES: Drugs will be administered at different time points starting prior to or post-infection of mice. Treatments will occur in B445/B443 vivarium MR6. All of the infected and non-infected animals will receive either PBS (control) or one of the following treatments or treatment combinations: vancomycin, adenosine compounds, adenosine agonists, adenosine antagonists, alanyl-glutamine, nitaxozanide derivatives, probiotic compounds, fidamoxicin.

Each drug combination is given at different doses based on previous publications or our own in vitro and ligated ileal loop studies, (IACUC# 1513), ranging from 0 to 100 mg/kg, one time per day for a maximum of 28 days.

Drugs will be administered by either gavage (

GIARDIA/CRYPTOSPORIDIUM/E. COLI STUDY STEP#1: PREPARATION OF EXPERIMENTAL ANIMALS: If not from our breeding colonies, weaned or older wildtype C57Bl/6 mice are obtained through transfer by UVA vivarium staff from collaborating investigators or commercially, and allowed to acclimate 24-48hrs in Rm B439 MR6 vivarium. Mice from our own breeding colonies will also be of weaned age or older.

STEP#2: INFECTION PROCEDURE: After 5-10 days of a 2% protein or standard diet, all mice to be infected will receive **STEP#3: POST INFECTION:** Following infection mice will be housed in Rm B445 MR6. All cages will be marked with orange biohazard stickers identifying pathogen as *Giardia*. BSL2 signs will be hung as dictated by MR6 vivarium guidelines for duration of housing.

The malnourished group of animals will continue on the TD.92203 2% Protein Diet produced by Harlan Teklad up to 42 days. Nourished mice will continue to receive the standard diet produced by Harlan Teklad. All mice will be fed ad libitum.

FOR ALL OF THE ABOVE STUDY PROTOCOLS: MALNUTRITION OBSERVATION: The gradual level of malnutrition proposed by these studies is very unlikely to cause any animal death nor life threatening dehydration. Study groups will be observed daily where the research staff will record weight measurements and apply the Clinical Scoring System to each mouse.

BIOHAZARDOUS HANDLING: Non-infectious mice will be handled prior to any handling of infected mice. All personnel involved with this project are advised of the infectious nature of these biohazardous agents so that they can make an informed consent to work on this project. The potential dangers and risk of infection when working with these biohazardous agents (including high risk to immunocompromised individuals) are explained. Mice receiving infectious agents will have their cages labeled with an orange biohazard sticker to notify vivarium staff of the type of infectious agent. BSL2 safety precautions will be in place during the treatment procedures and handling of infected mice and their boxes and bedding. Disposable, fluid resistant lab pads/sheets will be used on any surfaces that could potentially be handled. Upon completion of the testing, areas will be disinfected using appropriate decontamination solution (depending upon infectious agent, ie. 6% hydrogen peroxide, Cavicide, 10% bleach or SporGon)

MONITORING: Animals will be monitored daily (including weekends and holidays) for weight, diarrhea and physical condition. If an animal appears to be in pain or discomfort the veterinarian will be consulted. Animals in the fulminant phase of disease will be monitored twice daily (including weekends and holidays) for weight, activity, diarrhea, coat condition, posture, and eye condition and using the Clinical Scoring System developed in consultation with Dr. Foley.

DATA COLLECTION: Stool pellets will be collected daily for cyst/toxin/bacterial shedding analysis and stool culture when applicable. A sample of untreated and treated animals will be euthanized daily for time course evaluations or at possibly longer intervals depending on the course of disease.

EXPERIMENTAL ENDPOINT: Euthanasia is the action that will be taken when the endpoint is reached. Endpoints for this project are the following: severe weight loss or dehydration (defined as a loss of >15% of body weight/day for 2 consecutive days), a score of "14" or higher (out of a possible 20) on the Clinical Scoring System or a score of "4" on the Clinical Scoring System in either the Weight Loss or Activity Categories. All living animals at Day 41 will be euthanized.

EUTHANASIA: Euthanasia procedures will be done in Center for Global Health Lab MR6 room 2711B. Infectious mice are transferred to hooded mouse boxes (an orange biohazard sticker is placed on the exterior of the boxes). The EXTERIOR of these mouse boxes are sprayed with appropriate decontamination solution (as described in Biohazardous Agent Administration section) and as such are then non-contaminated and may be transported to the lab (MR6 2711). The animals will be euthanized IP with euthanasia solution obtained from the vivarium. The animals will be bagged, and placed in the MR6 vivarium cold room. Infected animals are bagged in BSL2- labeled bags and placed in the MR6 vivarium cold room per vivarium rules.

DISPOSITION: All euthanized and dead animals will be examined for intestinal secretion/pathogenesis. Intestinal and/or cecal tissues will be examined for histopathology, mRNA and cytokine analysis. Blood collection may be done by retro-orbital phlebotomy or tail-vein snipping, all under sedation prior to euthanasia. Intracardiac blood will be collected post-mortem for bacterial culture. All carcasses will be bagged and disposed of by BSL2 precautions in the MR6 vivarium as dictated by their guidelines.

Post-Procedural Details:

CRYPTOSPORIDIUM, EAECOLI, GIARDIA INFECTED MICE: Body weight, food ingestion, water ingestion, urine and feces measurements will be recorded daily until euthanasia.

The endpoint for euthanasia for all of the mice will be defined as a weight loss or dehydration (defined as a loss of >15% of body weight/day for 2 consecutive days) or Day 42 of the experiment. In the case of the refeeding group, the endpoint for euthanasia will be 7-10 days after returning the group to their normal diet. For the 5-FU groups, the endpoint for euthanasia will be greater than 5% weight loss 2 days after 5-FU or greater than 12% weight loss at 6 days post administration of 5-FU.

C DIFFICILE INFECTED MICE: All animals will be observed twice daily, early morning, late afternoon. At each observation, animals will be evaluated for severity of infection by use of a 6 parameter, Clinical Scoring System - each parameter scored at 4 levels - developed in consultation with Dr. Foley. Two parameters: weight loss and activity have a 5th level of description. This system is based on previous observations of the disease progression both clinically and histologically. We have determined that disease severity is dose dependent with an inoculum of 10e3 cfu/ml producing minimal symptoms (light diarrhea). Histological analysis reveals light edema present concomitantly with some neutrophilic invasion and without architectural destruction of cecal or intestinal epithelium. Only rarely does death occur. At 10e4 cfu/ml the death rate is 50%. Animals typically show signs of illness at Day 3 of infection presenting with diarrhea and weight loss. Death usually occurs within 2-3 days. Mortality rates for mice receiving 10e5 cfu/ml inoculum are approximately 85% with signs of disease evident at day 2 and death by day 4.

Weight loss and diarrhea alone are not good predictors of death as we have seen mice with severe diarrhea and weight loss of 20% or greater recover. Those mice which will die typically have severe diarrhea coupled with weight loss of 10% or greater and most importantly diminished activity. If a mouse exhibits these three qualities (activity level at a minimum, i.e., reluctant to move or an inability to stretch body to reach cage top) that mouse is likely to die within 24 hours and so will be euthanized. If a mouse has either a 25% weight loss (score of 4) or a score of 4 in the activity category, it will be euthanized. Using the clinical scoring system, any mouse with a score of 14 or greater will be euthanized. The highest score possible is 20. Based on both the aforementioned observations and the ACUC Policy on Establishment of Humane Endpoints we have developed a Clinical Scoring System (Attached). Written records of these observations will be maintained and referenced with regards to animal welfare concerns.

Clinical Scoring System: Animals in the fulminant phase of disease will be monitored twice daily (including weekends and holidays) for weight, activity, diarrhea, coat condition, posture, and eye condition using the Clinical Scoring System developed in consultation with a veterinarian. (Attached). If an animal scores 14 or greater, the animal is euthanized. If the animal scores a 4 on either weight loss (>25%) or activity (no movement), that animal will be euthanized.

Additionally, all daily monitoring records for mice will be kept in the animal room during the course of experiments so that animal care and veterinary staff can check these as well.

Humane Endpoints and Criteria for Euthanasia:

Euthanasia is the action that will be taken when an endpoint is reached.

1) Based on both the observations described in the next paragraph, and the ACUC Policy on Establishment of Humane Endpoints, we have developed a Clinical Scoring System. Briefly, Weight loss, Coat, Eyes/Nose, Activity, Posture, and Diarrhea are scored from 0 (good) to 3(very bad); with Weight loss having an additional category of 4 (greater than 25% loss) and Activity also having a possible score of 4 (complete inactivity). Endpoints (prompting euthanasia) for this project are the following: severe weight loss or dehydration (defined as a loss of >15% of body weight/day for 2 consecutive days), a score of "14" or higher (out of a possible 20) on the Clinical Scoring System or a score of "4" on the Clinical Scoring System in either the Weight Loss or Activity Categories. Written records of these observations will be maintained and referenced with regards to animal welfare concerns.

2) Animal are observed daily by research staff. We have determined that disease severity is dose dependent with an inoculum of 10e3 cfu/ml producing minimal symptoms (light diarrhea). Histological analysis reveals light edema present concomitantly with some neutrophilic invasion and without architectural destruction of cecal or intestinal epithelium. Only rarely does death occur. At 10e4 cfu/ml the death rate is 50%. Animals typically show signs of illness at Day 3 of infection presenting with diarrhea and weight loss. Death usually occurs within 2-3 days. Weight loss and diarrhea alone are not good predictors of death as we have seen mice with severe diarrhea and weight loss of 20% or greater recover. Those mice which will die typically have severe diarrhea coupled with weight loss of 25% or greater, and most importantly, diminished activity. If a mouse exhibits these three qualities (activity level at a minimum, i.e., reluctant to move or demonstrate an inability to stretch body to reach cage top) that mouse is likely to die within 24 hours and so will be euthanized. Mortality rates for mice receiving 10e5 cfu/ml inoculum are approximately 85% with signs of disease evident at day 2 and death by day 4.

3) Research staff will be trained and assisted by vivarium staff and lab techs. In addition, new research staff will be monitored and followed by experienced research staff to guide and teach them how to grade the mice according to the Clinical Scoring System.

