

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO SALICILATO
DE SÓDIO SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO ATF6: IMPLICAÇÕES SOBRE A RESPOSTA
CELULAR AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

FERNANDA LINS BRANDÃO MÜGGE

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO SALICILATO
DE SÓDIO SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO ATF6: IMPLICAÇÕES SOBRE A RESPOSTA
CELULAR AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Março/2015

FERNANDA LINS BRANDÃO MÜGGE

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO SALICILATO
DE SÓDIO SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO ATF6: IMPLICAÇÕES SOBRE A RESPOSTA
CELULAR AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Março/2015

AGRADECIMENTOS

- À minha mãe e ao Rafa;
- Ao Prof. Aristóbolo Mendes da Silva;
- Aos colegas do Laboratório de Genes Inflamatórios: Isadora, Katheleen, Heliana, Grazielle, Felipe e Brener;
- Aos colegas da Pós-Graduação;
- Ao Prof. Rodrigo Resende do Departamento de Bioquímica – ICB/UFMG, pelo uso do equipamento de PCR Real-time;
- À coordenação e professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do ICB/UFMG;
- Às agências financiadoras, CAPES e FAPEMIG.

RESUMO

Perturbações da homeostase do retículo endoplasmático (RE) levam à ativação do estresse do retículo endoplasmático, que é mediada por três proteínas transmembrana, denominadas PERK, ATF6 e IRE1. Diversas evidências indicam que fármacos anti-inflamatórios não-esteróides de diversas classes, como os salicilatos Aspirina e salicilato de sódio (NaSal) podem afetar a atividade de genes e proteínas relacionadas ao estresse do RE. O tratamento de células com NaSal leva à ativação de PERK, porém não de IRE1, resultando na fosforilação de eIF2 α . Uma vez que o papel de ATF6 nas respostas celulares induzidas pelos salicilatos não foi ainda elucidado, nosso objetivo foi caracterizar a expressão e a atividade de ATF6 em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) tratados com salicilato de sódio. Através de experimentos de RT-qPCR e western blot, a expressão de ATF6 foi investigada após o tratamento das células. Adicionalmente, os níveis de mRNA e de proteína foram avaliados em células deficientes da eIF2 α cinase PERK. Ensaios de gene repórter de luciferase foram empregados para avaliar a atividade transcricional de ATF6 em células tratadas somente com salicilato ou pré-tratadas com salicilato e posteriormente com tunicamicina. Nós observamos que o NaSal induz um aumento na expressão do mRNA e da proteína de ATF6 em células selvagens. Ainda, uma expressão robusta do mRNA de ATF6 foi observada em células deficientes de PERK, apesar de não ter sido observado acúmulo da proteína nessas células. Curiosamente, o aumento dos níveis de mRNA e de proteína não foi acompanhado do aumento da atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com NaSal. Ademais, o pré-tratamento com NaSal levou à inibição da atividade transcricional induzida pela tunicamicina. A avaliação da expressão de genes alvo de ATF6 indica que CHOP e GADD34 têm sua expressão induzida pelo NaSal, porém a expressão dessas moléculas não é dependente de ATF6. Esses resultados fornecem evidências adicionais que os salicilatos exercem efeitos significativos sobre a expressão e ativação de componentes do estresse do RE e nos permitem ainda definir ATF6 como um novo alvo para a ação biológica dos salicilatos.

ABSTRACT

Perturbation of the homeostasis of endoplasmic reticulum (ER) triggers the ER stress response, which is mediated by three ER transmembrane proteins: PKR-like ER kinase (PERK), activation transcription factor (ATF6), and inositol-requiring kinase (IRE1). Accumulating evidence indicates that non-steroidal anti-inflammatory drugs salicylates, such as Aspirin and sodium salicylate (NaSal), affect the activity of genes and proteins implicated in ER stress. NaSal treatment of cells leads to activation of PERK, but not IRE-1, resulting in eIF2alpha phosphorylation. Because the role of ATF6 in the cellular responses induced by salicylates remains elusive, we aimed to characterize the expression and activity of ATF6 after NaSal treatment of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Through RT-qPCR and western-blot studies, the expression of ATF6 was determined upon treatment of cells. In addition, mRNA and protein levels of ATF6 were evaluated in cells lacking eIF2alpha kinase PERK. Luciferase reporter gene assay was used to measure ATF6-dependent gene transcriptional activation in cells that were exposed only to NaSal or pre-treated with NaSal and further treated with tunicamycin. We found that NaSal induced an increase in ATF6 mRNA and protein expression in wild type cells. Interestingly, a robust expression of ATF6 mRNA was observed in PERK-deficient cells, although the protein did not accumulate in these cells. Intriguingly, an increase in ATF6 mRNA and protein levels was not accompanied by ATF6-mediated transcriptional activation, which was otherwise inhibited by NaSal in tunicamycin-treated cells. The analysis of the expression of ATF6 target genes revealed that only CHOP and GADD34 are induced by NaSal, but also that this expression is not ATF6-dependent. These results provide additional evidence of the effects of salicylates in ER stress components, and allow us to define ATF6 as a target for the biological actions of salicylates.

LISTA DE ABREVIATURAS

	Descrição em inglês	Tradução para o português
AAS	-	Ácido acetilsalicílico
AINE	-	Anti-inflamatório não esteroide
ATF6	<i>Activating transcription fator 6</i>	Fator ativador da transcrição 6
BiP/GRP 78	<i>Binding immnoglobulin protein</i>	Proteína ligante de imunoglobulina
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>	Proteína homóloga de C/EBP
COX	<i>Cyclooxygenase</i>	Ciclo-oxigenase
eIF2α	<i>Alpha subunit of mRNA translation initiation factor 2</i>	Subunidade alfa do fator 2 de iniciação da tradução
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum associated degradation</i>	Degradação associada ao retículo endoplasmático
GADD34	<i>Growth arrest and DNA-damage inducible protein 34</i>	Proteína induzida por dano ao DNA e parada de crescimento 34
IRE1	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>	Enzima sequestradora de inositol 1
KO	<i>Knockout</i>	Tipo nocaute
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblastos</i>	Fibroblastos embrionários murinos
NaSal	-	Salicilato de sódio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
PERK	<i>Protein kinase RNA-like ER kinase</i>	Proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático
RE	-	Retículo endoplasmático
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase quantitative PCR</i>	PCR quantitativa em tempo real
TBS	<i>Tris buffered saline</i>	Tampão tris salina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>	Resposta às proteínas mal enoveladas
WT	<i>Wildt type</i>	Tipo selvagem
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>	Proteína ligante do domínio X 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos três ramos da UPR: IRE1, PERK e ATF6.	11
Figura 2: Análise da expressão do mRNA de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.....	28
Figura 3: Expressão do mRNA de ATF6 em MEFs WT e PERK-KO tratados com NaSal.	29
Figura 4: Acúmulo da proteína ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio ou tunicamicina.....	30
Figura 5: Análise da ativação transcricional da região promotora de ATF6 em MEFs WT tratados com NaSal ou tunicamicina.	31
Figura 6: Atividade transcricional de ATF6 em células HEK293 (A) ou MEFs WT (B).	33
Figura 7: Cinética da atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.	34
Figura 8: Avaliação da atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio e em seguida com tunicamicina.	36
Figura 9: Expressão do mRNA de ATF6 em células pré-tratadas com salicilato de sódio e posteriormente tunicamicina.	37
Figura 10: Análise do processamento de XBP-1 induzido pelo tratamento com salicilato e/ou tunicamicina.	39
Figura 11: Expressão de genes alvo de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.	41
Figura 12: Expressão do mRNA de GADD34 induzida pelo salicilato de sódio.	42
Figura 13: Modelo de efeitos do salicilato de sódio sobre ATF6.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O retículo endoplasmático e a resposta a proteínas mal formadas	10
1.1.1 IRE1.....	12
1.1.2 PERK.....	12
1.1.3 ATF6.....	13
1.2 Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais	15
1.2.1 AINEs e estresse do RE.....	16
1.2.1.1 Salicilatos	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Cultura de células	20
3.2 Tratamentos das células.....	21
3.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	21
3.4 RT-PCR e fracionamento em gel de agarose.....	23
3.5 Western Blot.....	23
3.6 Ensaio de atividade de luciferase.....	25
3.7 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Expressão do mRNA de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.....	27
4.2 Acúmulo da proteína de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.....	30
4.3 Análise da ativação transcricional de ATF6 induzida pelo salicilato de sódio	31
4.4 Análise da atividade transcricional de ATF6 induzida pelo tratamento com salicilato de sódio	32
4.4.1 Cinética da atividade transcricional de ATF6 no tratamento com NaSal.....	34

4.5 Análise dos efeitos do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a atividade e a expressão de ATF6 e XBP-1 induzidas pela tunicamicina.....	35
4.5.1 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a atividade transcricional de ATF6 induzida pela tunicamicina	35
4.5.2 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a expressão de ATF6 induzida pela tunicamicina	37
4.5.3 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre o processamento de XBP-1 induzido por tunicamicina	38
4.6 Expressão de genes alvo de ATF6 em células selvagens e deficientes para ATF6 tratadas com salicilato de sódio	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
FIGURAS ANEXAS	52
Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos utilizados	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 O retículo endoplasmático e a resposta a proteínas mal formadas

O retículo endoplasmático (RE) é um local de processamento e enovelamento de proteínas que serão secretadas, transportadas para inserção ou associação às membranas, ou ainda endereçadas a diferentes organelas celulares. Mecanismos celulares como chaperonas e a degradação proteica associada ao RE (ERAD, *Endoplasmic reticulum-associated protein degradation*), que marca as proteínas com ubiquitina para degradação no proteossoma, garantem o correto enovelamento das proteínas. Entretanto, situações de estresse como infecções virais, deficiência de glicose, hipóxia ou perda da regulação de cálcio podem levar a um maior acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do RE, situação conhecida como estresse do RE (Chakrabarti *et al.*, 2011; Cao & Kaufman, 2012).

Perturbações da homeostase do RE levam à ativação da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, *Unfolded protein response*), que é ativada com o objetivo de restaurar a função normal do RE. Três proteínas distintas localizadas na membrana do RE atuam como moléculas chave na sinalização da UPR, a partir das quais vias de sinalização intracelular são iniciadas. O fator de ativação transcricional 6 (ATF6, *activating transcription factor 6*), a enzima sequestradora de inositol 1 (IRE1, *inositol requiring enzyme 1*) e a proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático (PERK, *protein kinase RNA-like ER kinase*) permanecem inativas durante a homeostase do RE, um estado que é estabelecido pela associação de seus domínios luminais à chaperona GRP78, também designada como proteína de ligação à imunoglobulina (BiP, *binding immunoglobulin protein*). BiP pode interagir transientemente com diversas moléculas, sobretudo com polipeptídeos recém sintetizados que são segregados para o interior do RE. Essa afinidade aparentemente indiscriminada de BiP por outras proteínas é, no entanto, um evento molecular crítico para direcioná-las para etapas subsequentes de correto enovelamento e oligomerização (Hetz, 2012).

Quando o estresse do RE é iniciado, BiP logo se dissocia de PERK, IRE1 e ATF6, levando à subsequente ativação de cada um desses três membros (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). PERK e IRE1 são ativados ao se homo-oligomerizarem, o que resulta em seguida em autofosforilação. ATF6, que é encontrado como monômero,

dímero ou oligômero mesmo na ausência de estresse do RE (Nadanaka *et al.*, 2007), sofre processos sequenciais de clivagem proteolítica até a sua ativação.

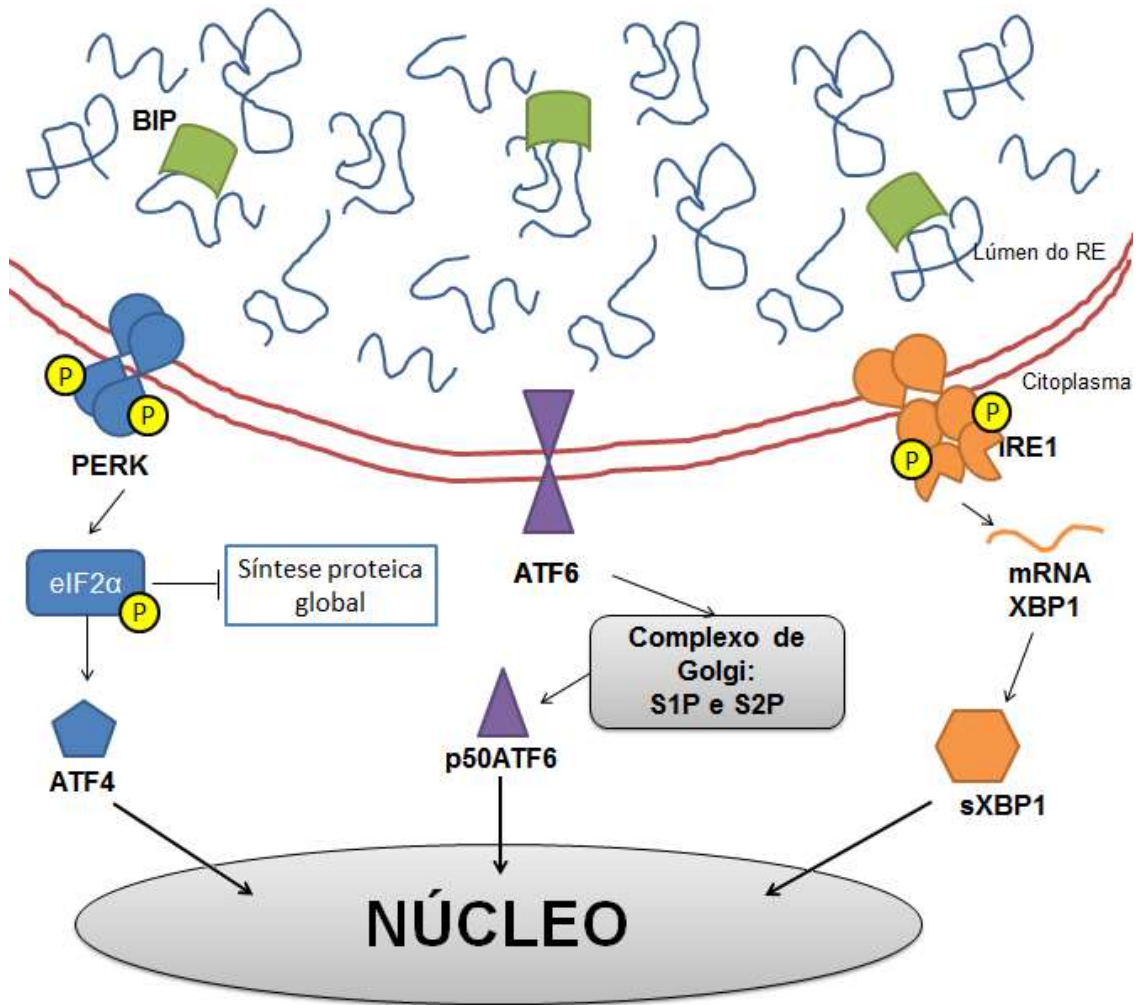


Figura 1: Representação esquemática dos três ramos da UPR: IRE1, PERK e ATF6.