Procedural Training:

Circle Warren David Bolick Glynis Kolling Luther Bartelt

Animal Handler Responsibilities

BARRETT, LEAH ([ljb6v](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **03/27/2003**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **07/09/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **03/27/2003**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **06/06/2001**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/27/2006**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **04-27-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

BARTELT, LUTHER ([lab2za](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **04/11/2011**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **04/22/2014**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **04/11/2011**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **04/20/2011**
 LATA - Mouse Training: **04/11/2011**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **04/11/2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **04-20-2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

BOLICK, DAVID ([dtb5w](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **12/31/2002**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **06/04/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **12/31/2002**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **05/09/2011**
 LATA - Mouse Training: **09/05/2002**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **01/24/2006**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **05-09-2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

CHAPLIN, ASHLEY ([asc9h](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **07/02/2013**

UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/05/2013**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **07/05/2013**
 LATA - Mouse Training: **07/08/2013**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/01/2013**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-05-2013**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

KOLLING, GLYNIS ([gk3a](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **08/27/2003**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **05/28/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **08/27/2003**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **08/20/2003**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **08/05/2014**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **03-02-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

DE OLIVEIRA ALVES, LUIS ANTONIO ([ld7cv](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **08/02/2012**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/16/2012**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **07/11/2012**
 LATA - Mouse Training: **07/16/2012**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/16/2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-24-2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

SHIN, JAE ([jhs9ff](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **07/02/2014**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/03/2014**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **07/10/2014**
 LATA - Mouse Training: **07/03/2014**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/02/2014**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-10-2014**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

SMIRNOV, IGOR ([js4b](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **10/06/2010**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **10/16/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **09/09/2010**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **09/15/2010**
 LATA - Mouse Training: **09/09/2010**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **03/17/2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 2 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

WARREN, CIRLE ([ca6t](#))

ACUC Defined General Requirements

UVa - Orientation Seminar: **07/15/2005**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **05/28/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/15/2005**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **06/08/2000**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **06/08/2005**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-22-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

ZAENKER, EDNA ([eiz9c](#))
 ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **12/04/2012**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **11/15/2012**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **12/19/2012**
 LATA - Mouse Training: **11/30/2012**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/30/2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **12-19-2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

SPECIES PROCEDURE # 2

Species: **Mice**

Procedure ID: **Malnutrition and Intranasal inoculation**

Does this Species Procedure (in part or in whole) contain a Breeding Colony? **Yes**

Will your breeding of rodents require an exemption to the breeding scheme or weaning age beyond those specified in the ACUC Policy on Breeding and Weaning of Rats and Mice? **YES**

Provide the nature of the exemption being requested and the strain(s) of animal(s). Provide any supporting data or references to justify this request.

Pups will be weaned at day 18-23 unless their body weight is less than 7g (ie. malnourished APOE knockout mice tend to regain weight slowly and at 21 days may be only 4-6g and too small to eat the pellets or drink from the sipper). Therefore, these pups that are too small to be weaned will be kept with the dam up to 7 grams or a maximum of 28 days of age.

USDA Pain and Distress Category:

B: **20** Animals/Year

C: **0** Animals/Year

D: **0** Animals/Year

E: **840** Animals/Year

Anticipated maximum number of animals per year: **860**

Justification for Category E procedures:

In our many studies of Cryptosporidium and Enteroggregative E. Coli infection in mice, we have found that very little diarrhea and no visible signs of distress, dehydration, pain or discomfort (ie. no hunching over, stomach kicking, reduction in eating or drinking, etc) are displayed by the mice at any age. The mouse fecal pellets (including in pre-weaned pups) are softer and moister than typical but are not liquid in these infected animals, therefore, no anesthetic, etc are given to these animals. In addition, many of these drugs slow or immobilize the gut which could lead to worse infection and dramatically affect this study.

Justify the Number of Animals Needed:

Category B includes breeders for knockout mice. We will keep up to three breeding pairs at all times. This will require 6 mice. Breeders will need to be replaced at the end of an 8 month period, thus, for a 12 month period we will require 12 mice minimum. As sometimes some females do not breed well, make good moms, (ie eat litters), or die as a result of pregnancy, we will estimate the number at 20. Regarding category E, no studies have been completed that can be used as a basis for a formal power analysis to determine sample sizes required. Our estimated calculation is as follows:

EXPERIMENTAL CONDITIONS I These mice will receive the following compounds orally: Zinc(100mg/kg) Arginine (100mM) Glutamine (100mM) Alanyl-glutamine(100mM) negative control receiving saline There will be 5 mice employed in the testing of each compound for a total of 25 mice. Each group will require two studies involving two different pathogens (C. parvum and Enteroggregative E. coli) bringing the total to 50 mice. Additionally, we will test these conditions in three different strains of mice (C57Bl/6, APOE knockouts and PPAR gamma knockouts) bringing the total to 150. Once completed, studies will be repeated to confirm results for a final total of 300 mice.

EXPERIMENTAL CONDITIONS II These mice will receive the following compounds by subcutaneous or IP or IM injection: 1)Zinc(100mg/kg) 2)Arginine (100mM) 3)Glutamine (100mM) 4)Alanyl-glutamine(100mM) 5)negative control receiving saline There will be 5 mice employed in the testing of each compound for a total of 25 mice. Each group will require two studies involving two different pathogens (C. parvum and Enteroggregative E. coli) bringing the total to 50 mice. Additionally, we will test these conditions in three different strains of mice (C57Bl/6, APOE knockouts and PPAR gamma knockouts) bringing the total to 150. Once completed, studies will be repeated to confirm results for a final total of 300

mice.

EXPERIMENTAL CONDITIONS III These mice will receive the following compounds by oral or subcutaneous injection: 1) administration of oligos (100mM) 2) negative control receiving saline. There will be 5 mice employed in the testing of each compound for a total of 10 mice. Each group will require two studies involving two different pathogens (*C. parvum* and Enteroaggregative *E. coli*) bringing the total to 20 mice. Additionally, we will test these conditions in three different strains of mice (C57Bl/6, APOE knockouts and PPAR gamma knockouts) bringing the total to 60. Once completed, studies will be repeated to confirm results for a final total of 120 mice.

EXPERIMENTAL CONDITIONS IV These mice will receive the following compounds by oral or IP injection: 1) administration of PPAR gamma agonist (100µl, 1-10mg) 2) negative control receiving saline. There will be 5 mice employed in the testing of each compound for a total of 10 mice. Each group will require two studies involving two different pathogens (*C. parvum* and Enteroaggregative *E. coli*) bringing the total to 20 mice. Additionally, we will test these conditions in three different strains of mice (C57Bl/6, APOE knockouts and PPAR gamma knockouts) bringing the total to 60. Once completed, studies will be repeated to confirm results for a final total of 120 mice.

EXPERIMENTAL CONDITIONS V These mice will receive the following inoculations: 1) Antigen cp-15 suspended in 10ul of PBS, administered in 1 nare of the mouse, OR 2) Antigen SRK suspended in 10ul of PBS, administered in 1 nare of the mouse. OR 3) Antigen cp-15 suspended in PBS plus alum, and injected IM. OR 4) Antigen SRK suspended in PBS plus alum, and injected IM.

Alternatives to Painful and Distressful Procedures SEARCH # 1	Alternatives to Painful and Distressful Procedures SEARCH # 2
<p>Database or source consulted: MEDLINE Date search was performed: 07/31/2014 Years covered by the search: 09 TO 14 Keywords: 1) mouse and malnutrition and preweaned 2) mouse and malnutrition and enteroaggregative E. coli 3) mouse and malnutrition and cryptosporidium 4) mouse and malnutrition and APO knockout Summarize your findings: 1) 9 results, no alternative to our method 2) 9 results, 3 from our lab, no alternative 3) 7 results, 5 from our lab, no alternative 4) 3 results, no alternative A less painful model of malnutrition was not found improving upon current model</p>	<p>Database or source consulted: WEB OF SCIENCE Date search was performed: 07/31/2014 Years covered by the search: 09 TO 14 Keywords: 1) mouse and malnutrition and preweaned 2) mouse and malnutrition and enteroaggregative E. coli 3) mouse and malnutrition and cryptosporidium 4) mouse and malnutrition and APO knockout Summarize your findings: 1) 0 results, no alternative 2) 3 results, all from our lab 3) 12 results, 6 from our lab, no alternative 4) 0 results A less painful model of malnutrition was not found improving upon current model</p>
<p>Did you find a less painful/less distressful alternative that could accomplish the goals of your animal use protocol? NO</p>	<p>Did you find a less painful/less distressful alternative that could accomplish the goals of your animal use protocol? NO</p>

Molecular Imaging Core:
Will you utilize the Molecular Imaging Core (MIC) in this Species Procedure? **NO**

Biohazardous Agents: YES

What will be the Animal Biosafety Level for this Species Procedure? **ABSL 2**

I (GUERRANT, RICHARD) accept responsibility for the following:

1. Notifying the vivarium supervisor prior to introducing biohazardous agents (i.e. human materials, microorganisms or biotoxins requiring ABSL 2 or greater containment) into the vivarium.
2. Ensuring that each cage that houses animal(s) harboring experimentally introduced biohazardous agents is properly labeled (contact CCM vivarium supervisor for obtaining labels with the universal biohazard symbol).
3. Removing signage when biohazardous animals have been removed permanently or flipping signs over in between or following short duration ABSL 2 experiments (e.g., 72 hour shedding period).
4. Placing ABSL 2 carcasses in a red bag or opaque bag marked with the universal biohazard symbol and returning to the vivaria freezer/cold room. ABSL 2 caging returned to the vivarium for processing must be placed into an autoclave bag also clearly labeled with the biohazard symbol.

Biohazardous Agent(s) selected to be used in LIVE ANIMALS in this Species Procedure:

1. *Clostridium difficile*
2. *Cryptosporidium parvum*
3. *Escherichia coli* - Enteropathogenic (EPEC) includes attaching and effacing (AEEC); uropathogenic (UPEC); and enteroadherent (EAEC)

Route, volume and frequency of Biohazardous Agent administration AND how contaminated bedding and carcasses will be disposed.

Cryptosporidium = Administration = 30-100µl 1-4 times: cryptosporidium oocysts by oral gavage (cryptosporidium lysates containing *E. coli* = Administration = 30-100µl 1-4 times: *E. coli* (in sterile saline) by oral gavage during the study, at varying doses 1x. Gavage is carried out in a biosafety cabinet. - The mouse boxes with *E. coli* infected mice will be labeled as such with an orange biosafety sticker - contaminated bedding is returned to the vivarium in biohazard labeled autoclavable bags. Carcasses are to be placed in red, biohazard bags and disposed of as biohazardous waste.
C. difficile administration- 30-100µl 1-4 times: *C. difficile* (in BHI) by oral gavage during the study, at varying doses 1x. Contaminated bedding and carcasses will be disposed as described above.

Duration of hazardous shedding after Biohazardous Agent administration AND any precautionary measures taken to protect personnel.

Cryptosporidium = potential continuous shedding upon inoculation - 6% hydrogen peroxide is used as the disinfectant - For all procedures inside the BSL2 room a moisture absorbing pad with a fluid resistant backing may be used to avoid potential surface contamination. - Gloves and fluid resistant coats are to be worn at all times when handling crypto infected mice or agents - Any instruments used with infected animals are kept in a container identified with an orange BIOHAZARD sticker. - All non-disposable materials potentially contaminated are transported in a non-contaminated container and autoclaved. - A Contaminated Material Container (CMC) is kept in the biosafety animal room for disposal of contaminated materials. - When animals are required to be transported between vivarium and Rm 2711B of MR6, cages will be wrapped in paper bags and labeled with biohazard stickers to provide proper containment.