A dissociação de BiP dos domínios luminiais das proteínas sensores do estresse do RE é considerado o evento clássico para a detecção de proteínas mal enoveladas no RE. No entanto, estudos recentes têm fornecido evidências da participação de mecanismos complementares. Um mecanismo molecular alternativo para a detecção do estresse do RE indica que proteínas mal enoveladas podem se ligar diretamente ao domínio luminal de IRE1 e promover a sua dimerização, levando então à ativação das vias de sinalização à jusante iniciadas por essa proteína (Gardner & Walter, 2011; Gardner *et al.*, 2013).

Além desse mecanismo, também foi demonstrado que a modificação da composição lipídica celular também pode levar à ativação da UPR, sendo que PERK e IRE1 possuem a habilidade de detectar perturbações nas membranas celulares. Nesse

processo celular, o mecanismo de ativação desses sensores não depende de seus domínios luminais, mas é promovido pela dimerização aumentada de seus domínios transmembrana (Volmer *et al.*, 2013; Volmer & Ron, 2015).

1.1.1 IRE1

IRE1 está presente em todos os eucariotos, sendo evolutivamente o mais antigo e conservado dos três ramos da UPR. Após a sua oligomerização e autofosforilação, IRE1 é ativado, o que é caracterizado pelas suas atividades de cinase e endoribonuclease (RNase). A atividade endonucleásica de IRE1 promove diretamente o processamento pós-transcricional do mRNA de XBP-1 (*X-box binding protein 1*), no qual ocorre a clivagem de um mini-intron residual de 26 nucleotídeos, que é posteriormente degradado. As extremidades internas 5' e 3' remanescentes e livres do mRNA são ligadas, produzindo a partir dessa ligação uma mudança na janela aberta de leitura (frameshift) e a consequente tradução do mRNA processado. O novo polipeptídeo resultante gera um fator de transcrição (XBP-1s, *spliced XBP-1*), mais estável e ativo que a proteína resultante do mRNA não processado, e que se acumula durante a UPR (Calfon *et al.*, 2002). Quando XBP-1s se liga a elementos da região promotora de genes responsivos ao estresse do RE, a transcrição desses genes é ativada. Esse fator de transcrição possui diversos genes alvo, com função principalmente na restauração da homeostase do RE. A maioria desses genes está envolvida no aumento da capacidade de enovelamento do RE ou associada à degradação de proteínas acumuladas no lúmen dessa organela (Hetz, 2012).

Adicionalmente, IRE1 promove a degradação de mRNAs, em um mecanismo conhecido como diminuição regulada de mRNA dependente de IRE1 (RIDD), que também reduz a síntese de proteínas no RE (Gardner *et al.*, 2013).

1.1.2 PERK

O segundo ramo da via da UPR é mediado pela proteína cinase PERK, que é uma serina/treonina cinase transmembrana do tipo I que, em mamíferos, está presente na maioria dos tipos celulares, com expressão predominante em células pancreáticas (Harding *et al.*, 2001). Após a sua ativação dependente de oligomerização e

autofosforilação, PERK fosforila a subunidade alfa do fator 2 de iniciação da tradução (eIF2 α) que por sua vez leva à inibição da tradução global dos mRNAs. A fosforilação de eIF2 α coincide com o declínio da síntese proteica celular global (Harding *et al.*, 1999). Em situações de estresse como o estresse do RE, esse mecanismo favorece a sobrevivência celular, uma vez que se instala um evento biológico que torna possível às células lidarem com o acúmulo de proteínas mal formadas, sem ocorrer o aumento da quantidade de proteínas presente no interior do RE (Hetz, 2012; Gardner *et al.*, 2013).

O módulo PERK-eIF2 α também contribui para ativação transcricional da UPR. Genes que contêm sítios de entrada interna do ribossomo (IRES, do inglês *internal ribosome entry sites*) na região 5' não traduzida têm, em seus respectivos mRNAs transcritos, um escape do bloqueio da tradução do mRNA causado pela fosforilação do eIF2 α (Chan *et al.*, 2013). Este é o caso do fator de transcrição ATF4, cuja tradução específica de seu mRNA ocorre devido à presença de janelas abertas de leitura à montante do sítio ATG (uORFs, *upstream open reading frames*) e que contribuem para a sua tradução diferencial (Harding *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 2003; Vattem & Wek, 2004; Wek & Cavener, 2007). Assim, o mRNA de ATF4 é seletivamente traduzido à medida em que ocorre a fosforilação de eIF2 α mediada por PERK.

ATF4 ativa a transcrição de vários genes alvo como, por exemplo, GADD34, que codifica a subunidade reguladora de um complexo fosfatase de eIF2 α . Esse fator de transcrição tem a habilidade de estimular funções pró-sobrevivência, como o transporte e síntese de aminoácidos. ATF4 pode também, por outro lado, promover a expressão de fatores pró-apoptóticos, como a proteína homóloga de C/EBP, CHOP (GADD153), que está diretamente associada à morte celular por apoptose (Gardner *et al.*, 2013).

1.1.3 ATF6

ATF6 é uma glicoproteína de 670 aminoácidos e 90 kDa, possuindo duas formas, ATF6 α e ATF6 β , expressas constitutivamente em grande variedade de células de mamíferos. Durante o estresse do RE, ATF6 é translocado da membrana do RE para o complexo de Golgi, onde a porção citossólica N-terminal de ATF6 (designados N-ATF6 ou p50ATF6), contendo aproximadamente 400 aminoácidos, é liberada através de proteólise regulada pelas proteases S1P e S2P. Ao serem translocados para o núcleo,

os fragmentos N-terminal se ligam a elementos responsivos ao estresse do RE como ERSE (*ER stress responsive cis-acting elements*) e ERSE II; UPR (*UPR element*) e UPR II, e assim promovem a ativação transcricional de diversos genes alvo (Yoshida *et al.*, 1998; Yoshida, Matsui *et al.*, 2001; Yoshida, Okada *et al.*, 2001).

N-ATF6 α e N-ATF6 β possuem domínios de ligação ao DNA conservados, localizados próximos à região central de cada proteína. No entanto, a porção N-terminal desses fragmentos, responsável pela ativação transcricional, difere em uma sequência de oito aminoácidos. Essa sequência, responsável pela alta atividade transcricional de N-ATF6 α , está ausente em N-ATF6 β (Thuerauf *et al.*, 2004). A geração de camundongos nocautes para ATF6 α ou ATF6 β revelou que o desenvolvimento desses animais ocorre normalmente na ausência de uma das proteínas, porém o duplo nocaute para ATF6 α e ATF6 β resulta em letalidade embrionária. Estudos realizados em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) deficientes de ATF6 α e ATF6 β revelaram que ATF6 α , mas não ATF6 β , é necessária para ativação transcricional de chaperonas do RE e, ao formar heterodímeros com XBP-1, leva à indução de componentes do ERAD (Yamamoto *et al.*, 2007).

Apesar do desenvolvimento normal de camundongos deficientes de ATF6, alguns estudos sugerem que ATF6 possa ser importante também na manutenção da fisiologia de algumas células e tecidos, mesmo na ausência do estresse do RE. No coração de camundongos, a expressão de dominante negativo de ATF6 leva a modificações na estrutura do órgão, o que resulta em morte por falência cardíaca após 8 semanas de vida desses animais (Toko *et al.*, 2010). Em animais nocautes para ATF6, a injeção intraperitoneal de tunicamicina leva à indução de esteatose hepática, o que não é observado nos animais selvagens (Yamamoto *et al.*, 2010). Em células beta pancreáticas, níveis basais da forma ativa de ATF6, p50ATF6, foram observados, mesmo na ausência de estresse do RE. Além disso, seu *knockdown* resultou em um fenótipo apoptótico, sugerindo um papel para ATF6 na sobrevivência dessas células (Teodoro *et al.*, 2012). ATF6 também se mostrou importante para a sobrevivência de células de melanoma, ao protegê-las da apoptose induzida por tunicamicina ou taspigargina (Tay *et al.*, 2014), e ainda, para a sobrevivência de células endoteliais, ao contribuir para os efeitos pró-sobrevivência do fator VEGF sobre essas células (Karali *et al.*, 2014).

Por outro lado, diferentes estudos também têm demonstrado que ATF6 pode desempenhar papel pró-apoptótico. Em células C2C12 mioblásticas de camundongo, foi observado que a ativação de ATF6 ocorre durante o processo de morte, ao passo que a inibição de ATF6 aumenta a sobrevivência celular (Nakanishi *et al.*, 2005). Ademais, a super expressão de ATF6 e de seu dominante negativo resulta na apoptose por um mecanismo que envolve a inibição específica do fator anti-apoptótico Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*), uma proteína do tipo Bcl-2, por tornar as células mais sensíveis à apoptose (Morishima *et al.*, 2011).

Em células tratadas com substâncias indutoras do estresse do RE, como taspigargina ou tunicamicina, foi observada uma rápida degradação da forma p90ATF6 nas duas primeiras horas após o tratamento, mas que é rapidamente revertida, levando a altos níveis da proteína (Li *et al.*, 2000). Hong *et al.* (Hong, Li *et al.*, 2004) demonstraram que o mecanismo molecular envolvido nessa degradação está relacionado à ubiquitinação de p90ATF6 e sua degradação pelo proteassoma em resposta ao tratamento com esses indutores do estresse do RE. Em outro estudo de Hong *et al.* (Hong, Luo *et al.*, 2004) foi demonstrado que o estado de glicosilação de p90ATF6 pode servir também como um mecanismo sensor da homeostase do RE, podendo resultar na ativação de ATF6 e da UPR. p90ATF6 existe constitutivamente como uma proteína glicosilada, mas após tratamento com tunicamicina uma forma completamente não glicosilada, de migração mais rápida em gel, é observada.

1.2 Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais

Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados para tratar febre, dor e inflamação. O seu mecanismo clássico de ação é a inibição reversível das enzimas ciclo-oxigenase (COX), bloqueando a produção de prostaglandinas (PG) a partir de ácido araquidônico (um lipídio de membrana). O ácido araquidônico é convertido a PGG2 pela COX, que também catalisa a conversão de PGG2 a PGH2. PGH2 pode ser então convertida em outras PGs ou em tromboxano A2 (TXA2) por enzimas específicas. O ácido acetilsalicílico é uma exceção, pois é o único AINE que leva à inibição irreversível de COX por acetilação (Brunton *et al.*, 2011).

Duas isoformas diferentes de COX podem ser moduladas pelos AINEs. A inibição de COX-2 está relacionada aos seus efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios, uma vez que essa enzima é induzida no processo inflamatório. Devido à sua expressão constitutiva, a inibição de COX-1 causa, porém não exclusivamente, os efeitos adversos mais comuns dos AINEs, relacionados principalmente ao trato gastrointestinal. A maioria dos AINEs comercialmente disponíveis é de inibidores não seletivos de COX, atuando então sobre ambas as enzimas (Bacchi *et al.*, 2012).

As diferentes classes de AINEs não são quimicamente relacionadas e, mesmo dentro de um mesmo grupo, algumas modificações moleculares resultam em fármacos com diferentes propriedades farmacológicas, toxicidade e seletividade para COX-1/COX-2.

1.2.1 AINEs e estresse do RE

Diversos fármacos da classe AINEs exercem ações regulatórias sobre componentes proteicos das vias de sinalização envolvidas no estresse do RE. Essas ações também podem ser específicas para tipos celulares diferentes, nos quais uma mesma molécula pode exercer ações antagônicas de ativação ou inibição de um mesmo alvo. As respostas celulares resultantes dessas ações podem ser benéficas, sendo possível a utilização terapêutica desses fármacos, porém pode também resultar em toxicidade (Mügge & Silva, 2015).

1.2.1.1 Salicilatos

Desde a primeira descrição dos efeitos da casca do salgueiro no tratamento da febre de pacientes que sofriam de malária (Stone, 1763) e dos diversos estudos subsequentes relacionados à sua purificação e síntese, os salicilatos têm sido usados no tratamento de diferentes doenças. Além do seu uso mais comum como anti-inflamatório, antipirético e analgésico, eles também são atualmente utilizados na prevenção de doenças cardiovasculares e do câncer (Vainio & Morgan, 1997; Amann & Peskar, 2002).

O protótipo dessa classe, o ácido acetilsalicílico (AAS), é rapidamente metabolizado a ácido salicílico por esterases plasmáticas e celulares, podendo então ser considerado um

pró-fármaco do salicilato. Vane (1971) estabeleceu que a modulação da inflamação pelo AAS ocorre pela inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), o que bloqueia a síntese de prostaglandinas. O salicilato de sódio (NaSal), porém, é um inibidor muito fraco de COX e, mesmo assim, possui atividade anti-inflamatória equivalente à do AAS *in vivo*. Sendo o ácido salicílico o metabólito do AAS, essas evidências indicam a existência de mecanismos moduladores da inflamação independentes de COX (Vane, 1971; Vane & Botting, 2003; Steinberg *et al.*, 2013).

Em vários tipos celulares, inclusive células cancerosas, os salicilatos e outros AINEs inibem a proliferação celular e induzem a apoptose, ações relevantes para sua atividade antitumoral e na prevenção da carcinogênese. Os mecanismos moleculares envolvidos não são completamente conhecidos, sendo que aqueles já propostos são independentes da inibição da COX, que incluem a ativação de caspases, a inibição da atividade de NF- κ B, a regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas, geração de estresse oxidativo e a geração de estresse do RE (Dikshit *et al.*, 2006).

Estudos sobre os efeitos dos salicilatos sobre componentes do estresse do RE tem revelado que esses fármacos afetam a expressão e a atividade de diversas moléculas relacionadas ao estresse do RE (Silva *et al.*, 2007; Alhusaini *et al.*, 2010) e levam à ativação transcricional de diversos genes responsivos ao estresse do RE (Gentz *et al.*, 2013).

Aspirina e salicilato de sódio inibem a síntese proteica em um mecanismo dependente da ativação de PERK e da fosforilação de eIF2 α , o que foi demonstrado em estudo que utilizou fibroblastos embrionários murinos (MEFs) deficientes de PERK. Nos MEFs selvagens, esses dois fármacos induziram uma expressão significativa da proteína CHOP, que estava reduzida nas células PERK $-/-$ também tratados com os fármacos. A degradação de caspase 12 também foi induzida, porém esses fármacos não apresentaram efeito sobre o processamento de XBP-1 mediado por IRE-1 (Silva *et al.*, 2007). Assim, é provável que PERK seja um componente do estresse do RE crítico para a indução de respostas celulares provocadas pelos salicilatos.

Gentz *et al.* (2013) avaliaram o envolvimento de GCN2, uma cinase que fosforila eIF2 α de forma semelhante a PERK, na regulação da apoptose e na expressão de genes de

estresse em células tratadas com salicilato de sódio. Foi demonstrado que a ativação transcricional e a expressão da proteína CHOP e o acúmulo proteico de ATF6 são induzidos por NaSal e dependentes de GCN2 (Gentz *et al.*, 2013).

Em um estudo *in vitro*, foi demonstrado que o salicilato de sódio alivia o estresse do RE ao reduzir a expressão de marcadores como ATF6, CHOP e GRP78 em adipócitos humanos primários tratados com lipopolissacarídeo (LPS), alta concentração de glicose, ácidos graxos saturados ou o indutor de estresse do RE tunicamicina (Alhusaini *et al.*, 2010).

As diversas evidências que demonstram a ativação ou inibição de componentes do estresse do RE por AINEs e especificamente pelos salicilatos indicam o papel dessa via na indução de efeitos citotóxicos e terapêuticos por esses fármacos. Estudos mais aprofundados sobre os mecanismos envolvidos são, portanto, fundamentais para o completo entendimento do seu mecanismo de ação e para permitir o seu uso seguro e mais amplo na prevenção e no tratamento de doenças como o câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a expressão e a ativação do fator de ativação transcricional ATF6 em células tratadas com o anti-inflamatório salicilato de sódio.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar estudos da cinética de expressão do mRNA, do acúmulo proteico e da atividade de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio;
2. Avaliar se a expressão do mRNA, o acúmulo proteico e a atividade de ATF6 nas células tratadas com salicilato de sódio são dependentes da proteína cinase de eIF2 α PERK;
3. Avaliar a expressão do mRNA e a atividade da proteína de ATF6 em resposta à estimulação combinada de salicilato de sódio e agente indutor de estresse do RE;
4. Determinar, em estudos com células selvagens e nocautes para ATF6 tratadas com salicilato de sódio, se a expressão de genes alvos potenciais de ATF6 é dependente de ATF6.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As células utilizadas nesses estudos foram fibroblastos embrionários murinos (MEFs) SV40 imortalizados, WT e KO (para PERK ou ATF6). MEFs SV40 imortalizados WT ou PERK-KO são provenientes do laboratório do Dr. David Ron (New York University, EUA) atualmente na University of Cambridge, Reino Unido (Harding *et al.*, 2000). MEFs SV40 imortalizados WT ou ATF6-KO são provenientes do laboratório do Dr. Randal J. Kaufman (Sanford-Burnham Medical Research Institute, EUA) (Wu *et al.*, 2007). As células foram mantidas em meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's, LGC), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco) e antibióticos (100µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina), em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Para manutenção de estoque das células, as monocamadas com 80 a 90% de confluência eram lavadas com PBS e tripsinizadas, sendo então ressuspensas em soro fetal bovino, e tendo em seguida a adição gota-a-gota de DMSO (Hybri-Max, Sigma), até atingir 10% concentração final. Um mililitro dessa suspensão era distribuída para tubo de congelamento (TPP) que era transferido para um freezer a -70°C. Após 24-48 horas, alguns tubos eram transferidos para botijão de nitrogênio líquido a -196°C, enquanto outros permaneciam no freezer a -70° C.

Todas as células foram testadas para a detecção de micoplasma através da coloração com DAPI e visualização em microscópio de fluorescência. Brevemente, as células eram cultivadas sobre lamínulas circulares e fixadas com paraformaldeído 2%, sendo em seguida coradas com DAPI, corante fluorescente que evidencia o DNA do núcleo da célula e, em caso de contaminação, dos micoplasmas. Culturas de células que estivessem contaminadas com micoplasma foram tratadas com o fármaco antimicrobiano ciprofloxacino, na concentração 10 µg/mL para o controle e eliminação dos micoplasmas.

3.2 Tratamentos das células

A cada experimento uma solução 1 mol/L de salicilato de sódio (Sigma-Aldrich) era preparada em água para injeção estéril. Para isso, o NaSal era pesado em balança analítica de precisão e então diluído com água estéril e livre de pirogênios até completa solubilização. Para esterilização da solução, ela era filtrada em filtro com diâmetro de poro de 0,22 µm, com auxílio de uma seringa, para um recipiente estéril. O volume necessário para se obter uma solução 20 mM era adicionado ao meio previamente presente nas placas de cultura contendo as células.

Para o tratamento com tunicamicina (Sigma-Aldrich), foi preparada uma solução estoque de 0,5 mg/mL em DMSO. O volume necessário para se alcançar a concentração de 1,5 ou 3 µg/mL era adicionado ao meio contido nas placas de cultura de células.

3.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Extração do RNA total

Após o tratamento das células cultivadas em placas de 6 ou 12 poços com NaSal, o meio de cultura era desprezado, e um mililitro do reagente TRIzol (Invitrogen) era imediatamente adicionado por poço. As placas foram armazenadas em freezer a -20° C. Posteriormente, foi seguido o procedimento descrito pelo fabricante do reagente TRIzol. Após descongelamento, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e as amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram realizadas as etapas de separação de fases e obtenção do RNA conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Ao final, o RNA foi solubilizado em água DEPC com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida as amostras foram incubadas a 55° C durante 10 minutos e posteriormente estocadas a -80° C. Para a quantificação do RNA, 1 µL de cada amostra foi analisado em espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences).

Obtenção da primeira fita de cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA, de acordo com instruções do fabricante da enzima MMLV-RT (Invitrogen).

RT-qPCR

Para a reação de RT-qPCR, uma diluição 1:10 da reação da primeira fita de cDNA foi utilizada como DNA molde por reação. A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do Master Mix contendo SYBR Green (Maxima SYBR Green Master Mix, Thermo Scientific) para um volume de 15 µL por reação, tendo sido feitas duas réplicas técnicas para cada amostra. Foram utilizados pares de oligonucleotídeos específicos para os genes alvos ATF6, CHOP, GRP78 e GADD34, e para os genes referência RPL32 e HPRT (ver Tabela 1). As reações foram realizadas em equipamento StepOne Plus (Life Technologies) e as condições térmicas da PCR foram programadas da seguinte maneira: desnaturação inicial 95° C durante 5 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 20 segundos, pareamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. Posteriormente a cada reação foram realizadas as etapas de obtenção da curva de dissociação (*melting curve*) dos oligonucleotídeos utilizados, conforme programação do equipamento.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados

Gene (mRNA)	alvo	Sigla	Sequência (5' – 3')	Eficiência de amplificação
<i>Atf6</i> (ATF6)		QRT-mATF6 FWD2 QRT-mATF6 REV2	TCGCCTTTTAGTCCGGTTCTT GGCTCCATAGGTCTGACTCC	107%
<i>Hspa5</i> (GRP78/BiP)		BiP/GRP78 Forward BiP/GRP78 Reverse	TGGTATTCTCCGAGTGACAGC AGTCTTCAATGTCCGCATCC	Não avaliada
<i>Ddit3</i> (Gadd153/CHOP)		CHOP/GADD153 Forward CHOP/GADD153 Reverse	TGCAGTCATGGCAGCTGAGTC TAGAACTCTGACTGGAATCTG	Não avaliada
<i>Ppp1r15a</i> (Gadd34)		Gadd34 Forward Gadd34 Reverse	ACCATGACTCAGTGCTGTGAC CGCAGCTTCTATCTGATCTGC	Não avaliada
Gene referência		Sigla	Sequência (5' – 3')	
<i>Rpl32</i> (RPL32)		QRT-mRPL32 FWD QRT-mRPL32 REV	GCTGCCATCTGTTTTACGG TGACTGGTGCCTGATGAACT	107%
<i>Hprt</i> (HPRT)		QRT-mHPRT FWD QRT-mHPRT REV	TCAGTCAACGGGGACATAAA GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	96%
<i>Gapdh</i> (GAPDH)		QRT-mGAPDH FWD2 QRT-mGAPDH	TTGTCTCCTGCGACTTCAACA GGTCTGGGATGGAAATTGTGAG	Não avaliada

	REV2		
<i>Atp5b</i> (ATP5b)	QRT-mAtp5b FWD	GGTTCATCCTGCCAGAGACTA	Não avaliada
	QRT-mAtp5b REV	AATCCCTCATCGAACTGGACG	
<i>Cyc1</i> (CYC1)	QRT-mCyc1 FWD	CAGCTTCCATTGCGGACAC	Não avaliada
	QRT-mCyc1 REV	GGCACTCACGGCAGAATGAA	

Validação de genes referência

Os genes RPL32 e HPRT foram escolhidos como genes referência para os experimentos realizados com base nos resultados obtidos em uma validação realizada com esses dois genes e ainda GAPDH, ATP5b e Cyc1. A melhor combinação de genes referência foi determinada através do software NormFinder (Andersen *et al.*, 2004).

3.4 RT-PCR e fracionamento em gel de agarose

Para a realização de RT-PCR 2 µL de cDNA de cada amostra foram adicionados a uma mistura contendo 0,125 µL de enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 2,5 µL de tampão IO 10x (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM (Phoneutria), 0,5 µL de mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) a 10 mM e 16,625 µL de H₂O deionizada autoclavada. Foram adicionados também 1,25 µL de cada oligonucleotídeo relativo à amplificação simultânea das duas formas de XBP-1 (XBP-1 não processado e processado). As misturas foram submetidas a amplificação no termociclador MyCycler (BioRad). Ao final, os amplicons foram fracionados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

3.5 Western Blot

Obtenção dos extratos celulares

Após tratamento com NaSal ou tunicamicina, o meio foi removido e a monocamada de células foi lavada duas vezes com PBS 1X. Foi adicionado então tampão de lise RIPA (150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% Deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 7,4) contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM; Ortovanadato de sódio 2 mM; Pepstatina 1 µg/mL; Aprotinina 2 mg/mL; Leupeptina 1 µg/mL). As placas foram então armazenadas a -20° C. Após o descongelamento, as células foram raspadas das placas e coletadas em tubos de microcentrífuga que foram mantidos em gelo por pelo

menos 30 minutos e vortexados a cada 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 4° C e o sobrenadante foi coletado.

Fracionamento eletroforético e transferência

Para o fracionamento eletroforético das amostras, tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,8 contendo 0,4% SDS; 30% Glicerol; 10% SDS; 6% β -Mercaptoetanol; 1,2% Azul de bromofenol) foi misturado a trinta microgramas dos extratos celulares, que foram aplicados em gel de poliacrilamida a 10% e submetidos à eletroforese a uma tensão de 150 V em tampão Tris-Glicina (Tris base 25 mM pH 8,3; Glicina 250 mM; 0,1% SDS). Ao final da corrida, o gel foi colocado entre um papel Whatmann 3M e a membrana PVDF (Polifluoreto de vinilideno) previamente equilibrada em tampão de transferência. A transferência úmida foi realizada por uma hora sob tensão de 100 V.

Imunoensaio e revelação

Após rinsagem em TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM; 0,1% TweenR 20) a membrana foi incubada em solução de bloqueio (TBS-T contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada a 4° C por 16 horas com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio. Após lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada à temperatura ambiente sob agitação por mais 1 hora com o anticorpo secundário correspondente conjugado com peroxidase e diluído em solução de bloqueio. Para a detecção do anticorpo secundário, a membrana foi transferida para uma placa cassete de raios-X e 1 mL da solução substrato “Pierce® ECL Western Blotting” (Thermo Scientific) foi gotejado sobre ela. Em câmara escura, a membrana foi exposta por diferentes intervalos de tempo que variavam de 30 segundos a 20 minutos a um filme de autorradiografia Kodak T-MAT G/RA Film (Kodak). Após a exposição, o filme foi revelado (nas instalações do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens, ICB/UFMG) utilizando-se as soluções correspondentes.

Anticorpos

Os anticorpos primários específicos utilizados foram: anti-ATF6 (Santa Cruz Biotechnology) e anti- β -actina (Sigma). Os anticorpos secundários utilizados estavam de acordo com a espécie animal em que foram produzidos, podendo ser coelho ou camundongo. Nos immunoblots, os anticorpos primários e secundários foram diluídos

em solução de bloqueio [TBS-T (Tris-HCl 20mM pH 7.6; NaCl 137mM; Tween 0,1%) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado], ou com modificações quando necessárias.

3.6 Ensaio de atividade de luciferase

Para determinar a atividade transcricional de ATF6 por ensaios de gene repórter, foi utilizado o plasmídeo p5xATF6-GL3 (Wang *et al.*, 2000), obtido da Addgene. No dia anterior à transfecção, $0,3 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas em placas de 24 poços. As células foram transfectadas com p5xATF6-GL3 e co-transfectadas com pRL-TK. Dessa forma, a ativação de ATF6 induzida após o tratamento das células com agentes indutores de estresse foi avaliada diretamente nos extratos celulares. O plasmídeo pRL-TK, que contém o gene da luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1, é co-transfectado para a normalização dos resultados. A normalização dos resultados foi determinada pela razão da luminescência do gene repórter da atividade transcricional de ATF6 sobre a luminescência do gene normalizador HSV-TK. As transfecções foram realizadas com polietilenoimina (PEI) na razão 10:1 (microlitros de PEI 1mg/mL : micrograma de DNA plasmideano). Vinte e quatro após a transfecção, as células foram tratadas com salicilato de sódio ou tunicamicina (agente indutor de estresse do RE) por diferentes intervalos de tempo. Em alguns estudos, como no tratamento simultâneo com salicilato de sódio e tunicamicina, as células foram pré-tratadas por uma hora com salicilato de sódio ou tunicamicina, seguido do tratamento por diferentes intervalos de tempo com o outro composto. Ao final dos tratamentos, os sobrenadantes foram descartados e os extratos celulares foram obtidos com Tampão de Lise Passiva 1X (PLB, *Passive Lysis Buffer*), fornecido pelo kit para a realização do ensaio de atividade da luciferase conforme recomendações do fabricante (Sistema Dual-luciferase, Promega). Para medir a atividade da luciferase, 20µl do extrato celular foram transferidos para uma placa de 96 poços (FluoroNuncMaxiSorp, Nunc), onde foi adicionado o reagente Luciferase Assay Reagent II (LAR II), seguido da captura da luminescência em luminômetro (Lumicount-Packard). Posteriormente, foram adicionados 40µl do substrato da *Renilla*, realizando-se também captura e registro dos valores.

3.7 Análise estatística

A análise de variância ANOVA foi utilizada para determinação a significância estatística dos diferentes tratamentos empregados. O nível de significância de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão do mRNA de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio

A caracterização da expressão de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio, primeira parte do objetivo geral deste trabalho, foi realizada com estudos da análise quantitativa dos níveis do mRNA de ATF6 em experimentos de RT-qPCR. O par de oligonucleotídeos de ATF6 utilizado foi obtido no banco de oligonucleotídeos da Universidade Harvard (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) e análises de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmam que o par escolhido é específico para ATF6 α . A curva de dissociação pode ser visualizada na seção Figuras Anexas.

Inicialmente, em MEFs selvagens, foram realizados estudos de cinética e dose resposta após o tratamento com NaSal (Figura 2 A e B, respectivamente). Foi observado que o aumento dos níveis do mRNA de ATF6 é induzido de modo tempo e dose dependente em resposta ao tratamento com NaSal. No estudo de cinética, observa-se que ocorre acúmulo do mRNA já a partir de duas horas de tratamento com NaSal 20 mM, sendo observado o maior acúmulo após 12 horas de tratamento. A fim de determinar o efeito de diferentes concentrações de salicilato de sódio sobre a expressão de ATF6 realizamos também um estudo de dose-resposta. Para tanto, elencamos o intervalo de tempo de 12 horas de tratamento, uma vez que a expressão máxima de ATF6 ocorreu neste tempo, conforme demonstrado previamente. Observamos que a concentração mínima necessária para induzir um aumento na expressão do mRNA foi 5 mM, sendo esse acúmulo crescente até a dose de 20 mM.