E. coli= potential continuous shedding upon inoculation - 10% bleach, Cavicide or SporKlenz may be used as the disinfectant - Gloves and fluid resistant coats are to be worn at all times when handling E. coli infected mice or agents - Any instruments used with infected animals are kept in a container identified with an orange BIOHAZARD sticker. - All non-disposable materials potentially contaminated are transported in a non-contaminated container and autoclaved. - A Contaminated Material Container (CMC) is kept in the biosafety animal room for disposal of contaminated materials. - When animals are required to be transported between vivarium and Rm 2711B of MR6, cages will be wrapped in paper bags and labeled with biohazard stickers to provide proper containment.

C. difficile has the potential for fecal shedding post animal inoculation, thus 10% bleach (C. difficile) is used as the disinfectant. The rest of the procedure are as described above.

Radioactive Materials: NO

Hazardous Chemicals: NO

Does this research involve the creation (de novo generation by gene manipulation) or generation (creation of novel transgenics by breeding two transgenic lines) of transgenic animals (animals in which the germ line is altered by genomic DNA insertion or removal)? YES

Describe the genetic alteration and means by which the alteration will be achieved.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), also known as the glitazone receptor, or NR1C3 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3) is a type II nuclear receptor that in humans is encoded by the PPARG gene. Two isoforms of PPARG are detected in the human and in the mouse: PPAR-G1 (found in nearly all tissues except muscle) and PPAR-G2 (mostly found in adipose tissue and the intestine). PPARG regulates fatty acid storage and glucose metabolism. The genes activated by PPARG stimulate lipid uptake and adipogenesis by fat cells. PPARG knockout mice fail to generate adipose tissue when fed a high-fat diet. PPARG knockout mice are commercially available and also available from our collaborators at VBI and therefore, genetic alteration will not be performed in house.

Apolipoprotein E (APOE) is a main apoprotein of the chylomicron, and binds to a specific receptor on liver cells and peripheral cells. Likewise, this transgenic mouse is available commercially and therefore, genetic alteration will not be performed in house.

Does the animal have a genetic mutation (either induced or spontaneous) that will lead to a phenotype which adversely impacts its health or well-being? YES

Describe the known or anticipated phenotypic result and any adverse impact on the well-being of the animal.

Except for altered susceptibility to infection or intoxication, that will be investigated on, no other phenotypic result or adverse impact is expected in the research mice. Mice which have been genetically modified, that when infected, WILL NOT pose enhanced risks to personnel.

Defects in the APOE gene result in dyslipidemia. In mice, atherogenesis may be accelerated by concomitant infection. We shall investigate whether APOE transgenic mice are at an increased risk of infection or intoxication. These mice pose no enhanced risks to animal handlers.

- The NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules requires the following:
 - Transgenic experiments involving the generation of transgenic animals require notification of the Institutional Biosafety Committee (IBC) **simultaneous with initiation.**
 - Transgenic experiments involving human or animal pathogens require IBC approval **prior to initiation!**
 - Transgenic experiments using animals which have been genetically modified, that when infected, pose enhanced risks to **personnel (humans)** require IBC approval **prior to initiation!**

Where will the Animals in this Species Procedure be Housed?
MR6 Vivarium

Animal Husbandry (Mice): NON-STANDARD HUSBANDRY

NON-STANDARD Housing and Care: YES

NON-STANDARD Housing and Care description (Mice)

After infection, mice will be housed in MR6 room B445 in a separate "sashed" BSL2 housing/compartiment for infected mice ONLY.

CGH departmental staff will DAILY check mouse food and water and will WEEKLY (or sooner if needed) change cages during infection experiments (as set-up by Alice Kenney).

RESTRICTED or SCHEDULED ACCESS to Food and/or Water: YES

RESTRICTED or SCHEDULED ACCESS to Food and/or Water description (Mice)

1. Pups will be removed from the dam for periods of time (4-12 hours) and then returned to the dam. This induced mild to moderate malnutrition is necessary for our study.

2. Some pups will be removed from the dam and placed with another dam with pups (this induced crowding will produce mild to moderate malnutrition in the pups). This induced malnutrition may be less stressful on the pups than removing the pups from the dam for periods of times as in #1 above.

NON-STANDARD Provision of Food and/or Water: YES

NON-STANDARD Provision of Food and/or Water description (Mice)

Dam will be given a modified low protein diet to induced malnutrition in pups (TD.92203 2% Protein Diet produced by Harlan Teklad) for Days 1-5 (or 1-10). The dams will be fed, ad libitum. After this period, the dams will be returned to their normal diet for an additional 7-10 days to monitor weight gain.

Social Housing:

Does the nature of the research require an exemption for Social Housing? NO

Environmental Enrichment (other than social housing):

Does your research require an exemption for Environmental Enrichment? NO

Live Animal Work Outside of Vivarium: YES

Location(s) of Live Animal Work:

MR-6 (Carter-Harrison): 2711B

Satellite Housing (Mice):

Does your research require satellite housing (i.e., vertebrate animal species housed either inside or outside the vivaria where research personnel provide animal husbandry and daily observations)? NO

SURGICAL (Survival and/or Non-Survival) Procedures:

Will any SURGERY (Survival and/or Non-Survival) be performed on animals in this Species Procedure? NO

Pharmaceutical(s) Used: (Mice)

Pre-Anesthetic:

NONE SELECTED

Inductional Anesthetic:

Pentobarbital 60-90 mg/kg IP IV

Maintenance Anesthetic:

NONE SELECTED

PRIMARY Post-procedural analgesic:

NONE SELECTED

SECONDARY Post-procedural analgesic:

NONE SELECTED

Euthanasia Agent:

Cervical Dislocation Under Anesthesia

Non-Pharmaceutical Grade Drugs:

Does the nature of the research require the use of Non-Pharmaceutical Grade Drugs? NO

Guillotines:

Will guillotines be used for Euthanasia in this Species Procedure? NO

Multiple Major Survival Surgical Procedures:

Do animals recover (wake up) from a Major Survival Surgical Procedure on more than one occasion? (MMSS) NO

Tumor Models

Does your research utilize tumor models in rodents that exceed the parameters outlined as humane endpoints in the ACUC Policy on Tumor Production and Cancer Research? NO

Physical Restraint

Will any conscious (unanesthetized) animals be kept in a restraint device during the course of these experiments for more than momentary procedures (longer than 5 minutes)? NO

Acclimation Period:

Does your research require the use of animals prior to the standard acclimation period prescribed in the ACUC Policy on Acclimation Period for Laboratory Animals? NO

Toe Clipping:

Does your research require toe clipping as a means of identification outside of the parameters defined in the ACUC Policy on Toe-Clipping (mice older than 10 days of age OR more than one digit per foot)? NO

Ascites Production:

Does your research require ascites production in rodents such that you must obtain fluid more than four times or using humane endpoints other than those defined in the ACUC Policy on Ascites Production in Rats and Mice? NO

Freund's Adjuvant

Does your research require the use of Complete Freund's adjuvant in a manner that exceeds the volume, number of sites, or frequency of use as outlined in the ACUC Policy on the Use of Freund's Adjuvant? NO

Main Procedure Description:

Procedures, which require Humane Endpoints and Criteria for Euthanasia, to be performed on animals used in this procedure section:

- infectious disease

MALNUTRITION STUDY:

C57BL/6J wild type control timed pregnant mice (12 d) are received from vendor and acclimated to vivarium for 48 hours. They are caged individually and monitored until delivery (termed Day 0). After delivery, newborns will be adjusted to 7-8 pups (extra pups will be transferred to another dam with less than 7-8 pups of the same age). The same will be done with knockout pups.

Malnutrition is a well-known cause of profound brain plasticity impairment by reducing the supply of essential nutrients to the developing brain. Malnutrition in our study will be induced by one of three methods (timed separation periods or crowding): 1) After delivery, newborns will be adjusted to 7-8 pups (extra pups will be transferred to another dam with less than 7-8 pups of the same age) then separating half the pups in each litter of 7-8 pups from their lactating dams. Separation period by placing the pups: a) with a non-lactating foster dam, for defined periods each day (4h on Day 4; 8h on Day 5 and 12h thereafter) OR b) in a separate, clean mouse box containing a heating pad for the same defined periods of time. The gradual level of malnutrition proposed by this study is very unlikely to cause any animal death nor life threatening dehydration during nursing. Foster mother is used in case of pup rejection. A selected group of malnourished animals will be returned to their mother's cage full time in order to assess growth catch-up and the other group of nourished mice at the same age will be switched to the malnutrition protocol in order to assess the effect of glutamine and the other nutrients on preventing stunting. During the malnutrition periods, the lactating mother and half of the litter of pups will be held in the original box. The other half litter of malnourished control pups are removed to clean box/bedding for malnutrition periods of time and malnourished

pups are always given back to the same original box with the mother and other pups.

OR 2) mild malnutrition will be induced by "crowding" (newborns will be at birth transferred from one litter to another litter so that 14-16 pups will be with one mother for the entire study period)

OR 3) Malnutrition will be induced by feeding Dam a low protein diet (TD.92203 2% Protein Diet produced by Harlan Teklad), for Days 1-5(or 1-20). The mice will be fed, ad libitum. After this period, the animals will be returned to their normal diet for an additional 7-10 days to monitor weight gain.

For fostering the pups (if needed), the following steps will be conducted: wearing gloves, we are going to carefully remove the foster mom from her box and place her on the top of the wire lid and then we will collect the foster mom's litter from the box and set them aside on the bench-top. Changing gloves, carefully, we will remove the litter from the experimental animal box and place the pups on a paper towel for transport, carefully excluding feces, bedding and corn cob litter when taking the pups. Gently, we will transfer the pups to the foster mother's box. If the foster mother created a nest, we will deposit the pups into the nest and cover them with the nesting bedding. We will set the timer for 15 minutes. We are going to euthanize the foster mom's original litter of pups by placing 1-2ml of fresh isoflurane in a tube-cone and placing the pups in the tube and capping. After the 15 minutes on the timer has expired, we will put on a new pair of gloves and return the foster mother to her box. We will observe the foster mother for grooming, nursing or even disinterest. If the female becomes agitated and begins to bite or otherwise attack the pups then we will remove her from the box and repeat the rederivation using a new foster mom if available. We will dispose of the dead pups, and then clean the bench-top and restock any consumed supplies.

"Request for Exception to the Weaning and Litter Numbers Policy" = Pups will be weaned at day 18-23 unless their body weight is less than 7g (ie. malnourished APOE knockout mice tend to regain weight slowly and at 21 days may be only 4-6g and too small to eat the pellets or drink from the sipper). Therefore, these pups that are too small to be weaned will be kept with the dam up to 7 grams or a maximum of 28 days of age.