Ao examinar a expressão de ATF6 nas células nocautes para PERK (Figura 2 C), observamos que também ocorre o acúmulo do mRNA após tratamento com NaSal 20 mM nos tempos de 4, 12 e 24 horas. Entretanto, de forma surpreendente, foi notório que esse acúmulo é robusto e significativamente maior do que o observado nos MEFs WT em todos os tempos estudados. Esses resultados sugerem que PERK desempenha um papel de regulação negativa sobre a expressão de ATF6 induzida por salicilato de sódio. Essa observação é corroborada pela demonstração comparativa, neste mesmo experimento, que como esperado, a expressão do mRNA de ATF6 em células

submetidas ao estresse do RE induzido por tunicamicina é dependente de PERK (Teske *et al.*, 2011).

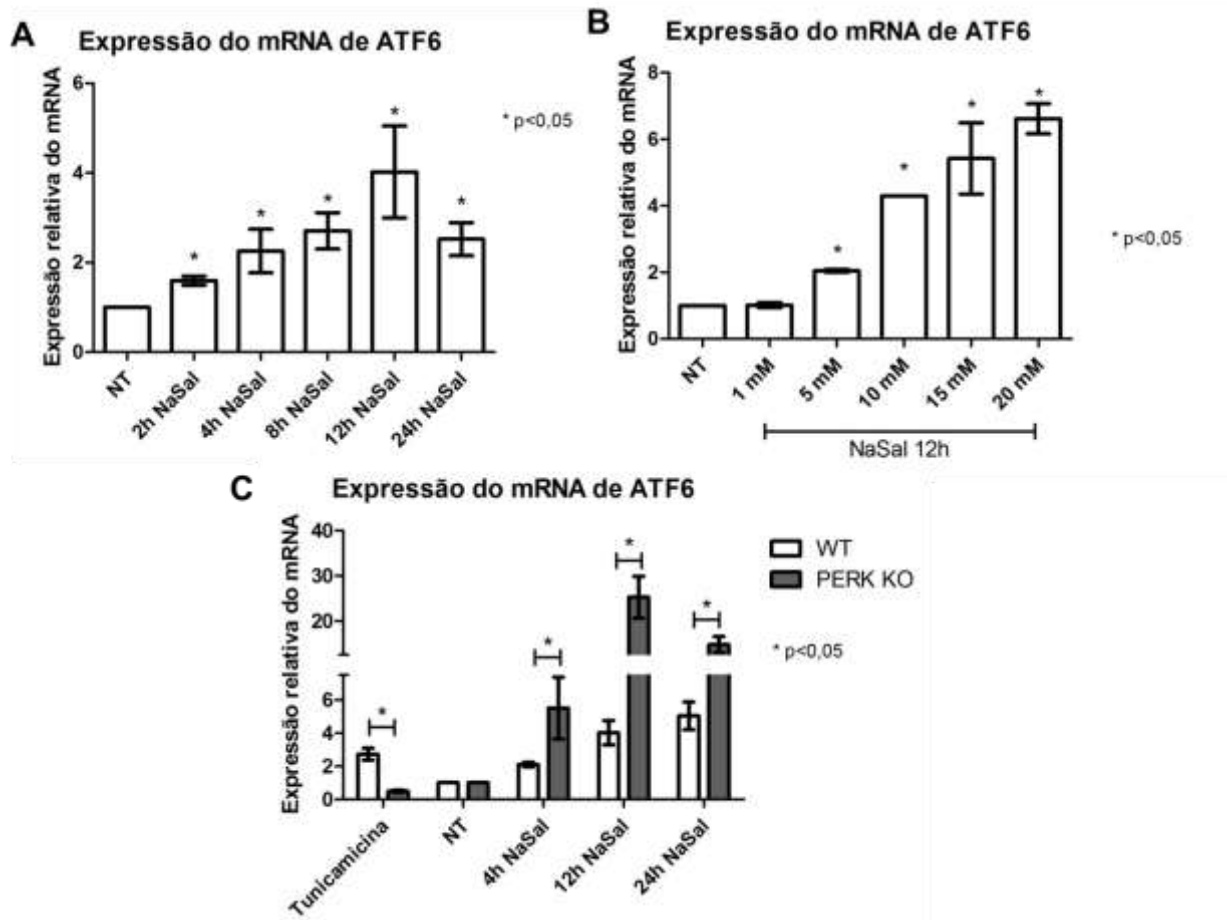


Figura 2: Análise da expressão do mRNA de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.

(A) MEFs foram tratados com NaSal 20mM nos tempos indicados ou com diferentes concentrações por 12 horas (B). (C) MEFs WT e PERK-KO foram tratados com tunicamicina (1,5ug/mL) por 8 horas ou com NaSal 20mM nos tempos indicados. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA de ATF6. A expressão relativa do mRNA de ATF6 foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando RPL32 como gene normalizador.

Na Figura 3 A está representado um segundo experimento dos estudos de expressão do mRNA de ATF6 em MEFs WT e PERK-KO. Ao calcularmos a razão (*fold*) entre os valores de expressão relativa do mRNA de ATF6 em MEFs PERK-KO e dos MEFs WT, obtivemos o gráfico representado na Figura 3 B, que demonstra que a diferença de expressão do mRNA de ATF6 entre as células WT e PERK-KO ocorre no intervalo de tempo de 8 horas de tratamento com NaSal, sendo cerca de 6 vezes mais abundante nas células PERK-KO.

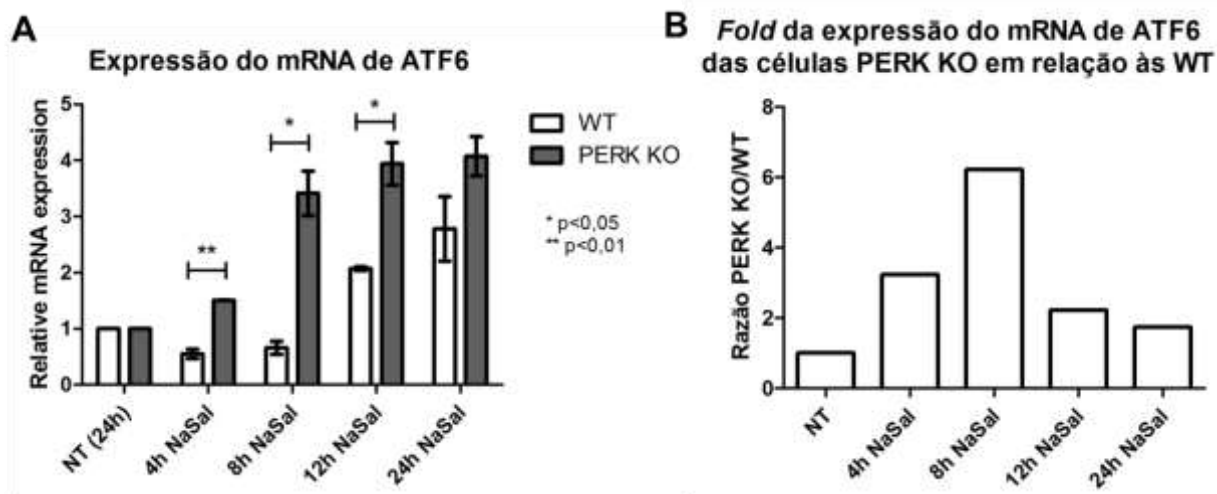


Figura 3: Expressão do mRNA de ATF6 em MEFs WT e PERK-KO tratados com NaSal.

(A) MEFs WT e PERK-KO foram tratados com tunicamicina (1,5ug/mL) por 8 horas ou com NaSal 20mM nos tempos indicados. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA de ATF6. A expressão relativa do mRNA de ATF6 foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando RPL32 como gene normalizador. (B) Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das células PERK-KO foram divididos pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das células WT para cálculo da razão (*fold*) da expressão de ATF6 entre as duas células.

4.2 Acúmulo da proteína de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio

Baseado nos resultados obtidos dos estudos de análise da expressão do mRNA de ATF6 induzida por NaSal, o próximo passo foi avaliar o acúmulo da proteína ATF6 nos MEFs selvagens e nocautes para PERK. Como mostra a Figura 4, o acúmulo de ATF6 (90 kDa) ocorre nos tempos de 4 e 8 horas de tratamento com NaSal 20 mM nas células selvagens. Porém, nas células deficientes de PERK, tal acúmulo não ocorre, tendo níveis semelhantes àqueles observados nas células não tratadas. O mesmo é observado no controle com tunicamicina 1,5 µg/mL.

No experimento realizado, observamos nos MEFs WT que, além da massa molecular de 90 kDa esperada para ATF6, o anticorpo anti-ATF6 utilizado também detecta o acúmulo de um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 70 kDa. A observação dessa massa molecular de 70 kDa de ATF6 já foi previamente descrita na literatura (Luo & Lee, 2002). Ademais, é interessante notar que, da mesma forma que o polipeptídeo de 90-kDa, não ocorre o acúmulo de 70-kDa nos MEFs PERK-KO.

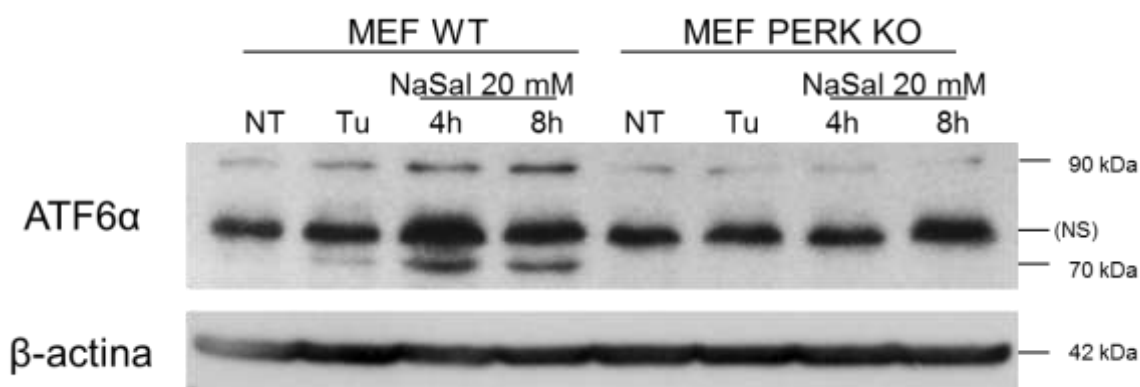


Figura 4: Acúmulo da proteína ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio ou tunicamicina.

MEFs WT ou PERK-KO foram plaqueados e tratados com NaSal 20 mM por 4 e 8 horas ou tunicamicina 1,5 µg/mL por 8 horas. O extrato celular total foi obtido com tampão de lise RIPA e 30 µg de extrato foram fracionados em gel de poliacrilamida 10%. Após transferência para membrana de PVDF foi feita a incubação com anticorpo anti-ATF6 e posteriormente, após *stripping*, com anticorpo anti-β-actina.

4.3 Análise da ativação transcricional de ATF6 induzida pelo salicilato de sódio

Como apresentado anteriormente, conseguimos demonstrar o efeito do salicilato de sódio sobre a expressão do mRNA e da proteína de ATF6. Com o objetivo de avaliar a ativação transcricional de *Atf6* em resposta ao tratamento com NaSal, realizamos um estudo de gene repórter da luciferase utilizando o plasmídeo denominado p1052 (Teske *et al.*, 2011), o qual contém a região promotora do gene *Atf6* murino. Nesse trabalho em que o segmento genômico correspondente à região promotora de *Atf6* foi clonado e caracterizado, os autores demonstraram que ao utilizar o plasmídeo repórter p1052, a tunicamicina foi capaz de induzir a ativação transcricional de *Atf6*, da mesma forma como demonstramos na Figura 5. No entanto, nos tratamentos com NaSal nos intervalos de tempo de 4 e 8 horas, não observamos ativação transcricional de *Atf6* (Figura 5).

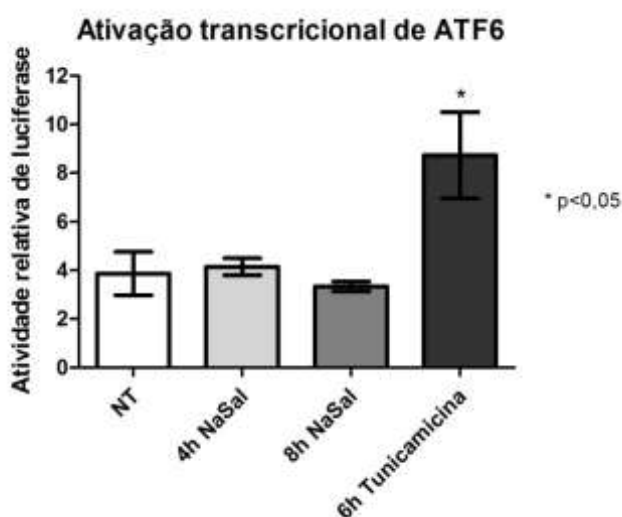


Figura 5: Análise da ativação transcricional da região promotora de ATF6 em MEFs WT tratados com NaSal ou tunicamicina.

MEFs WT foram plaqueados e, após 16 horas, transfectados com os plasmídeos p1052 e pLR-TK. As células foram tratadas 24 horas após a transfecção com NaSal 20 mM pelos tempos de 4 e 8 horas e com tunicamicina 1,5 µg/mL pelo tempo de 6 horas. O extrato celular foi obtido com o *Passive Lysis Buffer* do kit Dual Luciferase (Promega) e as leituras de atividade de luciferase foram realizadas conforme instruções do fabricante. A atividade relativa da luciferase foi calculada pela razão entre as leituras de luciferase do vagalume (p1052) pelas leituras de luciferase da *Renilla* (pLR-TK).

4.4 Análise da atividade transcricional de ATF6 induzida pelo tratamento com salicilato de sódio

Por ser um fator de transcrição, ATF6 apresenta a habilidade de se ligar a elementos regulatórios presentes em genes responsivos ao estresse do RE. Uma vez que observamos que NaSal induz a expressão de ATF6 assim como o seu acúmulo proteico, decidimos avaliar a atividade transcricional de ATF6 em MEFs transfectados com gene repórter da luciferase contendo cinco cópias de sítios de ligação a ATF6, o p5xATF6-GL3 (Wang *et al.*, 2000), e que foram posteriormente tratados com NaSal. Quando células transfectadas com esse plasmídeo são tratadas com um agente indutor de estresse de RE, ocorrerá o acúmulo da forma p50ATF6 de ATF6 que, por sua vez, se liga aos sítios de ligação de ATF6 clonados no plasmídeo pGL3-basic. Com isso, de forma proporcional à quantidade de ATF6 ativo presente na célula, deverá ocorrer a síntese da proteína luciferase, refletindo assim a atividade transcricional de ATF6.

Inicialmente, a atividade transcricional de ATF6 foi testada em células HEK293 que foram transfectadas com p5xATF6-GL3 e posteriormente tratadas com NaSal ou tunicamicina. Como pode ser observado, o tratamento de células HEK293 (Figura 6) com tunicamicina resultou na indução da atividade transcricional de ATF6. No entanto, nas células HEK293 que foram tratadas com salicilato de sódio nos tempos de 4 e 8 horas, não ocorreu essa indução (Figura 6).