All pups will be individually identified on Day 4 (and remarked as needed), by placing red or black waterproof, ink lines on their backs (or tails when they are with fur). Individual records are kept for each pup as to their weight, tail length, nutritional/treatment status and cognitive testing results.

Both weight and tail length will be recorded daily (after Day 4) until euthanized. Cognitive functioning testing (after Day 4) will be performed every 2-4 days (ie. "surface righting", "cliff avoidance"). A thermal pad will be used to warm pups during daily measurements.

TREATMENT: Pups from experimental groups will be administered study agents by: 1) being fed once a day with alanyl-glutamine, glutamine, zinc and arginine (only PBS for controls) in 100 microliters volume with a neonatal ball-type feeding needle, starting at day 14 (when malnourished pups can be safely gavaged). Experimental treatment doses will be: zinc (100mg/kg), arginine (100mM), glutamine (100 mM), alanyl-glutamine (100mM) OR 2) subcutaneous injection (subscapular) or IP of 40ul of zinc (100mg/kg), arginine (100mM), glutamine (100mM), alanyl-glutamine (100mM) once a day starting on Day4 (80 ul starting on Day 11) and 3) oral administration of oligodeoxynucleotides (100mg) in a 5 ul dose one time on Day 5. 4) Oral or parenteral administration of PPAR gamma agonists (100ul, 1-10mg) daily for ten days.

50% of the study animals and control litters from each group will be monitored up to 6 weeks-old and tested using Morris Water Maze task (behavioral test for memory using a water pool assisted with an electronic tracking system) and open field. The Morris Maze is located in the lab (MR6 room 2711). Non-infectious mice will be tested prior to any testing performed on Cryptosporidium infected mice. Disinfect the water pool for 1-2 hours by adding 50% hydrogen peroxide to the water to bring the concentration of hydrogen peroxide to 6% (ie. for 22 L of water, add 3 L of 50% H₂O₂).

Cryptosporidium study groups boxes are to be labeled with an orange biohazard sticker labeled "Cryptosporidium". In the vivarium biosafety cabinet 100 microliters of oocysts in sterile saline will be administered in a single dose by gavage at day 6. 6% hydrogen peroxide will be used for decontamination of work areas.

E. coli study groups boxes are to be labeled with an orange biohazard sticker labeled "E. coli". In the vivarium biosafety cabinet, 10-20 microliters of bacteria in sterile saline will be administered in a single dose by gavage at day 6. SporKlenz, 10% bleach or Cavicide may be used for decontamination of work areas.

C. difficile study groups boxes are to be labeled with an orange biohazard sticker labeled "C. difficile". In the vivarium biosafety cabinet, 30-100ul microliters of bacteria in sterile BHI will be administered in a single dose by gavage at day 6. 10% bleach will be used for decontamination of work areas.

Both study groups will be observed daily and have daily weight and tail length measurements performed. The endpoint for euthanasia for these groups will be defined as a weight loss or dehydration (defined as a loss of >15% of body weight/day for 2 consecutive days).

At Day 14, Day 21, Day 28 and young mice (6 wk of age): Immediately prior to euthanasia (after a 12 hour fast), the pups are anesthetized with Sodium Pentobarbital (5-9 mg/100 g, IP). At times when anesthesia will interfere with assay results, those assays involving measurement of cytokine immune responses through mRNA and microarray analysis data, pups will be euthanized by cervical dislocation without prior anesthetic treatment. This procedure, as carried out by Dr. Roche and his assistants, takes 2-3 seconds at most. The alternatives (animal struggling during a CO₂ exposure or the minutes for xylazine/ketamine to take effect) can be detrimental experimentally, particularly in the study of genes (and their products) that can change quickly. In our own work (Roche, et al., Lab Invest.88: 1778-91, 2008), microarray analysis showed that liver RNA for cytokine CXCL1/KC was up 16-fold over baseline by 2 hours after exposure to one of our study compounds, and was likely progressively elevated within minutes of the stimulus. In the literature, TNF-alpha mRNA is increased significantly within 30 minutes of a stimulus (Brain Research 1226: 89-98, 2008.), as is IFN-gamma and IL-12 mRNA within 60 minutes (Infection and Immunity 74: 4172-9, 2006).

Blood is drawn via intracardiac stick for biochemical analyses and then the pups are euthanized by cervical dislocation.

After euthanasia, chest cavity is opened and a catheter may be inserted into the right ventricle of the heart and into aorta. The left ventricle is perforated and perfused with ice-cold normal saline with a syringe. Without interruption ice-cold paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.2) is infused until neck and hindquarters become rigid. The brains and small intestine segments are removed. Euthanasia procedures will be done in Center for Global Health Lab MR6 room 2711B. The animal is bagged, and placed in the vivarium cold room. Cryptosporidium infected animals are bagged in BSL-2 labeled bags and placed in the MR6 vivarium cold room.

Protective sheets and 6% hydrogen peroxide decontamination will be used during anesthesia, and euthanasia of cryptosporidium infected mice.

Intranasal inoculation:

Mice to be inoculated will be subgroups of the mice in the Malnutrition Study (as described above) as well as controls.

The mice will be immunized by nasal inoculation of a cryptosporidium lysate, a non-infectious cryptosporidium DNA fragment or the Salmonella (ClyA) or recombinant DNA at intervals of 1-3 weeks apart. The inoculation work area may be covered with a moisture absorbing pad and area will be disinfected with 6% hydrogen peroxide upon completion of the inoculation.

Two hours prior to inoculation with Cryptosporidium, an IP injection of 1mg Interferon-gamma-neutralizing rat anti-mouse immunoglobulin G1

monoclonal antibody (XMG1.2) is administered. 1 mg of rat IgG will be injected IP for the control mice. XMG1.2 is used to cause immunosuppression in the test mice to help aid infection by cryptosporidium.

Nasal immunizations will be conducted in the vivarium biosafety room. Using a micropipet tip, the inoculum is pipetted into the nostril of the mouse (to deliver no more than 30ul to a nostril). The mouse will be monitored until they awaken before being returned to the mouse box shelf (few moments).

2-12 weeks post-challenge, the mice will be euthanized as described above.

Blood Collection: Infected animals may have 1-2 blood specimens collected (greater than 2 weeks apart) to test for antibody level production to their Cryptosporidium infections (after 14 days of age). A small volume of blood (0.25ml or less than 10-15% body weight) may be obtained by a tail bleed or retro-orbital phlebotomy.

All personnel involved with this project are advised of the infectious nature of Cryptosporidium so they can make an informed consent to work on this project. The potential dangers and risk of infection with working with Cryptosporidium (including high risk to immunocompromised individuals) are explained.

Post-Procedural Details:

Both weight and tail length will be recorded daily until euthanasia. A thermal pad will be used to warm pups during daily measurements.

The endpoint for euthanasia for all of the mice will be defined as a weight loss or dehydration (defined as a loss of >15% of body weight/day for 2 consecutive days). In addition, non-thriving, non-weaned mice (ie. less than 7g) at Day 28 will be euthanized.

Humane Endpoints and Criteria for Euthanasia:

1) Based on both the observations described in the next paragraph, and the ACUC Policy on Establishment of Humane Endpoints, we have developed a Clinical Scoring System. Briefly, Weight loss, Coat, Eyes/Nose, Activity, Posture, and Diarrhea are scored from 0 (good) to 3 (very bad); with Weight loss having an additional category of 4 (greater than 25% loss) and Activity also having a possible score of 4 (complete inactivity). Any animal scoring 14 or higher is euthanized. Any animal with an individual score of 4 in either the Weight loss or Activity Category is euthanized. Written records of these observations will be maintained and referenced with regards to animal welfare concerns.

2) Animal are observed daily by research staff. We have determined that disease severity is dose dependent with an inoculum of 10e3 cfu/ml producing minimal symptoms (light diarrhea). Histological analysis reveals light edema present concomitantly with some neutrophilic invasion and without architectural destruction of cecal or intestinal epithelium. Only rarely does death occur. At 10e4 cfu/ml the death rate is 50%. Animals typically show signs of illness at Day 3 of infection presenting with diarrhea and weight loss. Death usually occurs within 2-3 days. Weight loss and diarrhea alone are not good predictors of death as we have seen mice with severe diarrhea and weight loss of 20% or greater recover. Those mice which will die typically have severe diarrhea coupled with weight loss of 25% or greater, and most importantly, diminished activity. If a mouse exhibits these three qualities (activity level at a minimum, i.e., reluctant to move or demonstrate an inability to stretch body to reach cage top) that mouse is likely to die within 24 hours and so will be euthanized. Mortality rates for mice receiving 10e5 cfu/ml inoculum are approximately 85% with signs of disease evident at day 2 and death by day 4.

3) Research staff will be trained and assisted by vivarium staff and lab techs. In addition, new research staff will be monitored and followed by experienced research staff to guide and teach them how to grade the mice according to the Clinical Scoring System.

4) Euthanasia is the action that will be taken when an endpoint is reached. Any animal scoring 14 or higher on the Clinical Scoring System is euthanized. Any animal with an individual score of 4 in either the Weight loss or Activity Category is euthanized.

Procedural Training:

Circle Warren David Bolick Glynis Kolling John Moore Luther Bartelt

Animal Handler Responsibilities

BARRETT, LEAH ([lib6y](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **03/27/2003**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **07/09/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **03/27/2003**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **06/06/2001**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **06/06/2001**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/27/2006**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **04-27-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

BARTELT, LUTHER ([lab2za](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **04/11/2011**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **04/22/2014**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **04/11/2011**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **04/20/2011**
 LATA - Mouse Training: **04/11/2011**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **04/11/2011**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **04/11/2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **04-20-2011**

UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

BOLICK, DAVID ([dtb5w](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **12/31/2002**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **06/04/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **12/31/2002**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **05/09/2011**
 LATA - Mouse Training: **09/05/2002**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **01/11/2007**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **01/24/2006**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **05-09-2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

CHAPLIN, ASHLEY ([asc9h](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **07/02/2013**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/05/2013**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **07/05/2013**
 LATA - Mouse Training: **07/08/2013**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **07/08/2013**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/01/2013**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-05-2013**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

KOLLING, GLYNIS ([glk3a](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **08/27/2003**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **05/28/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **08/27/2003**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **08/20/2003**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **08/20/2003**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **08/05/2014**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **03-02-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

DE OLIVEIRA ALVES, LUIS ANTONIO, JOHN ([ld7cv](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **08/02/2012**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/16/2012**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **07/11/2012**
 LATA - Mouse Training: **07/16/2012**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **07/16/2012**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/16/2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-24-2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biotechnology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

SMIRNOV, IGOR ([is4b](#))

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **10/06/2010**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **10/16/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **09/09/2010**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **09/15/2010**

LATA - Mouse Training: **09/09/2010**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **09/09/2010**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **03/17/2011**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 2 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

WARREN, CIRLE (ca6)

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **07/15/2005**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: **05/28/2013**
 UVa - Working Safely with Animals Training: **07/15/2005**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: *Required before entering any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 LATA - Mouse Training: **06/08/2000**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **06/08/2000**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **06/08/2005**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **07-22-2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

ZAENKER, EDNA (eiz9c)

ACUC Defined General Requirements
 UVa - Orientation Seminar: **12/04/2012**
 UVa - Animal Handler Refresher Training: Not required, UVa - Orientation Seminar is less than 3-years old
 UVa - Working Safely with Animals Training: **11/15/2012**
 UVa - Animal Facility Rules and Procedures Training: **12/19/2012**
 LATA - Mouse Training: **11/30/2012**
 LATA - Anesthesia and Analgesia of Rodents: **12/02/2012**
 Animal Biosafety Level 2 and/or 3
 UVa - Bloodborne Pathogen and Biosafety Training for Research Personnel: **07/30/2010**
 UVa - Animal Biosafety Level 2 Procedures Training: **12-19-2012**
 UVa - Animal Biosafety Level 3 Procedures Training: *Required before entering any Biosafety Level 3 designated areas of any vivarium at UVa, provided in-person by the vivarium supervisors, unique for each vivarium at UVa.*
 Biomethodology (restraint, blood collection, gavage, and/or injection)
 Breeding Colony Management
 Critical Clinical Monitoring - Non-surgical (Humane Endpoints)
 Euthanasia
 Supervise and/or Train Others

Principal Investigator's Assurance for the Humane Care and Use of Laboratory Animals

1. This protocol will comply with the regulations set forth in the Animal Welfare Act (Public Law 91-579) as amended, the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 2011), PHS Policy (OLAW/NIH, 2002), and the policies and procedures of the University of Virginia Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).
2. All responsibilities for public health hazards and precautions associated with the performance of this protocol rest with the Principal Investigator and his/her department. All biohazardous agents, radioactive materials, and potentially hazardous chemicals used in this animal research protocol have been listed in the protocol.
3. The use of other biological or non-living model systems and alternative methods have been considered in the preparation of this protocol and have been found not to be usable for scientific reasons at this time.
4. All procedures involving live animals will be performed under the supervision of a trained and qualified scientist or their trained and qualified designee.
5. All personnel associated with the research in this protocol are enrolled in the University's health surveillance program for exposure to laboratory animals administered by Occupational Health and Student Health.
6. All personnel associated with the research in this protocol have completed the University's required laboratory animal training program. Certain species and research projects may require additional training as determined by the Institutional Veterinarian or the IACUC.
7. Any variations from the approved protocol **MUST** be submitted to the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) **AND BE APPROVED PRIOR** to their implementation into the experimental paradigm. Examples of such changes include, but are not limited to, changes in:
 - a. USDA category for pain and distress
 - b. Species
 - c. Experimental procedure
 - d. Number of animals
 - e. Acute to chronic experiments
 - f. Personnel
 - g. Post-operative care of animals undergoing survival surgery
 - h. Husbandry
8. The IACUC is required by federal law to inspect all animal facilities and animal procedure areas (including research laboratories) at least twice per year. These inspections may be unannounced and conducted at any time. The PI will make all records available for inspection.

FAILURE TO RECEIVE APPROVAL PRIOR TO MODIFICATION OF EXPERIMENTS INVOLVING LABORATORY

ANIMALS MAY RESULT IN REVOCATION OF THE EXISTING PROTOCOL, LOSS OF ANIMAL USE PRIVILEGES,
AND OTHER DISCIPLINARY ACTIONS AT THE DISCRETION OF THE IACUC.

**** END OF PROTOCOL ****



Intestinal Cell Kinase Is a Novel Participant in Intestinal Cell Signaling Responses to Protein Malnutrition

David T. Bolick^{1,3}, Tufeng Chen^{1,2,3}, Luís Antonio O. Alves^{1,3}, Yixin Tong^{1,3}, Di Wu¹, Linwood T. Joyner II¹, Reinaldo B. Oriá¹, Richard L. Guerrant^{1*}, Zheng Fu^{1*}

1 Department of Medicine, Center for Global Health, Digestive Research Center of Excellence, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, United States of America, **2** Department of Gastrointestinal Surgery, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong, China, **3** Gastrointestinal Surgery Center, Tongji Hospital, Huazhong University of Science & Technology, Hubei, China

Abstract

Nutritional deficiency and stress can severely impair intestinal architecture, integrity and host immune defense, leading to increased susceptibility to infection and cancer. Although the intestine has an inherent capability to adapt to environmental stress, the molecular mechanisms by which the intestine senses and responds to malnutrition are not completely understood. We hereby report that intestinal cell kinase (ICK), a highly conserved serine/threonine protein kinase, is a novel component of the adaptive cell signaling responses to protein malnutrition in murine small intestine. Using an experimental mouse model, we demonstrated that intestinal ICK protein level was markedly and transiently elevated upon protein deprivation, concomitant with activation of prominent pro-proliferation and pro-survival pathways of Wnt/ β -catenin, mammalian target of rapamycin (mTOR), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and protein kinase B (PKB/Akt) as well as increased expression of intestinal stem cell markers. Using the human ileocecal epithelial cell line HCT-8 as an *in vitro* model, we further demonstrated that serum starvation was able to induce up-regulation of ICK protein in intestinal epithelial cells in a reversible manner, and that serum albumin partially contributed to this effect. Knockdown of ICK expression in HCT-8 cells significantly impaired cell proliferation and down-regulated active β -catenin signal. Furthermore, reduced ICK expression in HCT-8 cells induced apoptosis through a caspase-dependent mechanism. Taken together, our findings suggest that increased ICK expression/activity in response to protein deprivation likely provides a novel protective mechanism to limit apoptosis and support compensatory mucosal growth under nutritional stress.

Citation: Bolick DT, Chen T, Alves LAO, Tong Y, Wu D, et al. (2014) Intestinal Cell Kinase Is a Novel Participant in Intestinal Cell Signaling Responses to Protein Malnutrition. PLoS ONE 9(9): e106902. doi:10.1371/journal.pone.0106902

Editor: Michelina Plateroti, University Claude Bernard Lyon 1, France

Received: April 2, 2014; **Accepted:** August 8, 2014; **Published:** September 3, 2014

Copyright: © 2014 Bolick et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Funding: This work was supported by National Institutes of Health grants DK082614 (to Z.F.) and U54 AI057168 and D43 TW006578 (to R.L.G.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: z6fn@virginia.edu (ZF); rlg9a@virginia.edu (RLG)

☞ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Intestinal luminal nutrients constitute the primary stimulus for intestinal growth. Intra-lumen food is capable of stimulating gut mucosal growth either directly through local effect at the site of absorption or indirectly by regulating the release of gut hormones that are important for mucosal growth and repair [1,2]. Starvation is able to cause mucosal atrophy in the small intestine, characterized by diminished intestinal functions as well as altered morphological structures including decreased villous height, crypt depth, surface area, and epithelial cell numbers [3,4]. In response to a nutrient challenge, the small intestine exhibits a remarkable capacity of mucosal adaptation to prevent atrophy and maintain normal mucosal architecture and functions. However, very little is known about the molecular basis underlying the intestinal cellular responses to nutritional stress. Major signaling pathways such as Wnt/ β -catenin [5], PI3K/Akt [6], mTOR/S6K1 [7], and MAPKs [8] govern intestinal cell growth, differentiation, migration and survival in the intestinal mucosa. An intriguing question

that has not been fully addressed is whether and how these crucial signaling cascades respond to nutritional deficiency.

Intestinal cell kinase (ICK) is a newly emerged key component in the intestinal cell signaling network [9,10]. ICK, named after its cloning origin the intestine, is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase in the protein kinome that is closely related to mitogen-activated protein kinases (MAPKs). In the small intestine, ICK mRNA specifically localizes to the crypt region where intestinal stem/progenitor cells and the rapidly replicating transit-amplifying cells reside, implicating an important role for ICK in the regulation of epithelial cell replication and stem cell activities [9]. To support this hypothesis, we have shown that knockdown of ICK expression *in vitro* is able to significantly impair intestinal epithelial cell proliferation [10]. Murine ICK gene encodes a protein of 629 amino acid residues, comprised of a highly conserved N-terminal catalytic domain and a unique long C-terminal domain [11,12]. ICK can be activated by an upstream kinase CCRK (cell cycle-related kinase) through phosphorylation of the essential Thr-157 residue in its MAPK-like TDY motif [11].

The signaling axis of CCRK-ICK plays an important role in the regulation of cell cycle progression at G1 [10,13,14]. However, unlike MAPKs, ICK activity was not acutely stimulated by serum or growth factors [9]. It remains a major question as to what upstream stimuli or environmental cues that may regulate ICK expression and/or activity. The physiologic functions and substrates of ICK in the intestine are still elusive.

We hereby report that nutritional stress as an environmental cue is capable of acutely and transiently regulating ICK protein/activity level. By knocking down ICK expression *in vitro* using lentiviral short-hairpin RNA interference (shRNA), we demonstrated that ICK signaling is important for intestinal cell proliferation and survival through β -catenin-mediated and caspase-dependent pathways, respectively. These results suggest that intestinal epithelial cells may up-regulate ICK signaling pathway as a protective mechanism to limit apoptosis and promote

compensatory growth during intestinal adaptation to protein malnutrition.

Materials and Methods

Animals, Human Cell Lines and Ethics Statement

Animal experiments were carried out according to NIH Animal Welfare Guidelines after approval by the University of Virginia Institutional Animal Care and Use Committee. C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories, Inc. Mice were euthanized in a CO₂ chamber. Human cell lines were purchased from American Culture Type Collection (ATCC) and used in our study after approval by the University of Virginia Institutional Biosafety Committee.