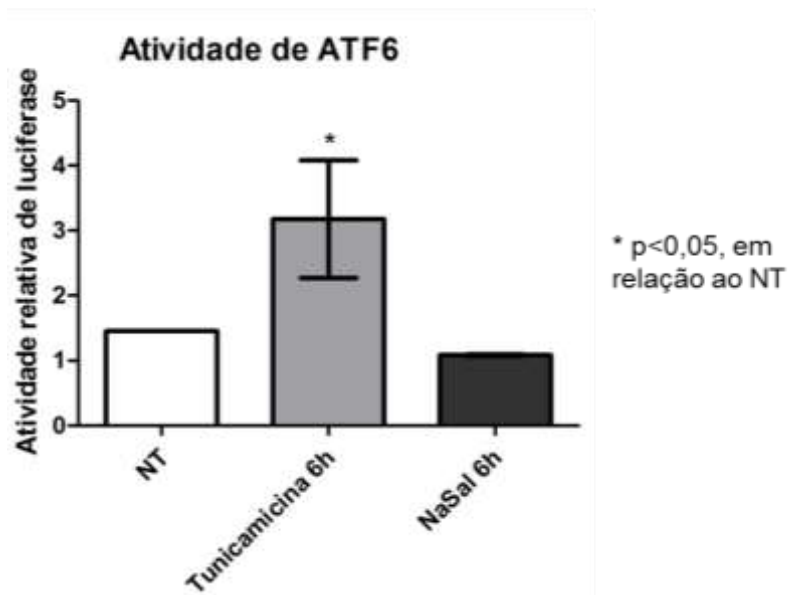


Figura 6: Atividade transcricional de ATF6 em células HEK293 (A) ou MEFs WT (B). Células HEK293 (A) ou MEFs WT (B) foram plaqueadas e, após 16 horas, transfectados com os plasmídeos p5xATF6-GL3 e pLR-TK. As células foram tratadas 24 horas após a transfecção com NaSal 20 mM ou com tunicamicina 1,5 µg/mL pelo tempo de 6 horas (A) ou somente com tunicamicina nas concentrações 1,5 µg/mL ou 3,0 µg/mL (B). O extrato celular foi obtido com o *Passive Lysis Buffer* do kit Dual Luciferase (Promega) e as leituras de atividade de luciferase foram realizadas conforme instruções do fabricante. A atividade relativa da luciferase foi calculada pela razão entre as leituras de luciferase do vagalume (p5xATF6-GL3) pelas leituras de luciferase da *Renilla* (pLR-TK).

4.4.1 Cinética da atividade transcricional de ATF6 no tratamento com NaSal

Examinando especificamente o efeito do salicilato de sódio sobre a atividade transcricional de ATF6 em MEFs WT e PERK-KO, observamos que em ambas as células tratadas com NaSal 20 mM não houve indução da atividade transcricional de ATF6 nos intervalos de tempo de 4 e 8 horas (Figura 7). Nas células tratadas com tunicamicina, a atividade transcricional de ATF6 é reduzida nas células PERK-KO, o que está de acordo com a observação de níveis mais baixos da proteína ATF6 nas células deficientes de PERK após o tratamento com tunicamicina e de dados da literatura (Teske *et al.*, 2011).

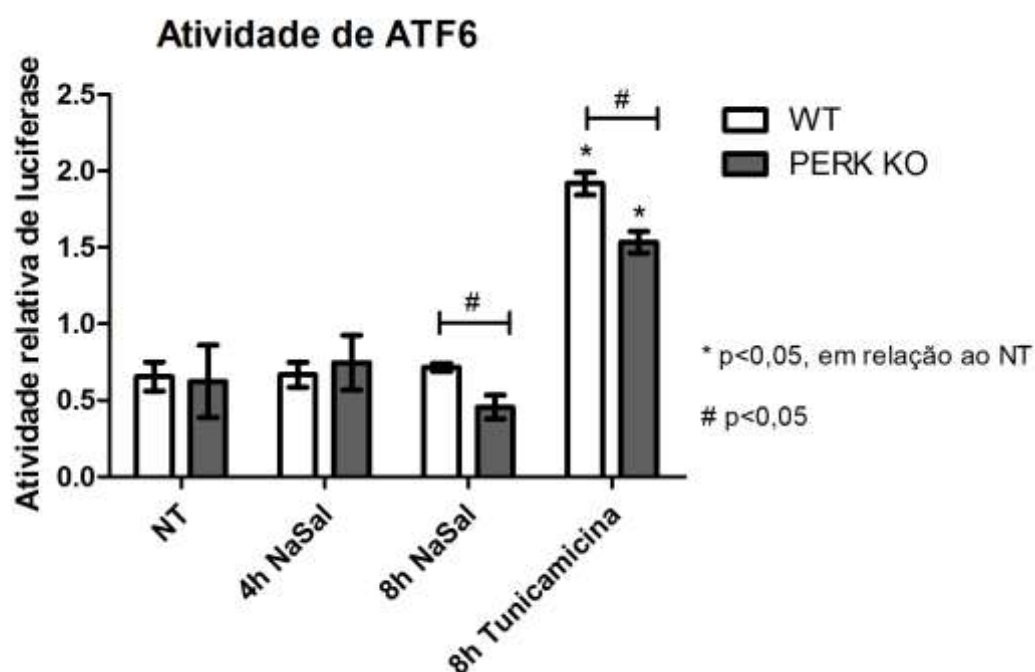


Figura 7: Cinética da atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.

MEFs WT ou PERK-KO foram plaqueados e, após 16 horas, transfectados com os plasmídeos p5xATF6-GL3 e pLR-TK. As células foram tratadas 24 horas após a transfecção com NaSal 20 mM pelos tempos de 4 e 8 horas ou com tunicamicina 1,5 µg/mL pelo tempo de 8 horas. O extrato celular foi obtido com o *Passive Lysis Buffer* do kit Dual Luciferase (Promega) e as leituras de atividade de luciferase foram realizadas conforme instruções do fabricante. A atividade relativa da luciferase foi calculada pela razão entre as leituras de luciferase do vagalume (p5xATF6-GL3) pelas leituras de luciferase da *Renilla* (pLR-TK).

4.5 Análise dos efeitos do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a atividade e a expressão de ATF6 e XBP-1 induzidas pela tunicamicina

4.5.1 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a atividade transcricional de ATF6 induzida pela tunicamicina

Para analisar o efeito da pré-exposição das células ao NaSal sobre a atividade de ATF6 induzida por tunicamicina, as células que foram transfectadas com p5xATF6-GL3 foram pré-tratadas com NaSal por uma hora, seguindo-se então a adição de tunicamicina ao meio de cultura por diferentes intervalos de tempo, mantendo-se o tratamento combinado pelo tempo de 6 horas. Como pode ser observado na Figura 8, quando as células foram tratadas apenas com tunicamicina foi observada a ativação de ATF6. Curiosamente, foi observado que a pré-exposição das células ao NaSal prejudica a atividade de ATF6, uma vez que houve uma redução significativa da atividade de ATF6 induzida pela tunicamicina no tempo estudado. Esses resultados indicam que a atividade transcricional de ATF6 induzida por tunicamicina é inibida por NaSal.

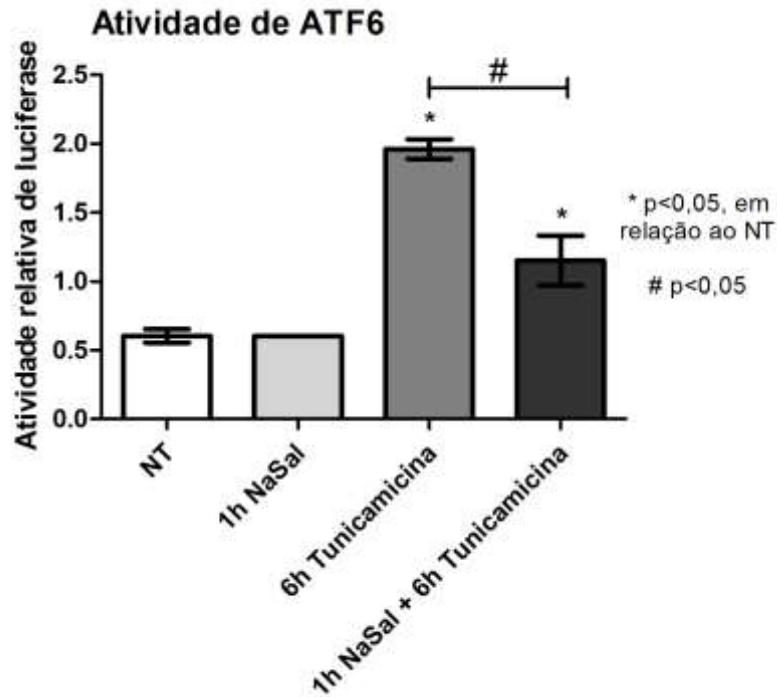


Figura 8: Avaliação da atividade transcricional de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio e em seguida com tunicamicina.

MEFs WT foram plaqueados e, após 16 horas, transfectados com os plasmídeos p5xATF6-GL3 e pLR-TK. As células foram tratadas 24 horas após a transfecção; inicialmente foi realizado o pré-tratamento com NaSal 20 mM por 1 hora e posteriormente tunicamicina 1,5 µg/mL foi adicionada ao meio de cultura e o tratamento foi mantido por mais 6 horas. Em outro poço da placa as células foram tratadas somente com tunicamicina 1,5 µg/mL por 6 horas. O extrato celular foi obtido com o *Passive Lysis Buffer* do kit Dual Luciferase (Promega) e as leituras de atividade de luciferase foram realizadas conforme instruções do fabricante. A atividade relativa da luciferase foi calculada pela razão entre as leituras de luciferase do vagalume (p5xATF6-GL3) pelas leituras de luciferase da *Renilla* (pLR-TK).

4.5.2 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre a expressão de ATF6 induzida pela tunicamicina

Ao avaliarmos a expressão de ATF6 nas células que foram pré-tratadas com NaSal e posteriormente tratadas com tunicamicina, foi verificado que não há diferenças significativas na expressão do mRNA de ATF6 (Figura 9) induzida pelo tratamento com NaSal ou tunicamicina na presença ou ausência de NaSal, no tempo de 6 horas. Esses resultados indicam que o NaSal não interfere na expressão de ATF6 induzida por tunicamicina, sugerindo que a inibição da atividade transcricional de ATF6 causada pelo NaSal envolve um mecanismo independente da redução dos níveis de ATF6 nas células.

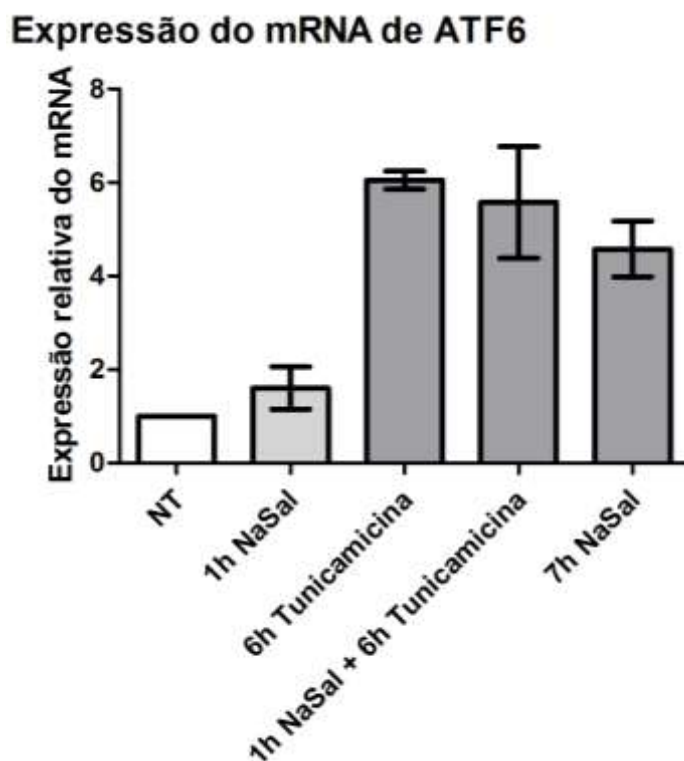


Figura 9: Expressão do mRNA de ATF6 em células pré-tratadas com salicilato de sódio e posteriormente tunicamicina.

MEFs WT foram inicialmente pré-tratados com NaSal 20 mM por 1 hora e posteriormente tunicamicina 1,5 µg/mL foi adicionada ao meio de cultura e o tratamento foi mantido por mais 6 horas. Foram também realizados tratamentos com NaSal 20 mM por 1 e 7 horas. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA de ATF6. A expressão relativa do mRNA de ATF6 foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando RPL32 como gene normalizador.

4.5.3 Efeito do pré-tratamento com salicilato de sódio sobre o processamento de XBP-1 induzido por tunicamicina

Já foi demonstrado na literatura que ATF6 e XBP-1 podem formar dímeros e atuar conjuntamente na ativação transcricional de diferentes genes alvo durante o estresse do retículo endoplasmático (Yamamoto *et al.*, 2007). Embora o NaSal não exerça efeitos sobre o processamento do mRNA de XBP-1 mediado por IRE-1 (Silva *et al.*, 2007), que é um evento marcante do estresse do RE, já foi observado que a expressão de XBP-1 pode ser induzida por NaSal (Gentz *et al.*, 2013). No entanto, XBP-1 exerce sua função como fator de transcrição após seu mRNA sofrer processamento pela atividade endonucleásica de IRE-1 durante o estresse do RE. Assim, decidimos avaliar se o NaSal pode interferir no processamento de XBP-1 induzido por tunicamicina.

Para brevemente explicar como é realizada essa análise, o processamento de XBP-1 pode ser visualizado em gel de agarose 3%, concentração na qual a forma processada (amplicon de 574-pb) pode ser separada da forma não processada (amplicon de 600-pb) devido à diferença de tamanho das duas formas (26 nucleotídeos). Portanto, na Figura 10 é possível observar que o tratamento com salicilato de sódio no intervalo de tempo testado não induz o processamento de XBP-1, corroborando observações já publicadas (Silva *et al.*, 2007). No entanto, quando as células são tratadas por 6 horas com tunicamicina, observa-se a amplificação predominante da forma processada. Nas células que foram previamente tratadas com NaSal seguido do tratamento com tunicamicina, observa-se que não há diferenças significativas no processamento de XBP-1 entre o tratamento apenas com tunicamicina e o tratamento com tunicamicina nas células que foram expostas previamente ao NaSal. Esses resultados indicam que o NaSal não afeta o processamento de XBP-1 induzido durante o estresse do RE.

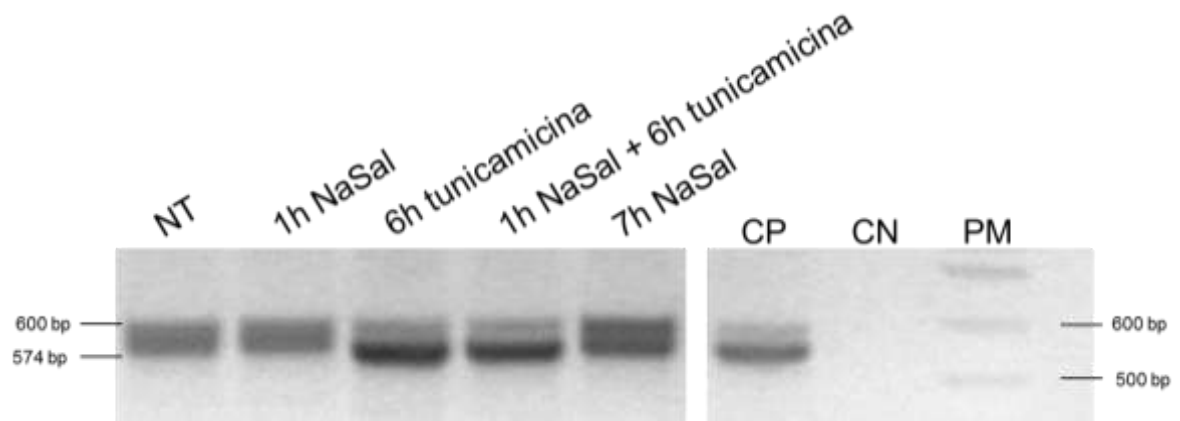


Figura 10: Análise do processamento de XBP-1 induzido pelo tratamento com salicilato e/ou tunicamicina.