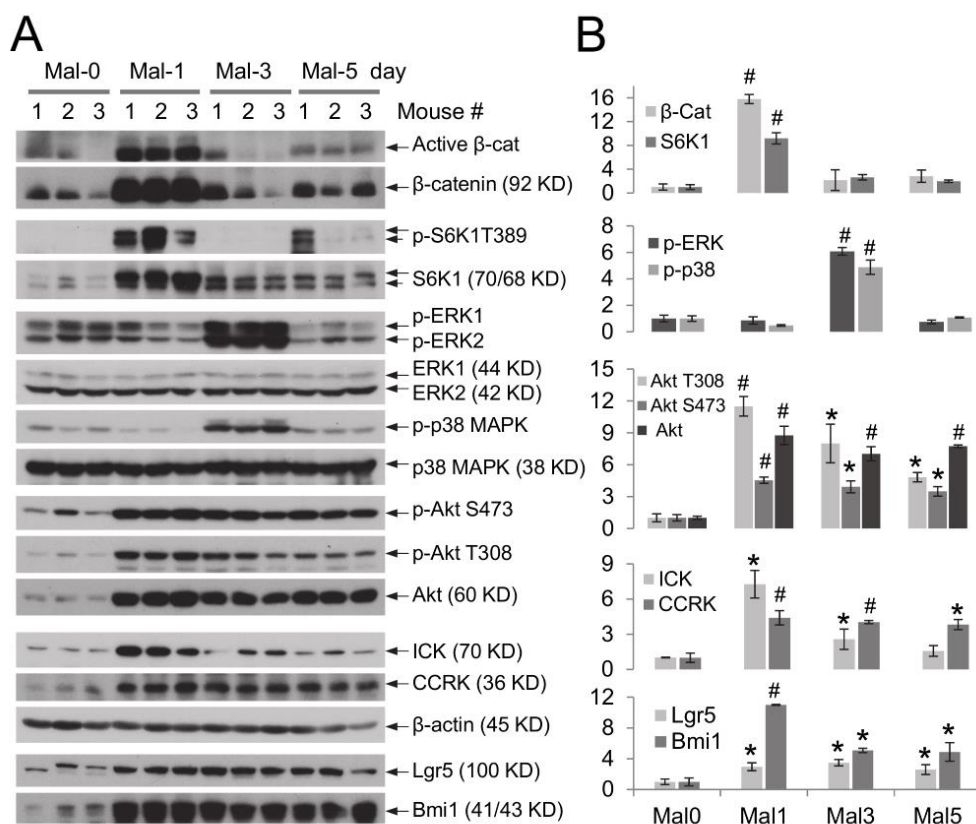


Figure 1. Protein malnutrition induces up-regulation of key signaling pathways that are related to intestinal cell growth and survival. C57BL/6 mice at postnatal day 28 were fed with an isocaloric low-protein (2% protein) diet as compared with the regular diet containing 20% protein for a period of 5 days. (A) Equal amount of total proteins from ileum were Western blotted against antibodies recognizing key components in various signaling pathways as indicated as well as intestinal stem cell markers Lgr5 and Bmi1. The β -actin signal indicates equal loading of total proteins from intestinal tissue extracts. The doublet bands recognized by the S6K1 antibody may represent two alternatively spliced isoforms. (B) After densitometry quantification and normalization against β -actin, the fold change of the protein level relative to the control day zero was shown as mean \pm SE, n=3, *P<0.05, #P<0.01. Similar results were obtained from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0106902.g001

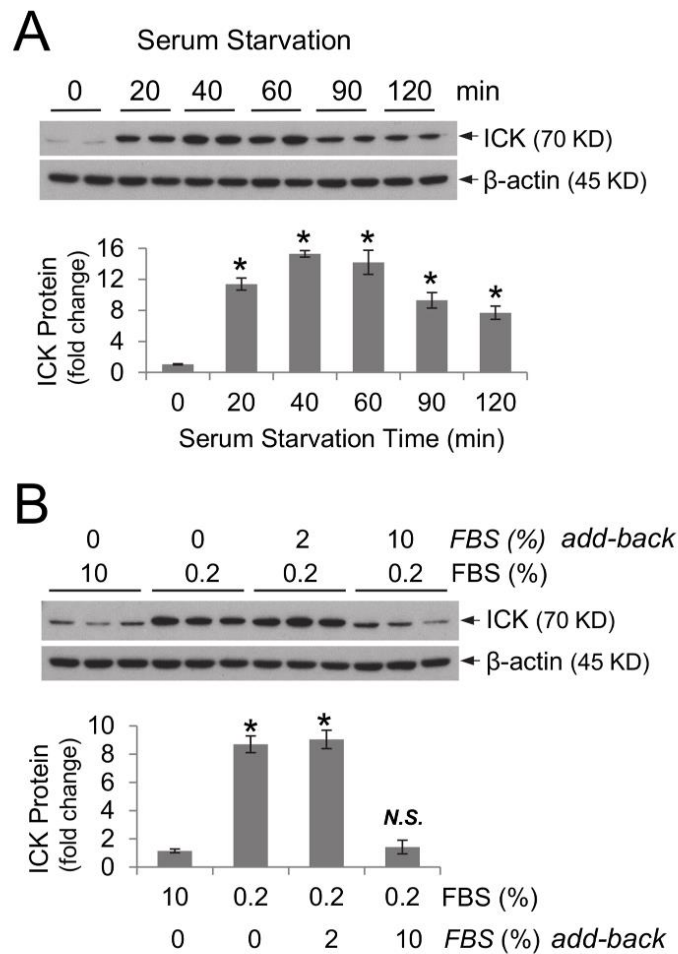


Figure 2. Serum-starvation of HCT-8 ileocecal epithelial cells *in vitro* induces acute up-regulation of ICK protein in a reversible manner. (A) HCT-8 cells were starved in growth medium containing 1% serum for various time points. Equal amount of total proteins from cell extracts were Western blotted against ICK and β -actin antibodies as indicated. After densitometry quantification and normalization against β -actin, the fold change of the ICK protein abundance relative to time zero during serum starvation was shown as mean \pm SE, $n=2$, * $P<0.05$. Similar results were obtained from three independent experiments. (B) HCT-8 cells were grown either in the complete medium containing 10% serum, or in the starvation medium containing 0.2% serum for 40 min, or in the starvation medium for 20 min followed by in the recovery medium containing either 2% or 10% serum for 20 min. Equal amount of total proteins from cell extracts were Western blotted against ICK and β -actin antibodies respectively. After densitometry quantification and normalization against β -actin, the fold change of the ICK protein level relative to the complete medium condition was shown as mean \pm SE, $n=3$, * $P<0.05$, N.S., not significant. Similar results were obtained from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0106902.g002

Protein Malnutrition Animal Model

Mice were acclimated, fed a regular diet for 7 days, and then assigned to experimental groups matched for body weight. At postnatal day 28, mice assigned to the nourished groups received regular chow containing 20% protein whereas mice assigned to the malnourished groups received isocaloric chow containing 2% protein (Harland Labs).

***In Vitro* Malnutrition Model**

The human ileocecal adenocarcinoma HCT-8 cells [15] obtained from ATCC were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2% glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS). For starvation, HCT-8 cells were cultured in DMEM containing 2% glutamine and 0.2%–1% FBS.

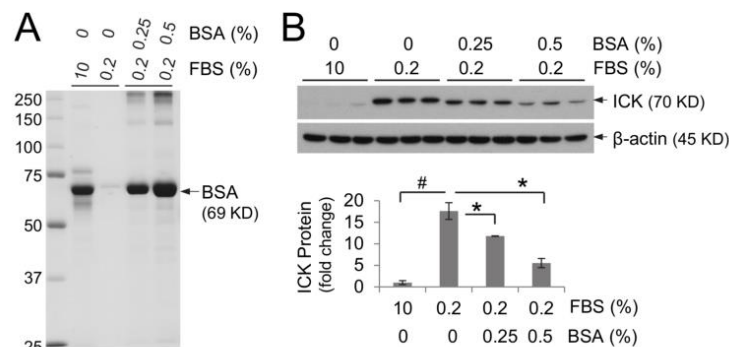


Figure 3. Serum albumin as a supplement to the starvation medium significantly lowered starvation-induced ICK protein level. (A) The albumin protein content from 1 μ l of the complete medium (10% FBS), the starvation medium (0.2% FBS), or the starvation medium supplemented with either 0.25% or 0.5% BSA was analyzed and shown in a Coomassie blue-stained SDS-Gel. (B) HCT-8 cells were grown either in the complete medium containing 10% serum, or in the starvation medium containing 0.2% serum for 40 min, or in the starvation medium for 20 min followed by in the starvation medium supplemented with either 0.25% or 0.5% purified bovine serum albumin (BSA) for 20 min. Equal amount of total proteins from cell extracts were Western blotted against ICK and β -actin antibodies respectively. After densitometry quantification and normalization against β -actin, the fold change of the ICK protein level relative to the complete medium condition was shown as mean \pm SE, n=3, *P<0.05, #P<0.01. Similar results were obtained from two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0106902.g003

Tissue and Cell Extracts Preparation

After rapid dissection of the mouse intestinal tube, intestinal segments were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C , as previously described [16]. Frozen tissues were grinded into fine powders on dry-ice and lysed in RIPA buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) containing protease inhibitors cocktail (Roche) and phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride, 1 μ M microcystin LR, and 5 mM β -glycerophosphate). After serum starvation, HCT-8 cells were lysed directly in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Tissue and cell lysates were cleared by centrifugation, and the supernatant was saved frozen until use for Western blot analysis.

Antibodies

A rabbit polyclonal antibody was raised against the C-terminal peptide (residues 388–400) of mouse ICK, as described in [10]. A rabbit polyclonal antibody was raised against the C-terminal peptide (residues 319–332) of mouse CCRK and used in this study (Genscript). Active β -catenin antibody (clone 8E7) was from Millipore. Anti-GPCR GPR49 (Lgr5) antibody (clone EPR3065Y) was from Abcam. All other antibodies were obtained from Cell Signaling Technology.

Western Blot

Protein extracts were mixed with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, loaded on a SDS-gel, and then transferred to a PVDF membrane for Western blot, as detailed previously in [16]. After blocking for one hour in 5% dry milk, the membrane was incubated with primary antibody (1–2 μ g) in TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% bovine serum albumin for 90 min at room temperature followed by extensive rinses and one-hour incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:10,000). Chemiluminescence signals were developed using Millipore Immobilon ECL reagents.

Lentiviral Short-hairpin RNA Interference

The MISSION TRC ICK shRNA Target Set and the control non-targeting shRNA vector were obtained from Sigma, as described in [10]. Lentivector particles were generated in HEK293T cells as described in [10,11]. Exponentially growing HCT-8 cells at about 50–60% confluence were infected with lentiviruses expressing either the ICK shRNA or the control shRNA for overnight (12–14 hr) before change of medium. Twenty four hours after infection, cells were plated at about $6\text{--}8 \times 10^5$ cells/ml in 10 cm dishes and grown for three to four days in the presence of 5 μ g/ml puromycin. Infected cells were harvested for either determination of viable cell number and apoptosis or for protein extraction.

Determination of Viable Cell Number

Three to four days after infection, unattached cells floating in culture medium and attached cells removed from tissue culture plates by Trypsin-EDTA were pooled and counted using a hemocytometer based on Trypan blue exclusion. The mean cell count of ICK shRNA treated cell culture was plotted as the percentage of the mean cell count of the control shRNA treated cell culture.

Apoptosis Assay by Annexin V Flow Cytometry

Infected HCT-8 cells were pelleted by centrifugation at $300 \times g$ for 5 minutes, washed once with cold PBS, and resuspended in binding buffer. Cells were stained with Annexin V antibody and propidium iodide for 20 minutes according to manufacturer's instructions (BD Biosciences). After gating on the single cell population, 150,000 cells per sample were analyzed. Samples were analyzed at the University of Virginia Flow Cytometry Core using a Becton Dickinson FACSCalibur instrument.

Statistical Analysis

Statistical significance of experimental results was analyzed by Student's *t*-test. Data were presented as means \pm standard error. P-values less than 0.05 were considered as significant.

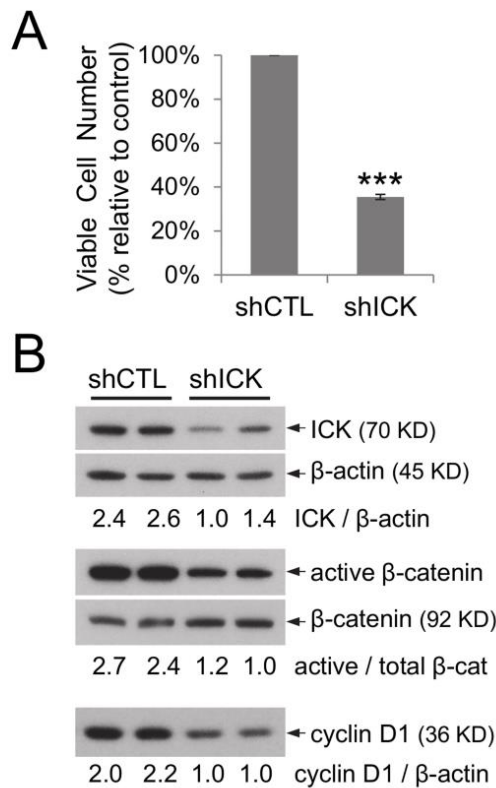


Figure 4. Reduced ICK expression in HCT-8 cells significantly impaired cell proliferation and down-regulated the Wnt/β-catenin pathway. (A) HCT-8 cells were infected with either the ICK-specific shRNA (shICK) or the control shRNA (shCTL). The total viable cell numbers were determined using trypan blue exclusion assay and shown as mean ± SE, n=3, ***P<0.001. Similar results were obtained from two independent experiments. (B) Equal amount of total proteins from cell extracts was used on Western blot against antibodies recognizing ICK, β-actin, β-catenin, active β-catenin, and cyclin D1 as indicated. Western blot signals were quantified using densitometry and shown as the fold change after normalization. doi:10.1371/journal.pone.0106902.g004

Results

Protein malnutrition induced robust and transient up-regulation of key signaling pathways related to intestinal cell proliferation, growth, and survival

In order to gain mechanistic insights into intestinal cell signaling responses and adaptation to nutritional stress, we used a previously established *in vivo* animal model to assess cell signaling responses to protein malnutrition [17]. Weaned C57BL6 mice were fed with either a regular diet (20% protein) or an isocaloric low-protein diet (2% protein) for a period of 5 days. Intestinal tissues were harvested at various time points during protein starvation and assessed for the status of major cell signaling pathways (Wnt/β-catenin, mTOR/S6K1, MAPK, and PI3K/Akt) that are impor-

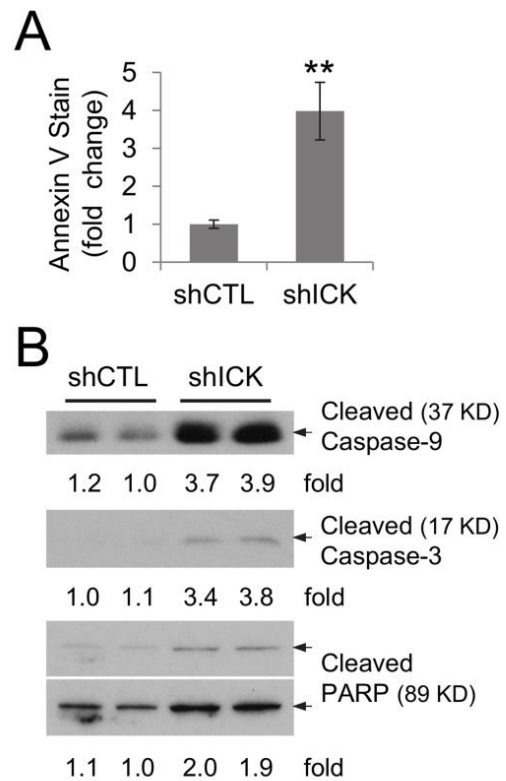


Figure 5. ICK deficiency in HCT-8 cells induced apoptosis via the caspase-dependent mechanism. (A) HCT-8 cells expressing either the ICK-specific shRNA (shICK) or the control shRNA (shCTL) were assessed for the number of apoptotic cells using Annexin V staining. The relative fold change of Annexin V stain-positive cells was shown as mean ± SE, n=4, **P<0.01. Similar results were obtained from two independent experiments. (B) Equal amount of total proteins from cell extracts was used on Western blot against antibodies recognizing key components in the caspase pathway as indicated. Western blot signals were quantified using densitometry and shown as the fold change after normalization. doi:10.1371/journal.pone.0106902.g005

tant for cell proliferation, growth, and survival in the intestinal mucosa.

Cytoplasmic β-catenin lacking phosphorylation at Ser33/37/Thr41 (active β-catenin) is stable and serves as the key downstream effector of the Wnt signal by activating transcription after its nuclear translocation. S6K1 is a key downstream target of mTOR that regulates cell growth and survival. At 24 hours of protein malnutrition, both β-catenin and mTOR pathways in the small intestine were markedly up-regulated, as determined by elevated levels of active β-catenin protein and phospho-S6K1 Thr-389 (mTOR target site) signals (Fig. 1). By day 3 of malnutrition, the signaling activities of β-catenin and mTOR pathways were essentially reduced to the basal level. In comparison, activation of MAPK pathways, indicated by augmented phosphorylation of ERK and p38 MAPK in their activation loops, were not evident until day 3 post protein malnutrition. By day 5, these phospho-

MAPK signals were decreased to the basal level. For the Wnt/ β -catenin and mTOR/S6K1 pathways, changes induced by the low-protein diet occurred primarily at the protein level. In comparison, the alterations in the MAPK pathway in response to protein malnutrition occurred mainly at the phosphorylation-dependent activity level.

The status of the major cell survival pathway PI3K/Akt was also assessed during protein malnutrition (Fig. 1). A significant increase in the total Akt protein level was induced after 24 hours and persisted until day 5 of malnutrition. Activation of Akt/PKB can be regulated through Thr-308 phosphorylation by PDK1 and Ser-473 phosphorylation by mTORC2 [18]. In response to protein starvation, elevated phospho-Akt S473 signal was evident at day 1 and persisted until day 5 of malnutrition, whereas elevated phospho-Akt S308 signal gradually attenuated toward the baseline from day 1 to day 5 of malnutrition. Together, these data suggest that small intestine responded to protein malnutrition by activating major cell proliferation and survival pathways through up-regulation of key signaling components at the protein abundance and/or activity level.

Protein malnutrition triggered a marked, albeit transient, increase in ICK expression and activity, concurrent with elevated expression of intestinal stem cell markers

ICK is a novel component of the intestinal cell signaling network [9]. *In vitro* evidence implicated a supporting role for ICK in intestinal epithelial cell proliferation [10]. The upstream stimulus for ICK expression or activity is completely unknown. Intriguingly, ICK protein level was significantly increased at 24 hours after protein malnutrition, concomitant with elevated expression of intestinal stem cell markers (Lgr5 [19] and Bmi1 [20]) (Fig. 1). However, this increase was greatly attenuated by day 3 and abolished by day 5 of malnutrition. Similar results were shown for CCRK, the upstream activating kinase for ICK, suggesting that both ICK expression and activity can be regulated by protein nutrient status in the small intestine.

A significant increase in the ICK protein level in HCT-8 cells can be acutely induced by serum starvation in a reversible manner

Previously, we have established an *in vitro* model, the human ileocecal epithelial cell line HCT-8, to study the vicious cycle of malnutrition and infection [21]. We hereby used the HCT-8 model to explore the kinetics in nutritional regulation of ICK expression. In response to serum starvation, HCT-8 cells increased ICK protein abundance by about 10 fold within 20 min (Fig. 2A). This dramatic increase, albeit reduced in magnitude at later time points (Fig. 2A), persisted for at least 24 hours during serum starvation (data not shown). Adding back culture medium containing full serum (10% FBS) was able to quickly restore the basal level of ICK protein in HCT-8 cells (Fig. 2B). These data suggest that nutritional regulation of ICK protein abundance is an acute and reversible process.

Serum albumin supplemented to the starvation medium only partially reversed starvation-induced effects on ICK protein

Since starvation, specifically omitting protein from diet, may cause a strong reduction in albumin production [22], we examined whether addition of purified albumin, the most abundant serum protein, in serum-starvation medium is able to restore the ICK protein level in HCT-8 cells. Addition of 0.25% purified bovine serum albumin (BSA) to the starvation medium containing 0.2%

FBS was able to restore the amount of albumin found in the complete medium containing 10% FBS (Fig. 3A). In Figure 3B, the ICK protein level of cells in the starvation medium supplemented with 0.25% and 0.5% BSA decreased by about 30% and 60% respectively as compared with that of cells in the starvation medium alone. This observation implicated albumin as an important, but certainly not the only, factor in the serum that contributes to the regulation of ICK protein abundance. Interestingly, a similar effect on the regulation of ICK protein signals was observed when casein, a major nutrient protein in milk, was added as a supplement to the starvation medium (Fig. S1).

Knockdown ICK expression in HCT-8 cells impaired cell proliferation and down-regulated the canonical Wnt pathway

Why do intestinal epithelial cells up-regulate ICK signals in response to nutritional stress? We hypothesized that elevated ICK signal is one of the protective mechanisms that intestinal cells utilize to promote compensatory cell growth and survival. To test this hypothesis, we infected HCT-8 cells using an ICK-targeted shRNA with validated specificity [10] and assessed the biological effects of ICK knockdown on cell proliferation and survival. Reduced ICK expression led to a 60% decrease in viable cell number (Fig. 4A), associated with a significant down-regulation of the active β -catenin signal and its downstream effector cyclin D1 (Fig. 4B), which was further confirmed by a second ICK-targeted shRNA (Fig. S2). These results indicate that ICK may regulate intestinal cell proliferation through functional interactions with the Wnt/ β -catenin signaling events.

ICK deficiency induced apoptosis by activating the caspase-dependent pathway

We also analyzed whether knockdown of ICK expression induces apoptosis that may contribute to the decreased intestinal cell viability. In Figure 5A, we demonstrated that HCT-8 cells expressing ICK-specific shRNA exhibited an approximately 4-fold increase in the number of apoptotic cells (detected by Annexin V staining) over HCT-8 cells expressing the control shRNA. This increased apoptosis induced by ICK knockdown was associated with a 2 to 4-fold increase in the expression of key components in the caspase pathway, such as cleaved caspase-9, cleaved caspase-3 and cleaved PARP (Fig. 5B). Our data suggest that ICK may promote intestinal cell survival by suppressing the caspase-dependent apoptotic pathway.