MEFs WT foram inicialmente pré-tratados com NaSal 20 mM por 1 hora e posteriormente tunicamicina 1,5 µg/mL foi adicionada ao meio de cultura e o tratamento foi mantido por mais 6 horas. Foram também realizados tratamentos com NaSal 20 mM por 1 e 7 horas. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-PCR. Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, para a separação e visualização das formas não processada e processada de XBP-1. CP: controle positivo. CN: controle negativo. PM: Peso molecular.

4.6 Expressão de genes alvo de ATF6 em células selvagens e deficientes para ATF6 tratadas com salicilato de sódio

Pelos dados apresentados até o momento, observamos que NaSal induz a expressão do mRNA e o acúmulo proteico de ATF6(p90) sem, no entanto, causar sua ativação. Ademais, quando as células são expostas previamente ao NaSal e então submetidas ao estresse do RE, observamos que a atividade de ATF6, mas não de IRE-1, é significativamente atenuada. Contudo, tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a forma não ativada de ATF6, i.e., ATF6(p90), que se acumula em resposta ao tratamento com NaSal bloqueia sua própria ativação subsequente em resposta ao um agente indutor de estresse do RE (ver Discussão - Figura 13). Assim, seria razoável supor que genes que são induzidos por NaSal, porém alvos de ATF6, teriam sua expressão inalterada em células desprovidas de ATF6. Para avaliar essa hipótese, realizamos experimentos com MEFs WT e ATF6-KO. Nesses experimentos o tratamento com tunicamicina foi usado como controle da expressão desses genes.

Dentre os genes relacionados ao estresse do RE e regulados por ATF6 que foram elencados para nossos estudos, apenas CHOP (Figura 11 A) e GADD34 (Figura 12), mas não BiP/GRP78 (Figura 11 B), tiveram a expressão induzida pelo tratamento com NaSal. No caso de CHOP, essa indução ocorre com cinética semelhante entre as células selvagens e as células deficientes de ATF6, porém aparentemente em níveis mais elevados nas células deficientes de ATF6. No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Nos tempos avaliados de 4, 8, 12 e 24 horas de tratamento a expressão do mRNA de CHOP permanece nos mesmos níveis, também semelhantes àqueles observados no tratamento com tunicamicina, sendo estatisticamente significativa em relação às células não tratadas.

BiP, cuja expressão foi significativamente induzida por tunicamicina, não teve sua expressão induzida por NaSal (Figura 11 B). Os níveis relativos do mRNA de BiP observados no tratamento com tunicamicina são 10 e 5 vezes maiores do que aqueles observados nas células WT e ATF6-KO tratadas com NaSal, respectivamente, os quais, por sua vez, permanecem em níveis semelhantes ao de células não tratadas (NT), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. De modo importante, o fato de NaSal não induzir a expressão de BiP, uma molécula marcante do estresse do RE,

indica que este fármaco não causa estresse do RE, embora genes responsivos ao estresse do RE tenham sua expressão induzida como demonstrado por Gentz e colaboradores (Gentz et al., 2013).

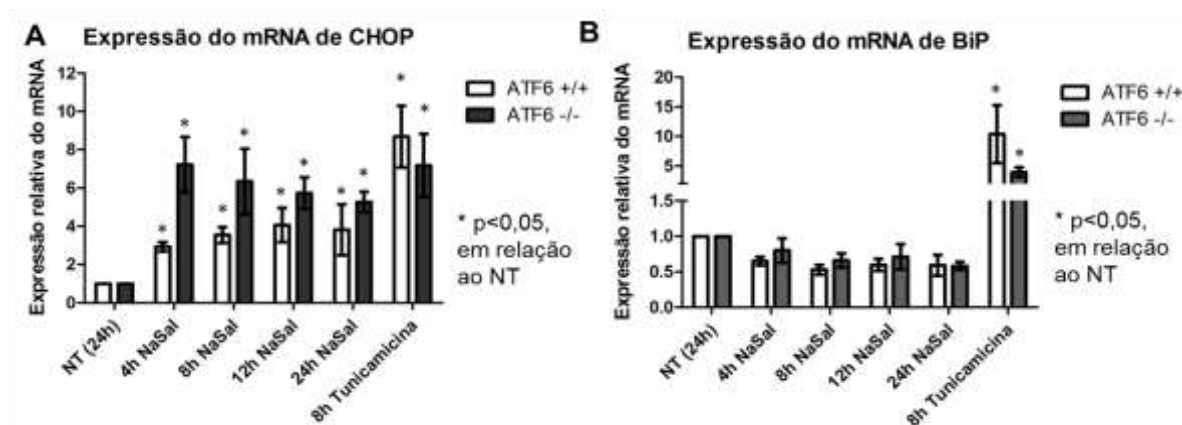


Figura 11: Expressão de genes alvo de ATF6 em células tratadas com salicilato de sódio.

MEFs WT ou ATF6-KO foram tratados com NaSal 20 mM pelos tempos de 4, 8, 12 ou 24 horas ou tunicamicina 3,0 µg/mL por 8 horas. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA de CHOP (A) ou BiP (B). A expressão relativa do mRNA de CHOP ou BiP foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando RPL32 como gene normalizador.

Outro gene relacionado às vias de estresse do RE que teve sua expressão induzida pelo NaSal é GADD34, a fosfatase de eIF2 α . Na Figura 12 A está demonstrada a cinética de expressão desse gene em MEFs WT que foram tratados com NaSal nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas, além do controle positivo, i.e., tratamento com tunicamicina. Nos tempos de 8 e 12 horas pós-tratamento com NaSal e no tratamento com tunicamicina, a diferença de expressão é estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado. No tempo de 24 horas de tratamento, os níveis de expressão retornam a níveis basais. De nosso conhecimento, essa é a primeira evidência que NaSal induz a expressão de GADD34.

Diferente do que é descrito na literatura (Wu *et al.*, 2007), não observamos diferenças significativas na expressão de GADD34 nos MEFs WT e ATF6-KO tratados com tunicamicina (Figura 12 B). Nas células deficientes de ATF6 também ocorre indução de GADD34 nos tempos de tratamento com NaSal, em níveis aparentemente elevados no intervalo de tempo de 4 horas, porém reduzidos nos intervalos de tempo de 12 e 24

horas quando comparados aos das células selvagens. No entanto, as diferenças não são estatisticamente significativas.

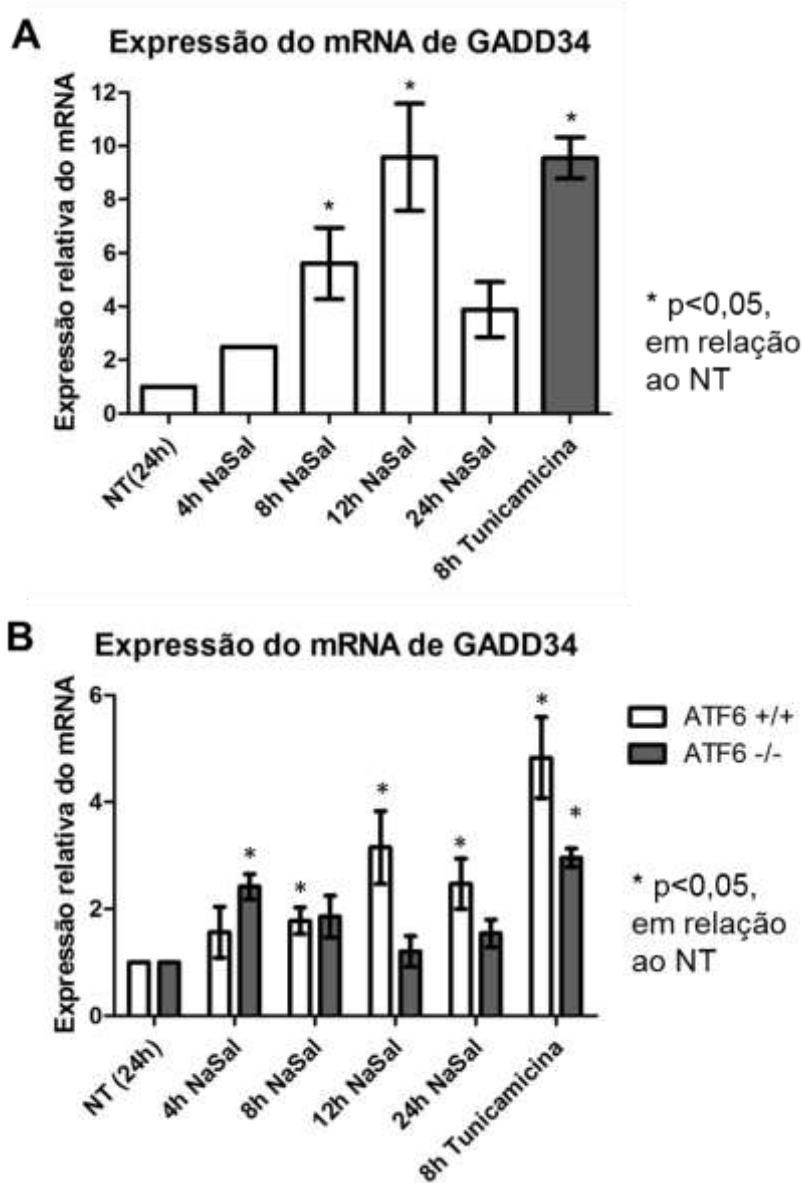


Figura 12: Expressão do mRNA de GADD34 induzida pelo salicilato de sódio. MEFs WT (A) ou WT e ATF6-KO (B) foram tratados com NaSal 20 mM pelos tempos de 4, 8, 12 ou 24 horas ou tunicamicina 3,0 µg/mL por 8 horas. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido para análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA de GADD34. A expressão relativa do mRNA de GADD34 foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando RPL32 como gene normalizador.

5. DISCUSSÃO

O estresse do retículo endoplasmático é uma resposta celular ao acúmulo de proteínas mal formadas no interior dessa organela, que leva à ativação de vias de sinalização que, através da ativação transcricional de diversos genes, resulta na resolução do estresse ou na morte celular.

ATF6 é uma das três proteínas sensores, localizadas na membrana do RE, que iniciam a resposta a proteínas mal formadas. Durante o estresse do RE, ATF6 é transportado até o complexo de Golgi, clivado em sítios específicos e o fator de transcrição ativo gerado é então transportado para o núcleo da célula. O tratamento de células com substâncias indutoras do estresse do RE, como a tunicamicina, leva tanto à ativação de ATF6 pela via descrita como também ao aumento da sua expressão.

Por outro lado, como revisado recentemente por nós (Mügge & Silva, 2015 - Anexo), já foi demonstrado na literatura que o tratamento de diferentes tipos celulares com fármacos anti-inflamatórios não esteroidais de diferentes classes pode induzir a expressão e ativação de alguns genes envolvidos no estresse do RE, tendo sido demonstrada predominantemente a expressão de BiP e CHOP e a ativação de PERK e ATF6.

Em relação aos salicilatos, já havia sido demonstrado por Silva *et al.* (2007) que aspirina e salicilato de sódio induzem a ativação de PERK e a fosforilação de eIF2 α , porém não induzem a ativação de IRE1 e o processamento de XBP-1. Gentz *et al.* (2013) demonstraram posteriormente que a expressão da proteína de ATF6 é induzida pelo salicilato de sódio e que essa expressão é dependente da cinase de eIF2 α GCN2.

No presente trabalho, demonstramos que tanto o mRNA quanto a proteína ATF6 são induzidos pelo salicilato de sódio e, ainda, que essa expressão é regulada de maneira diferente nas células deficientes de PERK. Intrigante, a expressão mais robusta do mRNA de ATF6 não é acompanhada pelo acúmulo da proteína nos MEFs PERK-KO. Esses resultados sugerem a indução de modificações pós-traducionais em ATF6, mediadas por PERK, nas células tratadas com NaSal. Fosforilação, glicosilação e ubiquitinação de ATF6 já foram demonstradas e podem resultar em modificações na

meia vida dessa proteína. Experimentos para avaliação da meia vida de ATF6 em MEFs WT e PERK-KO tratados com NaSal serão realizados em breve.

A investigação da ativação transcricional de ATF6 seria mais um passo no estudo da expressão de ATF6 em células tratadas com NaSal. O plasmídeo de gene repórter de luciferase contendo a região promotora de ATF6 funcionou em células tratadas com tunicamicina, da mesma forma que no artigo em que foi descrito (Teske *et al.*, 2011). Entretanto, o NaSal não induziu a síntese de luciferase nas células transfectadas e tratadas posteriormente com o fármaco, o que pode indicar que os elementos regulatórios do gene de ATF6 induzidos por NaSal não se encontram dentro da região promotora. Estudos mais aprofundados sobre essa região promotora e outras regiões do gene de ATF6 são necessários para se identificar o elemento responsivo a NaSal nele contido.

Diferentemente da tunicamicina, o tratamento com NaSal de células transfectadas com o plasmídeo p5xATF6-GL3 não induz a atividade transcricional de ATF6 e, ainda, o pré-tratamento com NaSal promove inibição da atividade transcricional induzida pela tunicamicina. Como demonstrado, não ocorre a diminuição da expressão do mRNA de ATF6 no tratamento combinado o que indica que, apesar do NaSal induzir a expressão de ATF6 no nível de mRNA, esse fármaco não induz a ativação de ATF6 e pode também reduzir a sua ativação induzida pela tunicamicina. Hipóteses para os efeitos do pré-tratamento com NaSal precisam ser investigadas, mas é possível que a ativação de ATF6 seja prejudicada pela indução de modificações pós-tradução na proteína. A ausência de processamento de XBP-1 em células tratadas com NaSal indica que os efeitos observados sejam mediados exclusivamente por ATF6.

Uma vez que não ocorreu a indução da forma ativa de ATF6 nas células tratadas com NaSal, é possível que a expressão de genes alvo exclusivos de ATF6 seja inibida por esse tratamento. CHOP e GADD34, genes que tem sua expressão induzida por NaSal, são alvos também de ATF4, o fator de transcrição cuja síntese é induzida pela fosforilação de eIF2 α por PERK. Em relação a BiP, que não é alvo exclusivo de ATF6 na via de estresse do RE, mais investigações precisam ser realizadas, mas o fato que NaSal não induz sua expressão é uma evidência adicional de que os salicilatos induzem a ativação de genes relacionados ao estresse do RE por vias não convencionais.