Discussion

Nutritional deficiency could induce morphologic, biochemical, and metabolic alterations in humans and in experimental animal models [4,23]. The small intestinal mucosa resists atrophy during protein deprivation for a longer time than most other tissues [24]. Major structural features of the intestinal mucosa, including villous height, crypt depth, epithelia cell number, and allocation of various cell lineages, are minimally, if at all altered (at least initially) by protein deficiency or starvation in experimental murine models [25,26,27,28]. Mechanisms that may account for the preservation of intestinal architecture are not completely understood. Suppression of the normally high and rapid cellular turnover in the intestinal epithelium was observed during starvation [29,30], implicating important roles for compensatory cell growth and survival in nutritional stress resistance. In this report, we provided novel mechanistic insights into the intestinal adaptation to protein malnutrition by showing robust but transient

activation of multiple pro-proliferation and pro-survival pathways concomitant with elevated expression of intestinal stem cells.

The temporal and mechanistic modes of cell signaling responses to protein malnutrition appear to be diverse. Activation of Wnt/ β -catenin, mTOR/S6K1, PI3K/Akt and CCRK/ICK pathways occurred in the early phase, at 24 hours of protein starvation, while activation of ERK and p38 MAPK pathways occurred in the late phase, at 72 hours of protein starvation. Compared with the transient activation of the Wnt/ β -catenin, mTOR/S6K1, MAPKs, and ICK signaling pathways, activation of the PI3K/Akt pathway was sustained for a longer period of time. Mechanistically, activation of these pro-proliferation and pro-survival pathways occurred through either increased protein abundance (e.g. β -catenin, mTOR, ICK, Akt) or elevated phosphorylation of key regulatory sites (e.g. ERK1/2, p38 MAPK).

The rapid increase in ICK protein abundance induced by starvation is not due to enhanced transcription because our quantitative RT-PCR data did not reveal any significant change in the ICK mRNA level during starvation (data not shown). Since the small intestine has a very rapid rate of protein synthesis during normal nutrition and this rate is not markedly reduced during protein depletion [24,31], it is likely that starvation-induced up-regulation of intestinal ICK protein content occurred as a result of increased protein synthesis and/or stability. One candidate gene that may be involved in the regulation of ICK protein degradation/stability is *FBXO9* (F-box only protein 9). *ICK* and *FBXO9* genes are arranged head-to-head on a bidirectional promoter [32]. It was recently discovered that *FBXO9* has a functional role in adipocyte differentiation by serving as an ubiquitination E3 ligase to regulate C/EBP β protein levels during adipogenesis [33]. Further studies will be aimed at investigating whether *FBXO9* interacts with ICK to regulate its protein stability during nutrient starvation.

Our data showing that ICK functionally interacts with Wnt/ β -catenin and caspase pathways provided novel insights into the molecular mechanisms by which ICK regulates intestinal cell proliferation and apoptosis. Currently, the direct downstream substrates of ICK that mediate its cross-talks with either the Wnt/ β -catenin or the caspase pathway are still elusive. It is worthy of pointing out that ICK promoter contains functional binding sites for TCF4 and exogenously expressed β -catenin is able to robustly activate the ICK promoter activity *in vitro* [32]. Therefore, ICK may be a direct transcriptional target of the Wnt/ β -catenin signal. Given our data in this study clearly indicated a negative impact of ICK knockdown on the signals of active β -catenin and its downstream effector cyclin D1, it is conceivable that there may exist a positive feedback regulatory loop between ICK and Wnt/ β -catenin pathways.

In conclusion, our findings have provided novel insights into the molecular mechanisms regulating intestinal adaptation to protein

nutritional stress. We have demonstrated that protein starvation induces strong but transient activation of prominent pro-proliferation and pro-survival pathways concurrent with elevated expression of intestinal stem cells. We also identified a novel signaling module involving functional cross-talks that ICK engages with Wnt/ β -catenin and caspase pathways as an important participant in cell signaling responses to protein malnutrition. Cumulatively, these results suggest that activation of intestinal cell signaling pathways may serve as important molecular triggers for the cellular protective mechanisms underlying resistance to intestinal atrophy.

Supporting Information

Figure S1 Up-regulation of ICK protein induced by serum starvation in HCT-8 cells can be partially reversed by adding casein, a major nutrient source in milk, as the supplement. HCT-8 cells were grown either in the complete medium containing 10% FBS or in the starvation medium containing 0.2% FBS for 40 min, or in the starvation medium supplemented with 0.25% and 0.5% casein for 20 min following starvation for 20 min. Equal amount of total proteins from cell extracts were Western blotted against ICK and β -actin antibodies respectively. After densitometry quantification and normalization against β -actin, the fold change of the ICK protein level relative to the complete medium condition was shown as mean \pm SE, n=3, *P<0.05, #P<0.01. Similar results were obtained from two independent experiments.

(TIF)

Figure S2 Knockdown of ICK in HCT-8 cells induced significant down-regulation of the active β -catenin signal as well as its downstream target cyclin D1. HCT-8 cells were treated with either the control shRNA (shCTL) or the ICK-targeted shRNAs from Sigma MISSION as described in Methods. Equal amount of total proteins from cell extracts were Western blotted against antibodies as indicated. β -actin signal indicates equal loading of total proteins.

(TIF)

Acknowledgments

We dedicate this work to our loving memories of the late Dr. James K. Roche (University of Virginia) who contributed significantly to this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ZF RLG DTB RBO. Performed the experiments: DTB TC LOA YT DW LITJ. Analyzed the data: DTB TC LOA YT DW RBO RLG ZF. Contributed reagents/materials/analysis tools: RLG ZF. Contributed to the writing of the manuscript: ZF RLG.

References

- Jenkins AP, Thompson RP (1994) Enteral nutrition and the small intestine. *Gut* 35: 1765–1769.
- Johnson LR (1988) Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol Rev* 68: 456–502.
- Raul F, Scheffler R (1996) Intestinal adaptation to nutritional stress. *Proc Nutr Soc* 55: 279–289.
- Drozdzowski L, Thomson AB (2006) Intestinal mucosal adaptation. *World J Gastroenterol* 12: 4614–4627.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17: 1709–1713.
- Sheng H, Shao J, Townsend CM, Jr., Evers BM (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. *Gut* 52: 1472–1478.
- Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, et al. (2012) mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to caloric intake. *Nature* 486: 490–495.
- Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 277: G631–641.
- Togawa K, Yan YX, Inomoto T, Slangenaupt S, Rustgi AK (2000) Intestinal cell kinase (ICK) localizes to the crypt region and requires a dual phosphorylation site found in map kinases. *J Cell Physiol* 183: 129–139.
- Fu Z, Kim J, Vidrich A, Sturgill TW, Cohn SM (2009) Intestinal cell kinase, a MAP kinase-related kinase, regulates proliferation and G1 cell cycle progression of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G632–640.

ICK Signaling in Protein Malnutrition

11. Fu Z, Larson KA, Chitta RK, Parker SA, Turk BE, et al. (2006) Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. *Mol Cell Biol* 26: 8639–8654.
12. Fu Z, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Kaldis P, Togawa K, et al. (2005) Activation of a nuclear Cdc2-related kinase within a mitogen-activated protein kinase-like TDY motif by autophosphorylation and cyclin-dependent protein kinase-activating kinase. *Mol Cell Biol* 25: 6047–6064.
13. Liu Y, Wu C, Galaktionov K (2004) p42, a novel cyclin-dependent kinase-activating kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 4507–4514.
14. An X, Ng SS, Xie D, Zeng YX, Sze J, et al. (2010) Functional characterisation of cell cycle-related kinase (CCRK) in colorectal cancer carcinogenesis. *Eur J Cancer* 46: 1752–1761.
15. Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM, Harris JA (1974) Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 52: 1101–1110.
16. Chen T, Wu D, Moskaluk CA, Fu Z (2013) Distinct expression patterns of ICK/MAK/MOK protein kinases in the intestine implicate functional diversity. *PLoS One* 8: e79359.
17. Costa LB, JohnBull EA, Reeves JT, Sevilleja JE, Freire RS, et al. (2011) Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *J Parasitol* 97: 1113–1120.
18. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
19. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, et al. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003–1007.
20. Sangiorgi E, Capecchi MR (2008) *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40: 915–920.
21. Costa LB, Noronha FJ, Roche JK, Sevilleja JE, Warren CA, et al. (2012) Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of *Cryptosporidium* infection and malnutrition. *J Infect Dis* 205: 1464–1471.
22. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR (2000) The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth* 85: 599–610.
23. Tappenden KA (2006) Mechanisms of enteral nutrient-enhanced intestinal adaptation. *Gastroenterology* 130: S93–99.
24. Lipkin M, Quastler H (1962) Studies of protein metabolism in intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 41: 646–653.
25. Hill RB, Jr., Prosper J, Hirschfield JS, Kern F, Jr. (1968) Protein starvation and the small intestine. I. The growth and morphology of the small intestine in weanling rats. *Exp Mol Pathol* 8: 66–74.
26. Sokolovic M, Wehkamp D, Sokolovic A, Vermeulen J, Gilhuijs-Pederson LA, et al. (2007) Fasting induces a biphasic adaptive metabolic response in murine small intestine. *BMC Genomics* 8: 361.
27. Chappell VL, Thompson MD, Jeschke MG, Chung DH, Thompson JC, et al. (2003) Effects of incremental starvation on gut mucosa. *Dig Dis Sci* 48: 765–769.
28. Coutinho BP, Oria RB, Viciara CM, Sevilleja JE, Warren CA, et al. (2008) *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weaning undernutrition intensifies infection. *J Parasitol* 94: 1225–1232.
29. Deo MG, Ramalingaswami V (1965) Reaction of the Small Intestine to Induced Protein Malnutrition in Rhesus Monkeys. A Study of Cell Population Kinetics in the Jejunum. *Gastroenterology* 49: 150–157.
30. Hooper CS, Blair M (1958) The effect of starvation on epithelial renewal in the rat duodenum. *Exp Cell Res* 14: 175–181.
31. Muramatsu K, Sato T, Ashida K (1963) Dietary Protein Level and the Turnover Rate of Tissue Proteins in Rats. *J Nutr* 81: 427–433.
32. Sturgill TW, Stoddard PB, Cohn SM, Mayo MW (2010) The promoter for intestinal cell kinase is head-to-head with F-Box 9 and contains functional sites for TCF7L2 and FOXA factors. *Mol Cancer* 9: 104.
33. Lee KW, Kwak SH, Ahn BY, Lee HM, Jung HS, et al. (2013) F-box only protein 9 is required for adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 239–243.