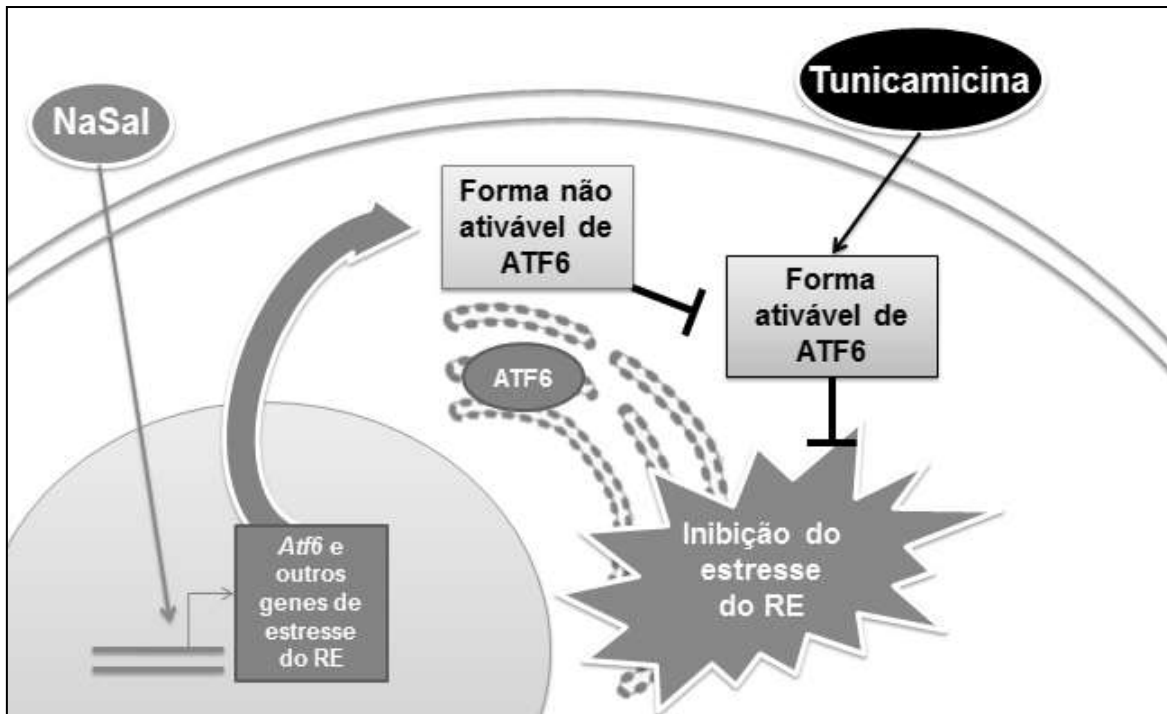


Figura 13: Modelo de efeitos do salicilato de sódio sobre ATF6.

No modelo proposto, a tunicamicina, um conhecido agente indutor do estresse do RE, induz a expressão de uma forma de ATF6 que é ativada durante o estresse do RE. Por outro lado, o salicilato de sódio, ao mesmo tempo em que induz a expressão de diversos genes de estresse do RE, a proteína ATF6 induzida e acumulada após tratamento com esse fármaco sofre modificações pós-traducionais. A ocorrência dessas modificações impede que essa forma de ATF6 seja ativada durante o estresse do RE.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que ATF6 é um alvo da ação dos fármacos salicilatos e que essa ação resulta no aumento da sua expressão, mas não na sua ativação. O salicilato de sódio também é capaz de inibir a atividade transcricional de ATF6 induzida pela tunicamicina, o que pode demonstrar uma propriedade de inibição do estresse do RE. Estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de ação desses fármacos ainda precisam, portanto, ser realizados, para que novas aplicações clínicas sejam fundamentadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHUSAINI, S. *et al.* Lipopolysaccharide, high glucose and saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in cultured primary human adipocytes: Salicylate alleviates this stress. Biochem Biophys Res Commun, v.397, n.3, Jul 2, p.472-8, 2010.

AMANN, R.; PESKAR, B. A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. Eur J Pharmacol, v.447, n.1, Jun 28, p.1-9, 2002.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res, v.64, n.15, Aug 1, p.5245-50, 2004.

BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M. F. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, v.11, n.1, Jun, p.52-64, 2012.

BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; HENDERSHOT, L. M.; HARDING, H. P.; RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol, v.2, n.6, Jun, p.326-32, 2000.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc. 2011. 1808p p.

CALFON, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature, v.415, n.6867, Jan 3, p.92-6, 2002.

CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Unfolded protein response. Curr Biol, v.22, n.16, Aug 21, p.R622-6, 2012.

CHAKRABARTI, A.; CHEN, A. W.; VARNER, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. Biotechnol Bioeng, v.108, n.12, Dec, p.2777-93, 2011.

CHAN, C. P.; KOK, K. H.; TANG, H. M.; WONG, C. M.; JIN, D. Y. Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. Biochim Biophys Acta, v.1833, n.10, Oct, p.2165-75, 2013.

DIKSHIT, P.; CHATTERJEE, M.; GOSWAMI, A.; MISHRA, A.; JANA, N. R. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. J Biol Chem, v.281, n.39, Sep 29, p.29228-35, 2006.

EGAWA, N. *et al.* The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6alpha, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. J Biol Chem, v.286, n.10, Mar 11, p.7947-57, 2010.

GADE, P. *et al.* An IFN-gamma-stimulated ATF6-C/EBP-beta-signaling pathway critical for the expression of Death Associated Protein Kinase 1 and induction of

autophagy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.109, n.26, Jun 26, p.10316-21, 2012.

GADE, P. *et al.* Regulation of the death-associated protein kinase 1 expression and autophagy via ATF6 requires apoptosis signal-regulating kinase 1. Mol Cell Biol, v.34, n.21, Nov, p.4033-48, 2014.

GARDNER, B. M.; PINCUS, D.; GOTTHARDT, K.; GALLAGHER, C. M.; WALTER, P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. Cold Spring Harb Perspect Biol, v.5, n.3, Mar, p.a013169, 2013.

GARDNER, B. M.; WALTER, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. Science, v.333, n.6051, Sep 30, p.1891-4, 2011.

GENTZ, S. H.; BERTOLLO, C. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; DA SILVA, A. M. Implication of eIF2alpha kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate. J Pharm Pharmacol, v.65, n.3, Mar, p.430-40, 2013.

HARDING, H. P. *et al.* Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. Mol Cell, v.7, n.6, Jun, p.1153-63, 2001.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Mol Cell, v.5, n.5, May, p.897-904, 2000.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature, v.397, n.6716, Jan 21, p.271-4, 1999.

HARDING, H. P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell, v.11, n.3, Mar, p.619-33, 2003.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol, v.13, n.2, Feb, p.89-102, 2012.

HONG, M.; LI, M.; MAO, C.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. J Cell Biochem, v.92, n.4, Jul 1, p.723-32, 2004.

HONG, M. *et al.* Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. J Biol Chem, v.279, n.12, Mar 19, p.11354-63, 2004.

KARALI, E. *et al.* VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. Mol Cell, v.54, n.4, May 22, p.559-72, 2014.

LI, M. *et al.* ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF- κ B

and YY1. Mol Cell Biol, v.20, n.14, Jul, p.5096-106, 2000.

LUO, S.; LEE, A. S. Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation. Biochem J, v.366, n.Pt 3, Sep 15, p.787-95, 2002.

MORISHIMA, N.; NAKANISHI, K.; NAKANO, A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. J Biol Chem, v.286, n.40, Oct 7, p.35227-35, 2011.

MÜGGE, F.; SILVA, A. Endoplasmic reticulum stress response in the roadway for the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases, 2015.

NADANAKA, S.; OKADA, T.; YOSHIDA, H.; MORI, K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. Mol Cell Biol, v.27, n.3, Feb, p.1027-43, 2007.

NAKANISHI, K.; SUDO, T.; MORISHIMA, N. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. J Cell Biol, v.169, n.4, May 23, p.555-60, 2005.

SATO, Y.; NADANAKA, S.; OKADA, T.; OKAWA, K.; MORI, K. Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. Cell Struct Funct, v.36, n.1, p.35-47, 2011.

SHEN, J.; CHEN, X.; HENDERSHOT, L.; PRYWES, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell, v.3, n.1, Jul, p.99-111, 2002.

SILVA, A. M.; WANG, D.; KOMAR, A. A.; CASTILHO, B. A.; WILLIAMS, B. R. Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. J Biol Chem, v.282, n.14, Apr 6, p.10164-71, 2007.

STEINBERG, G. R.; DANDAPANI, M.; HARDIE, D. G. AMPK: mediating the metabolic effects of salicylate-based drugs? Trends Endocrinol Metab, v.24, n.10, Oct, p.481-7, 2013.

STONE, E. An account of the success of the bark of the willow tree in the cure of agues. In a letter to the high honourable George Earl of Macclesfield, President of R. S. from the Rev. Mr. Edmund Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire. Philosophical Transactions, v.53, 1763.

TAY, K. H. *et al.* Sustained IRE1 and ATF6 signaling is important for survival of melanoma cells undergoing ER stress. Cell Signal, v.26, n.2, Feb, p.287-94, 2014.

TEODORO, T.; ODISHO, T.; SIDOROVA, E.; VOLCHUK, A. Pancreatic beta-cells depend on basal expression of active ATF6alpha-p50 for cell survival even under nonstress conditions. Am J Physiol Cell Physiol, v.302, n.7, Apr 1, p.C992-1003, 2012.

TESKE, B. F. *et al.* The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, v.22, n.22, Nov, p.4390-405, 2011.

THUERAUF, D. J. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. J Biol Chem, v.273, n.32, Aug 7, p.20636-43, 1998.

THUERAUF, D. J.; MORRISON, L.; GLEMBOTSKI, C. C. Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction. J Biol Chem, v.279, n.20, May 14, p.21078-84, 2004.

TOKO, H. *et al.* ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. J Mol Cell Cardiol, v.49, n.1, Jul, p.113-20, 2010.

VAINIO, H.; MORGAN, G. Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. Pharmacol Toxicol, v.81, n.4, Oct, p.151-2, 1997.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol, v.231, n.25, Jun 23, p.232-5, 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. Thromb Res, v.110, n.5-6, Jun 15, p.255-8, 2003.

VATTEM, K. M.; WEK, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.31, Aug 3, p.11269-74, 2004.

VOLMER, R.; RON, D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. Curr Opin Cell Biol, v.33C, Dec 24, p.67-73, 2015.

VOLMER, R.; VAN DER PLOEG, K.; RON, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. Proc Natl Acad Sci U S A, v.110, n.12, Mar 19, p.4628-33, 2013.

WANG, Y. *et al.* Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. J Biol Chem, v.275, n.35, Sep 1, p.27013-20, 2000.

WEK, R. C.; CAVENER, D. R. Translational control and the unfolded protein response. Antioxid Redox Signal, v.9, n.12, Dec, p.2357-71, 2007.

WU, J. *et al.* ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. Dev Cell, v.13, n.3, Sep, p.351-64, 2007.

YAMAMOTO, K. *et al.* Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev Cell, v.13, n.3, Sep, p.365-76, 2007.

YAMAMOTO, K. *et al.* Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell, v.21, n.17, Sep 1, p.2975-86, 2010.

YOSHIDA, H.; HAZE, K.; YANAGI, H.; YURA, T.; MORI, K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem, v.273, n.50, Dec 11, p.33741-9, 1998.

YOSHIDA, H.; MATSUI, T.; YAMAMOTO, A.; OKADA, T.; MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell, v.107, n.7, Dec 28, p.881-91, 2001.

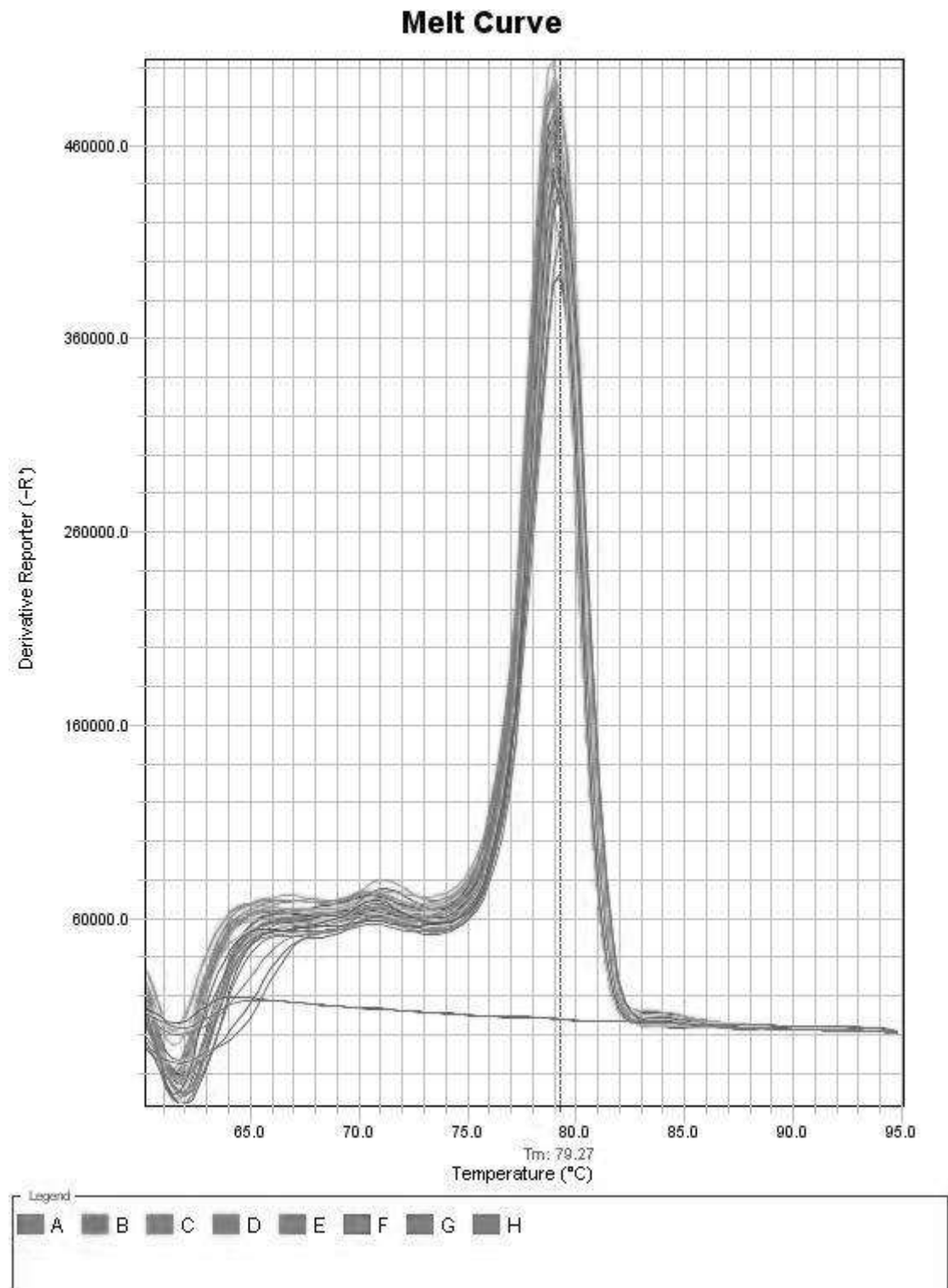
YOSHIDA, H. *et al.* ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol, v.20, n.18, Sep, p.6755-67, 2000.

YOSHIDA, H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol, v.21, n.4, Feb, p.1239-48, 2001.

FIGURAS ANEXAS

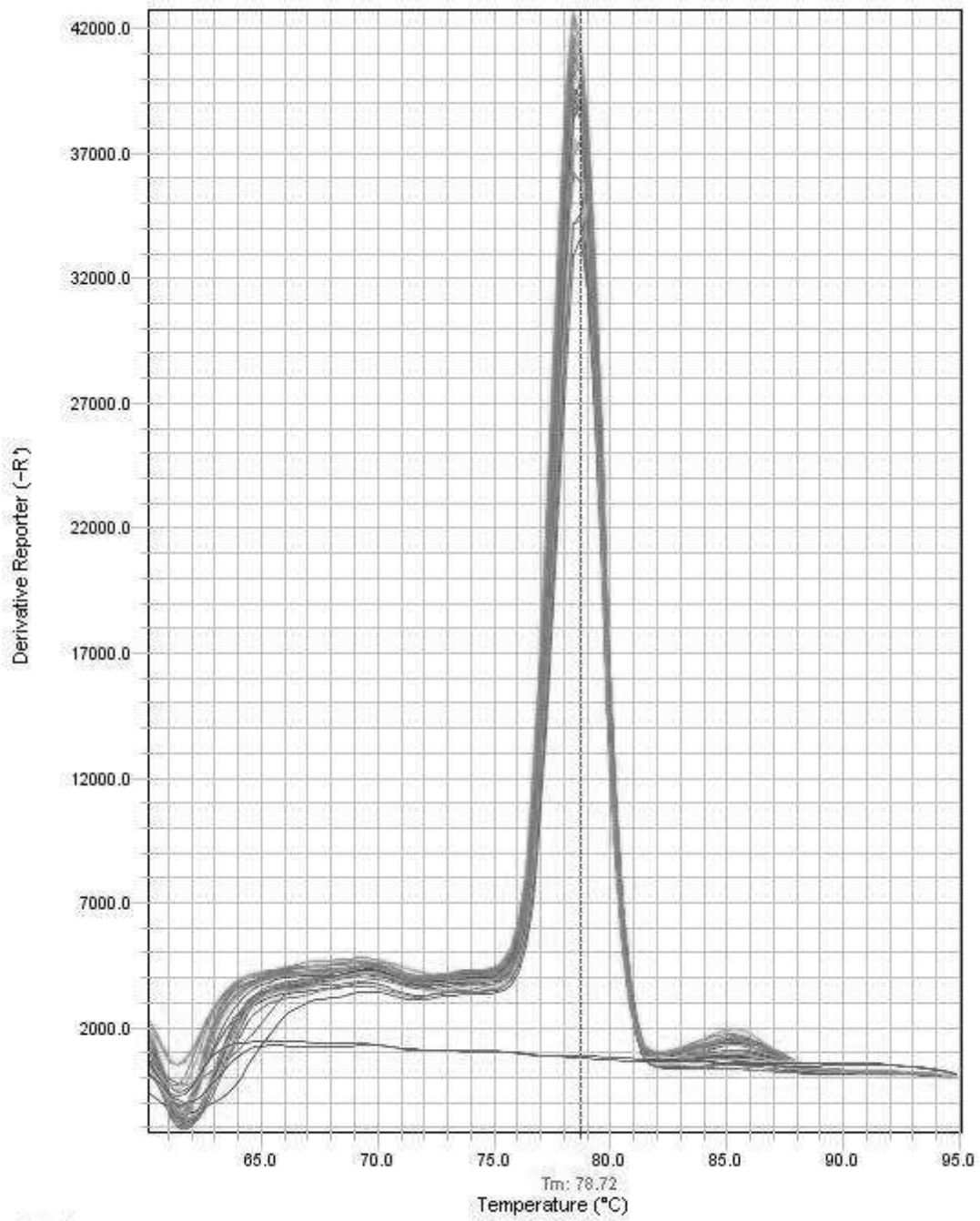
Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos utilizados

ATF6



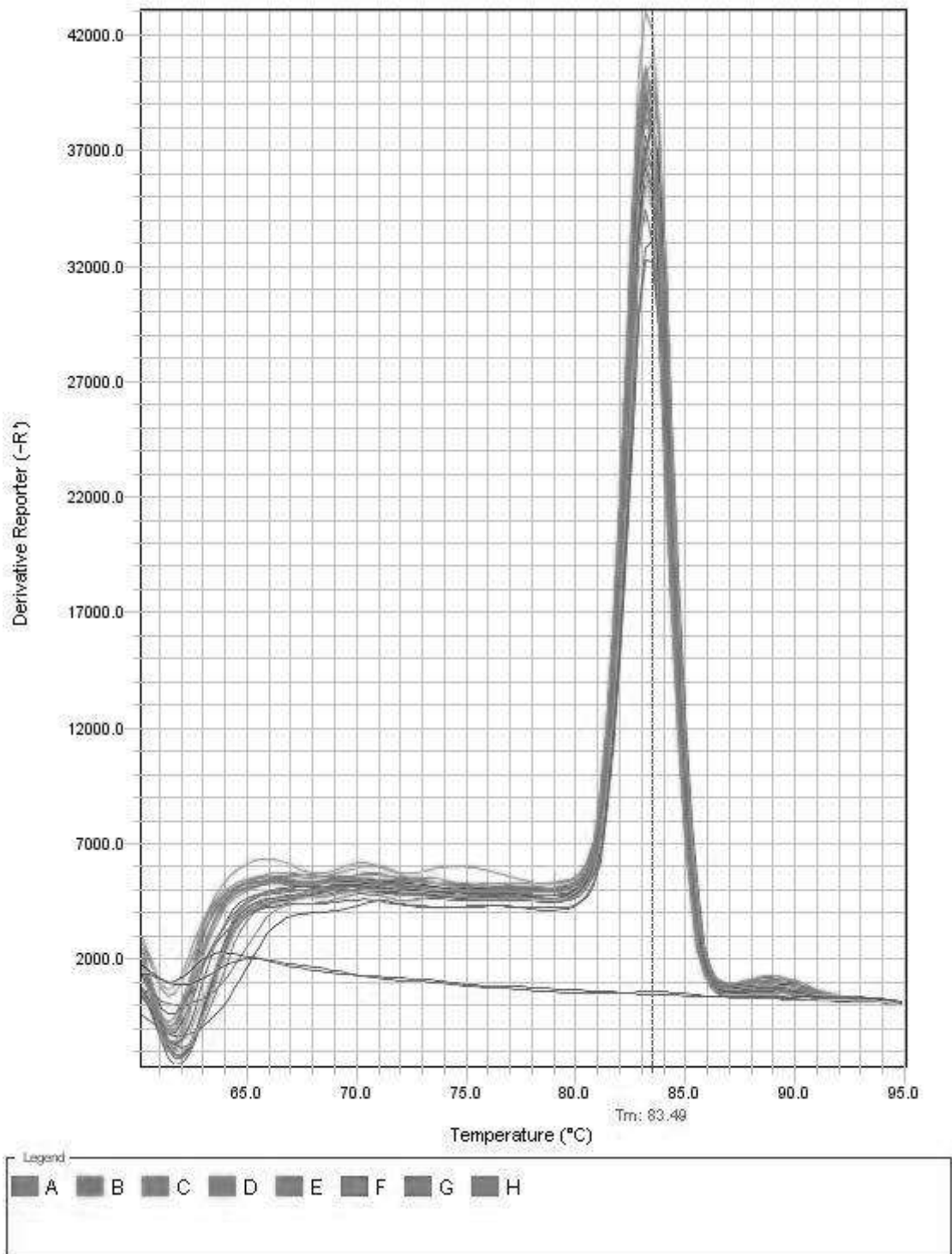
BiP

Melt Curve

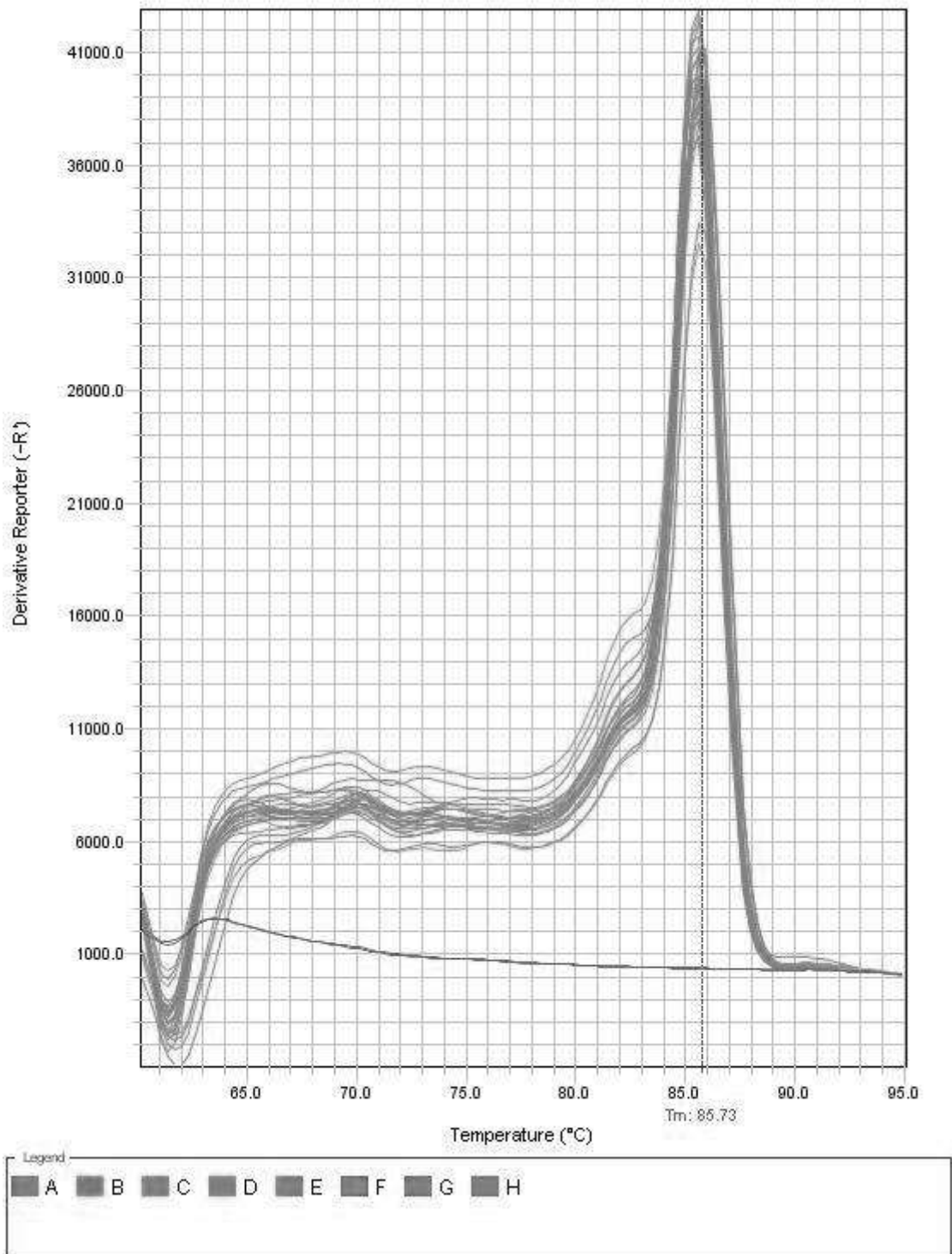


CHOP

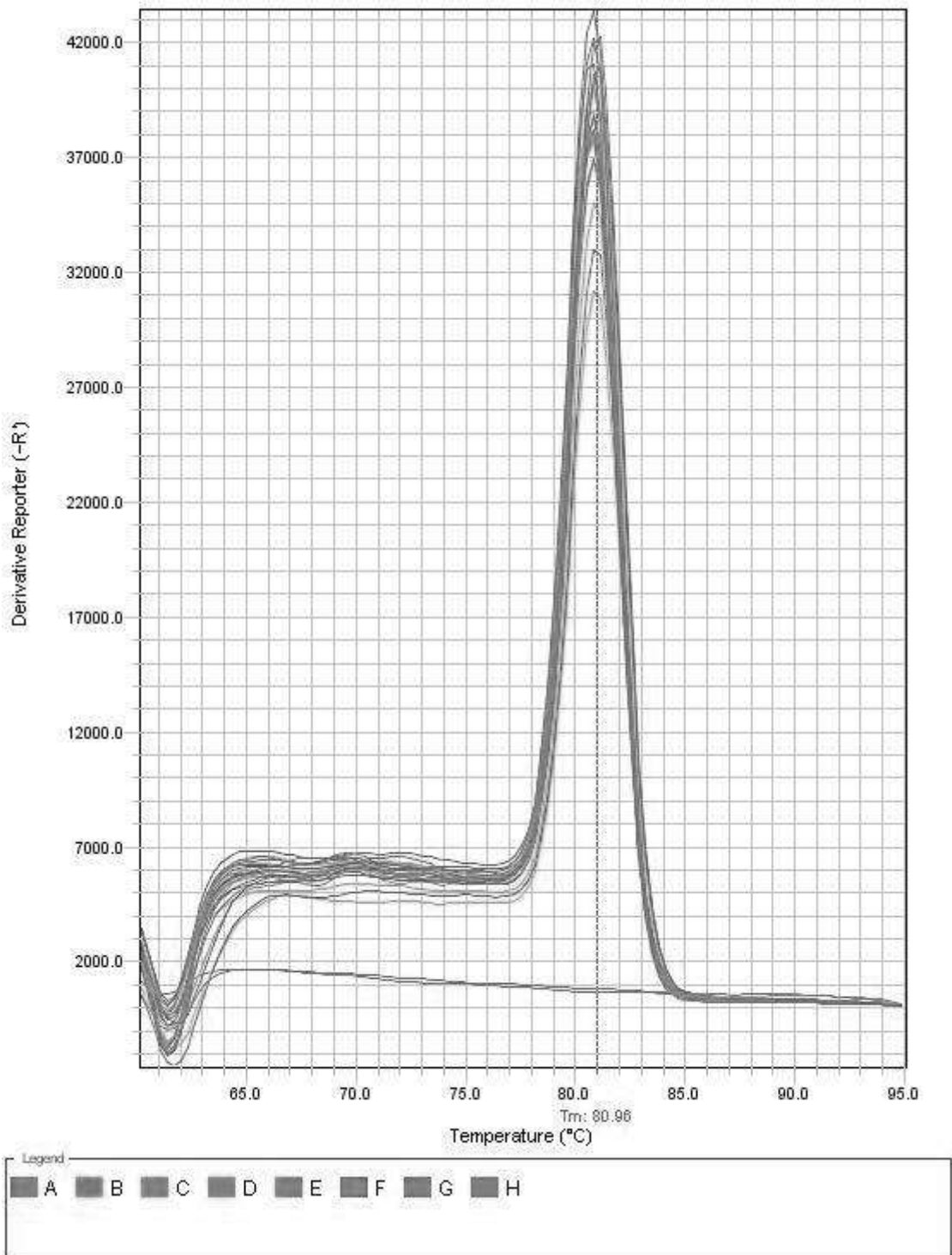
Melt Curve



Melt Curve



Melt Curve



HPRT

Melt Curve

